Simone Cristina Yamasaki

**Efeitos do veneno de *Apis mellifera* e do metotrexato sobre peptidases
do plasma, do líquido e membrana sinoviais e de leucócitos circulantes
em ratos com artrite induzida por colágeno tipo II**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT, para a obtenção do Título de
Mestre em Biotecnologia.

**São Paulo
2010**

Simone Cristina Yamasaki

Efeitos do veneno de *Apis mellifera* e do metotrexato sobre peptidases do plasma, do líquido e membrana sinoviais e de leucócitos circulantes em ratos com artrite induzida por colágeno tipo II

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador:
Prof. Dr. Paulo Flávio Silveira

**São Paulo
2010**

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

© reprodução total

Yamasaki, Simone Cristina.

Efeitos do veneno de *Apis mellifera* e do metotrexato sobre peptidases do plasma, do líquido e membrana sinoviais e de leucócitos circulantes em ratos com artrite induzida por colágeno tipo II / Simone Cristina Yamasaki. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Paulo Flávio Silveira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Peptidases.

Versão do título para o inglês: Effects of *Apis mellifera* venom and methotrexate on plasma, synovial fluid and membrane and circulating leukocytes peptidases in rats with type II collagen-induced arthritis.

Descritores: 1. Artrite induzida por colágeno tipo II 2. Metotrexato 3. Veneno de abelhas 4. Aminopeptidase 5. Oligopeptidase I. Silveira, Paulo Flávio II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0199/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Simone Cristina Yamasaki.

Título da Dissertação: Efeitos do veneno de *Apis mellifera* e do metotrexato sobre peptidases do plasma, do líquido e membrana sinoviais e de leucócitos circulantes em ratos com artrite induzida por colágeno tipo II.

Orientador(a): Paulo Flávio Silveira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos do veneno de *Apis mellífera* sobre anticorpo anti-colágeno tipo II, interleucina 6 e peptidases do líquido e membrana sinoviais e de leucócitos circulantes em ratos com artrite induzida por colágeno tipo II", protocolo nº432/07, sob a responsabilidade de Paulo Flávio Silveira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 13/02/2008.

São Paulo, 18 de fevereiro de 2008.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

Aos meus pais por estarem sempre presentes, pelo incentivo, e por tudo o que sou e serei.

Ao meu irmão, minha maior companhia, pelo zelo durante todos estes anos.

Ao Rodrigo por ser meu chão e o meu céu.

AGRADECIMENTOS

Ao Paulo pela orientação e pelo incentivo a buscar novos desafios.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Aos amigos do Laboratório pelas discussões, auxílio, risadas, desentendimentos, porradas no braço, conversas descontraídas e batatas fritas com milk-shakes.

À Dra Cristina Maria Fernandes pelos ensinamentos, conversas, críticas e sugestões.

Ao Laboratório de Fisiologia da Dor do Instituto Butantan, por gentilmente dispor o espaço e equipamento para a avaliação da hiperalgesia.

Aos amigos por todos estes anos de convívio, problemas e saudades.

“Semeia de manhã a tua semente, e não descansa a tua mão até a noitinha; pois não sabes onde esta terá bom êxito, quer aqui quer ali, ou se ambas serão igualmente boas.”

Eclesiastes 11:6

RESUMO

YAMASAKI, S. C. Efeitos do veneno de *Apis mellifera* e do metotrexato sobre peptidases do plasma, do líquido e membrana sinoviais e de leucócitos circulantes em ratos com artrite induzida por colágeno tipo II. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune que afeta cerca de 1% da população mundial. A sua principal característica é a destruição progressiva de articulações acometidas, podendo haver também o comprometimento extra-articular e ocorrência de comorbidades. Algumas atividades enzimáticas têm sido relacionadas à AR, como as aminopeptidases básica (APB), neutra (APN) e dipeptidil peptidase 4 (DPP4), e a endopeptidase prolil oligopeptidase (POP). Dentre os tratamentos para a AR, o metotrexato (MTX) é o mais consagrado, mas seus mecanismos de modulação da inflamação não são completamente conhecidos. Além disso, tratamentos alternativos, como a acupuntura utilizando veneno de abelhas (BV), são controversos. Com a finalidade de contribuir com o conhecimento da etiologia e com a prospecção de novos marcadores e alternativas terapêuticas para a AR, o presente estudo avaliou a massa corporal, diâmetro das patas, anticorpo anti-colágeno tipo II, IL-6, TNF- α , algesia e atividades APB, APN, DPP4 e POP em amostras de plasma, líquido sinovial e frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) de membrana sinovial e de leucócitos mononucleares do sangue periférico de animais controle e submetidos à indução de artrite por colágeno (CIA) e sob tratamento sistêmico com BV e/ou MTX ou sem esse tratamento, e em animais resistentes à essa indução, bem como atividades dessas mesmas aminopeptidases em FS e FM de leucócitos isolados e plasma de animais controle, incubados diretamente com BV ou MTX. Como resultado: (i) animais artríticos perderam massa muscular, a qual foi normalizada por MTX e/ou BV; (ii) o tratamento com MTX amenizou o edema característico de artríticos; (iii) houve aumento significativo do limiar de hiperalgesia dos artríticos pelo MTX, mas não pelo BV; (iv) títulos similares de anticorpos anti colágeno tipo II foram detectados em animais artríticos tratados ou não com MTX e/ou BV e em animais resistentes; (v) o TNF- α está aumentado nos artríticos e foi normalizado por MTX e/ou BV; (vi) alterações das atividades aminopeptidásicas estão relacionadas com o tipo de amostra avaliada e, em cada caso, com a presença ou ausência de edema; (vii) a atividade POP não foi detectada nas amostras avaliadas; (viii) o BV diminuiu diretamente a atividade APN do

plasma; (ix) o MTX inibiu diretamente a APN, APB e DPP4 do plasma; (x) o BV e o MTX não alteraram diretamente essas atividades aminopeptidásicas em leucócitos isolados. Em animais resistentes, o decréscimo de APB no líquido sinovial e o aumento da DPP4 plasmática devem refletir na diminuição da ativação do fator de transcrição nuclear κ B e aumento da clivagem de citocinas, respectivamente. O aumento da APN na FS da membrana sinovial e no líquido sinovial em animais artríticos revelou-se como possível marcador diagnóstico. A diminuição do edema e da APB no líquido sinovial e plasma, e normalização dos níveis de APN na FS e líquido sinovial causados pelo MTX devem estar entre as ações anti-inflamatórias deste fármaco. O BV causou diminuição da APN na FM da membrana sinovial, normalização do TNF- α , da APN na FS da membrana sinovial e no líquido sinovial e aumento da DPP4 no plasma e líquido sinovial, alterações estas que devem ser consideradas entre os mecanismos anti-inflamatórios deste veneno. Em conclusão, (i) alterações de atividades aminopeptidásicas estão envolvidas na CIA e podem ser potencialmente úteis na avaliação diagnóstica e prognóstica da AR; (ii) os tratamentos com BV e/ou MTX são capazes de amenizar ou normalizar essas alterações nas aminopeptidases; (iii) o BV não tem efeito analgésico, mas é capaz de diminuir o TNF- α ; (iv) o BV pode conter algum inibidor da APN, enquanto o MTX parece agir como um inibidor não seletivo de APB, APN e DPP4.

Palavras-chave: Modelo animal. Artrite induzida por colágeno tipo II. Metotrexato. Veneno de abelhas. Aminopeptidase. Oligopeptidase.

ABSTRACT

YAMASAKI, S. C. **Effects of *Apis mellifera* venom and methotrexate on plasma, synovial fluid and membrane and circulating leukocytes peptidases in rats with type II collagen-induced arthritis.** 2010. 104 p. Master thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease and affects about 1% of world population. Its main feature is a progressive destruction of the affected joints, and extra-articular manifestations and comorbidities may also occur. Some enzymatic activities have been related to RA, such as basic aminopeptidase (APB), neutral (APN) and dipeptidyl peptidase 4 (DPP4), and prolyl oligopeptidase (POP). Methotrexate (MTX) is the most common treatment for rheumatoid arthritis, but its anti-inflammatory mechanisms are not completely known. Furthermore, alternative therapies such as acupuncture using bee venom (BV) are controversial. The aim of this study was to contribute to the understanding of the etiology and the prospection of new markers and therapies in RA. Thus, we evaluated body mass, paw diameter, anti-type II collagen antibody, IL-6, TNF- α , algesia, enzymatic activities of APN, APB, DPP4 and POP in plasma, synovia, soluble fraction (SF) and solubilized membrane fraction (MF) of synovium and peripheral blood mononuclear leukocytes from control and rats with collagen-induced arthritis, both with or without systemic treatment with BV and/or MTX, and in animals resistant to arthritis, as well as aminopeptidase activities in SF and MF of leukocytes and plasma incubated with BV or MTX. As a result: (i) arthritic animals presented body weight loss, which was normalized by MTX and/or BV; (ii) MTX treatment ameliorated the swelling of paw; (iii) there was a significant increase in the threshold of hyperalgesia by MTX, and not by BV; (iv) anti-type II collagen antibody was detected in arthritic animals with or without MTX and/or BV treatment and in resistant animals; (v) TNF- α is present in arthritic rats without treatment, and MTX and/or BV normalized this cytokine; (vi) alterations in aminopeptidase activities are related sample and, in each case, with edema presence or absence; (vii) POP activity was not detected in any sample; (viii) BV directly decreased APN activity in plasma; (ix) MTX directly inhibited APN, APB and DPP4 in plasma; (x) BV and MTX caused no alterations of these aminopeptidase activities in isolated leukocytes. In resistant animals, the decrease of APB in synovia and increase of DPP4 in plasma could reflect the decreased activation of nuclear

transcription factor κ B and increased cleavage of cytokines, respectively. The increase of APN in FS synovium and synovia in arthritic animals reveals a possible diagnostic marker. The decrease of edema and APB in synovia and plasma and normal levels of APN in SF of synovium and in synovia caused by MTX may be among the anti-inflammatory actions of this drug. BV caused a decrease of APN in MF of synovium, normalization of TNF- α and APN in SF of synovium and synovia and increased DPP4 in plasma and synovia, these changes should be considered among the anti-inflammatory mechanisms of this venom. In conclusion, (i) alterations of aminopeptidase activities are involved in collagen-induced arthritis and might be useful in the diagnosis and prognosis of AR; (ii) MTX and/or BV are able to reduce or normalize these changes in aminopeptidases; (iv) BV has no analgesic effect, but decreased the TNF- α ; (iv) BV may contain some inhibitor of APN and MTX might be a non selective inhibitor of aminopeptidases.

Keywords: Animal model. Type II collagen-induced arthritis. Methotrexate. Bee venom. Aminopeptidase. Oligopeptidase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Aspecto macroscópico de patas posteriores de animal controle (fotografia à esquerda) e de animal artrítico (fotografia à direita). 42
- Figura 2** - Massa corporal de animais controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX), artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes. 43
- Figura 3** - Diâmetro das patas posteriores nos ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX), artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes..... 44
- Figura 4** - Porcentagem relativa de edema das patas posteriores nos grupos artríticos tratados com BV e/ou MTX, em relação aos animais artríticos não tratados. 44
- Figura 5** - Limiar mecânico de hiperalgesia das patas posteriores dos grupos controle sem tratamento e artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX..... 47
- Figura 6** - Porcentagem relativa de limiar de hiperalgesia nos grupos artríticos tratados com BV e/ou MTX, em relação aos animais artríticos não tratados..... 47
- Figura 7** - Atividade de desidrogenase láctica (LDH) das frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) da membrana sinovial de ratos controle sem tratamento e artríticos sem tratamento. 48
- Figura 8** - Atividade de aminopeptidase básica (APB) do plasma de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita)..... 49
- Figura 9** - Atividade de aminopeptidase básica (APB) do líquido sinovial de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita). 49
- Figura 10** - Atividade de aminopeptidase básica (APB) da fração solúvel (FS) da membrana sinovial de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita). 50
- Figura 11** - Atividade de aminopeptidase básica (APB) da fração de membrana solubilizada (FM) de membrana sinovial de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita). 51

- Figura 12** - Atividade de aminopeptidase básica (APB) da fração solúvel (FS) de leucócitos mononucleares de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita). 51
- Figura 13** - Atividade de aminopeptidase básica (APB) da fração de membrana solubilizada (FM) de leucócitos mononucleares de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita). 52
- Figura 14** - Atividade de aminopeptidase neutra (APN) do plasma de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita)..... 52
- Figura 15** - Atividade de aminopeptidase neutra (APN) do líquido sinovial de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita). 53
- Figura 16** - Atividade de aminopeptidase neutra (APN) da fração solúvel (FS) da membrana sinovial de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita). 54
- Figura 17** - Atividade de aminopeptidase neutra (APN) da fração de membrana solubilizada (FM) da membrana sinovial de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita). 54
- Figura 18** - Atividade de aminopeptidase neutra (APN) da fração solúvel (FS) de leucócitos mononucleares de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita). 55
- Figura 19** - Atividade de aminopeptidase neutra (APN) da fração de membrana solubilizada (FM) de leucócitos mononucleares de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita). 56
- Figura 20** - Atividade de dipeptidil peptidase 4 (DPP4) do plasma de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita)..... 56

- Figura 21** - Atividade de dipeptidil peptidase 4 (DPP4) do líquido sinovial de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita). 57
- Figura 22** - Atividade de dipeptidil peptidase 4 (DPP4) da fração solúvel (FS) da membrana sinovial de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita). 58
- Figura 23** - Atividade de dipeptidil peptidase 4 (DPP4) da fração de membrana solubilizada (FM) da membrana sinovial de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita). 58
- Figura 24** - Atividade de dipeptidil peptidase 4 (DPP4) da fração solúvel (FS) de leucócitos mononucleares de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita). 59
- Figura 25** - Atividade de dipeptidil peptidase 4 (DPP4) da fração de membrana solubilizada (FM) de leucócitos mononucleares de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita). 59
- Figura 26** - Efeito do BV nas concentrações de 50µg/mL, 500µg/mL e 5000µg/mL sobre as atividades APN (**Figura 26A**), APB (**Figura 26B**) e DPP4 (**Figura 26C**) do plasma 61
- Figura 27** - Efeito do MTX nas concentrações de 50µg/mL, 500µg/mL e 5000µg/mL sobre as atividades APN (**Figura 27A**), APB (**Figura 27B**) e DPP4 (**Figura 27C**) do plasma. 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpo anticolágeno tipo II no plasma de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX), artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes.	45
Tabela 2 – TNF- α no soro de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX), artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes.	46
Tabela 3 – Incubação de leucócitos mononucleares de animais controle com BV ou MTX..	63
Tabela 4 – Incubação de leucócitos mononucleares de artríticos com BV ou MTX.....	64
Tabela 5 – Sumário dos resultados obtidos em comparação ao grupo controle sem tratamento.	66
Tabela 6 – Sumário dos resultados obtidos de edema e de limiar de hiperalgesia de animais artríticos tratados com BV e/ou MTX em comparação com animais artríticos não tratados.	66
Tabela 7 – Sumário das atividades aminopeptidásicas após a incubação com BV ou MTX em plasma de controles sem tratamento.	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA – adenosina desaminase
AICAR – 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo transformilase
AMC – 7-amido-4-metilcumarina
AMPc – adenosina monofosfato cíclico
Ang – angiotensina
ANOVA – análise da variância
APB – aminopeptidase básica
APC – célula apresentadora de antígeno
APN – aminopeptidase neutra
AR – artrite reumatoide
BSA – albumina de soro bovino
BV – veneno de abelha
CD – grupo de diferenciação
CIA – artrite induzida por colágeno tipo II
COX – ciclooxigenase
DL50 – dose letal 50%
DMARD – droga modificadora do curso da doença
DNA – ácido desoxirribonucleico
DPP4 – dipeptidil peptidase 4
DTT – DL-ditiotreitol
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA – ensaio imunoenzimático
EPM – erro padrão da media
FAP – proteína ativadora de fibroblastos
FM – fração de membrana solubilizada
FS – fração solúvel
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência
i.e – isto é (do latim *ib est*)
id – intradérmico
Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

ILAR – Liga Internacional de Associações para Reumatologia

iNOS – óxido nítrico sintetase indutível

ip – intraperitoneal

LDH – desidrogenase láctica

HLA – antígeno leucocitário humano

LTA₄ – leucotrieno A₄

LTB₄ – leucotrieno B₄

MHC – complexo principal de histocompatibilidade

MTX – metotrexato

NADH – dissódico de nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida

NFκB – fator de ativação nuclear κB

NK – célula natural killer

NO – óxido nítrico

PLA₂ – fosfolipase A₂

POP – prolil oligopeptidase

RANTES - Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted

RF – fator reumatoide

RNA – ácido ribonucleico

sc – subcutânea

TNF-α – fator de necrose tumoral-α

v/v – volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 ARTRITE REUMATOIDE	21
1.2 ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO TIPO II (CIA)	23
1.3 TRATAMENTO CONVENCIONAL DA AR	24
1.4 TERAPIA COM VENENO DE ABELHA (BV)	26
1.5 ATIVIDADES PEPTIDÁSICAS.....	28
2 OBJETIVOS.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 ANIMAIS E TRATAMENTOS	33
3.2 COLETA DE MATERIAL.....	35
3.3 RECONHECIMENTO E AVALIAÇÃO DOS SINAIS CARACTERÍSTICOS DA ARTRITE	35
3.3.1 Medida da massa corporal	35
3.3.2 Avaliação do diâmetro das patas	35
3.3.3 Marcadores moleculares	36
3.3.4 Hiperálgia	36
3.4 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS LEUCOCITÁRIAS DO SANGUE	36
3.4.1 Separação de células mononucleares	36
3.4.2 Hemólise	37
3.5 CONTAGEM DE CÉLULAS.....	37
3.6 VIABILIDADE CELULAR.....	37
3.7 INCUBAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES COM BV E MTX	38
3.8 EFEITOS DIRETOS DO BV E DO MTX SOBRE ATIVIDADES AMINOPEPTIDÁSICAS DO PLASMA	38
3.9 PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL (FS) E FRAÇÃO DE MEMBRANA SOLUBILIZADA (FM) DA MEMBRANA SINOVIAL E DE CÉLULAS MONONUCLEARES	38
3.10 MEDIDA DE PROTEÍNA TOTAL	39
3.11 MEDIDA DE DESIDROGENASE LÁCTICA (LDH).....	39
3.12 ATIVIDADES PEPTIDÁSICAS.....	40
3.13 ANÁLISE DOS RESULTADOS	41
4 RESULTADOS.....	42

4.1 INDUÇÃO DE ARTRITE	42
4.2 MASSA CORPORAL	42
4.3 AVALIAÇÃO DO EDEMA.....	43
4.4 AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS MARCADORAS	44
4.5 HIPERALGESIA.....	46
4.6 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS LEUCOCITÁRIAS DO SANGUE	48
4.7 SEPARAÇÃO DE FS E FM.....	48
4.8 APB	48
4.9 APN.....	52
4.10 DPP4	56
4.11 POP	60
4.12 EFEITOS DIRETOS DO BV SOBRE ATIVIDADES AMINOPEPTIDÁSICAS DO PLASMA	60
4.13 EFEITOS DIRETOS DO MTX SOBRE ATIVIDADES AMINOPEPTIDÁSICAS DO PLASMA.....	61
4.14 EFEITOS DIRETOS DO BV E MTX SOBRE LEUCÓCITOS MONONUCLEARES	63
4.14.1 Viabilidade.....	63
4.14.2 Atividades aminopeptidásicas.....	63
4.15 ATIVIDADES AMINOPEPTIDÁSICAS DO BV E MTX	64
4.16 SUMÁRIO DE RESULTADOS	64
5 DISCUSSÃO	68
5.1 DOSE E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DO MTX E BV.....	68
5.2 MASSA CORPORAL	68
5.3 EDEMA.....	69
5.4 HIPERALGESIA.....	71
5.5 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA ARTRITE POR MARCADORES MOLECULARES	71
5.5.1 Anticorpo anticolágeno tipo II.....	71
5.5.2 IL-6	72
5.5.3 TNF-α.....	73
5.6 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS LEUCOCITÁRIAS DO SANGUE	73
5.7 LDH	74
5.8 ATIVIDADES PEPTIDÁSICAS E ARTRITE.....	74
5.8.1 APB	75
5.8.1.1 A APB e a inflamação	75
5.8.1.2 A APB, o BV e o MTX	76

5.8.2 APN.....	77
<u>5.8.2.1 A APN e a inflamação.....</u>	<u>77</u>
<u>5.8.2.2 A APN, o BV e o MTX.....</u>	<u>78</u>
5.8.3 DPP4	79
<u>5.8.3.1 A DPP4 e a inflamação.....</u>	<u>79</u>
<u>5.8.3.2 A DPP4, o BV e o MTX.....</u>	<u>80</u>
5.8.4 POP	82
5.8.5 Aminopeptidases e leucócitos mononucleares	83
5.9 LEUCÓCITOS MONONUCLEARES INCUBADOS COM BV E MTX.....	85
5.10 EFEITO DIRETO DO BV E DO MTX SOBRE AS ATIVIDADES AMINOPEPTIDÁSICAS DO PLASMA	86
6 CONCLUSÕES	88
7 PERSPECTIVAS	90
REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 ARTRITE REUMATOIDE

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória, crônica, sistêmica e autoimune (DOAN e MASSAROTTI, 2005; NAKAMURA, 2000) que afeta cerca de 1% da população mundial (DOAN e MASSAROTTI, 2005; HIETALA et al., 2004; NAKAMURA, 2000), com incidência de 2/3 dos casos em mulheres (DOAN e MASSAROTTI, 2005). A etiologia é desconhecida (BRAND; KANG; ROSLONIEC, 2003; DOAN e MASSAROTTI, 2005; NAKAMURA, 2000) e os mecanismos para o estabelecimento dessa doença ainda não são completamente compreendidos (KOBAYASHI et al., 2008).

Estima-se que a predisposição genética relacionada aos genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) teria uma contribuição de cerca de 50% ou menos para o desenvolvimento da doença (IMBODEN, 2009; STRIETHOLT et al., 2008). Assim, diversos fatores não genéticos também estão envolvidos no desencadeamento da AR. Mecanismos epigenéticos, como metilação de DNA, *splicing* alternativo, micro RNAs e modificações de histonas têm sido relacionados ao desenvolvimento da AR (STRIETHOLT et al., 2008). Além disso, fatores como infecções, fumo, gravidez, hormônios sexuais e outros podem levar a autoimunidade (KOBAYASHI et al., 2008). As causas da maior incidência em mulheres não estão esclarecidas, mas há relatos associando-a com fatores hormonais (KOBAYASHI et al., 2008).

A AR é caracterizada por poliartrite periférica, simétrica (BÉRTOLO et al., 2007), com erosões ósseas e da cartilagem, com consequente deformidade e destruição da articulação em diferentes graus (BÉRTOLO et al., 2007; DOAN e MASSAROTTI, 2005; HOLMDAHL et al., 2001). A degradação da cartilagem é a principal característica da destruição articular (WOOLLEY, 1995). Esse processo está associado à formação do *pannus* (hiperplasia inflamatória da membrana sinovial) (MYERS et al., 1997; STUART; TOWNES; KANG, 1984). O *pannus* é descrito como sendo a membrana sinovial adjacente com células inflamatórias incorporadas, neovascularização e envolvimento ou não de condrócitos desdiferenciados no processo de formação (WOOLLEY, 1995).

O quadro inflamatório ocorre devido ao infiltrado de células inflamatórias nas membranas sinoviais (PANAYI, 2005) e a resposta imune contra componentes da cartilagem (geralmente colágeno tipo II) e presença de fatores reumatoides (RF) (HOLMDAHL et al., 2001).

O colágeno tipo II é possivelmente o antígeno primário na AR, por ser o principal constituinte da cartilagem, pela presença de anticorpos anticolágeno tipo II em pacientes com AR e pela semelhança entre a AR e o modelo experimental de artrite induzida por colágeno tipo II (CIA) (MACKAY e ROWLEY, 2004). Já o RF é um autoanticorpo contra a porção Fc de imunoglobulinas (Igs) do tipo G (IgG) (HIETALA et al., 2004; NAKAMURA, 2000; PANAYI, 2005), presente em cerca de 80% dos pacientes (PANAYI, 2005), mas que não é específico para AR, visto que pode ser encontrado em diversas doenças, como lupus eritematoso sistêmico e infecções virais e bacterianas, e até em indivíduos saudáveis (NAKAMURA, 2000).

O desenvolvimento e a persistência da sinovite reumatoide envolve diferentes tipos celulares, como células sinoviais, macrófagos, células dendríticas, (MÜLLER-LADNER et al., 2005), neutrófilos (WESTMAN; LUNDBERG; ERLANDSSON HARRIS, 2006) e células T e B (BRAND; KANG; ROSLONIEC, 2003). As respostas das células T e B levam ao estabelecimento da doença, e a interação entre esses dois tipos celulares induz a ativação, maturação e proliferação mútuas (TRAN; LUNDY; FOX, 2005). Além disso, a interleucina (IL)-1, IL-6 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) são as principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas na AR (DOAN e MASSAROTTI, 2005; PANAYI, 2005; TRAN; LUNDY; FOX, 2005; WEYAND e GORONZY, 1999).

As articulações não são as únicas acometidas, pois ocorre também comprometimento extra-articular, como anemia, nódulos reumatoides, doenças oculares, vasculite, síndrome de Sjögren e síndrome de Felty (MCINNES e STURROCK, 1995). E apesar dos avanços na terapêutica da AR, a expectativa de vida de pacientes ainda é cerca de 5 a 15 anos menor que a da população em geral (GABRIEL, 2008; MCINNES e STURROCK, 1995; SOKKA; ABELSON; PINCUS, 2008). Doenças cardiovasculares são, por exemplo, responsáveis pelo incremento de cerca de 1,5 vezes na mortalidade (SOKKA; ABELSON; PINCUS, 2008). Foi constatado que pacientes com AR positivos para o fator reumatoide apresentam risco 2,5 maior de ataque cardíaco que indivíduos sem AR (GABRIEL, 2008). Além disso, pacientes com AR também apresentam maior risco de comorbidades, como infecções e hipertensão (GABRIEL, 2008).

A artrite idiopática juvenil é muitas vezes confundida com a AR. A artrite idiopática juvenil é um termo utilizado para um grupo heterogêneo de doenças pediátricas que têm em

comum a artrite (SCHEPP et al., 2004; WALLACE et al., 2005). A prevalência é variável, estimada entre 16 e 150 em 100.000 crianças (RAVELLI e MARTINI, 2007), 10 em 100.000 (PRAKKEN et al., 2002), ou 20 e 150 em 100.000 (WAGNER-WEINER, 2008). Segundo a Liga Internacional de Associações para Reumatologia (International League of Associations for Rheumatology – ILAR), a artrite idiopática juvenil pode ser classificada em sete categorias de doenças de acordo com o quadro clínico (PRAKKEN et al., 2002; RAVELLI e MARTINI, 2007), e somente a poliartrite fator reumatoide positivo apresenta semelhanças consistentes com a AR de adultos (SCHEPP et al., 2004).

1.2 ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO TIPO II (CIA)

A CIA é um modelo experimental de autoimunidade induzida (BRAND; KANG; ROSLONIEC, 2003; GRIFFITHS, 1988; MYERS et al., 1997; STUART; WATSON; KANG, 1988; TRENTHAM; TOWNES; KANG, 1977) e gera uma poliartrite erosiva (CREMER; ROSLONIEC; KANG, 1998; STUART; WATSON; KANG, 1988) que se assemelha à AR (CREMER; ROSLONIEC; KANG, 1998; HIETALA et al., 2004; MYERS et al., 1997; TRENTHAM; TOWNES; KANG, 1977). As principais características comuns entre esse modelo e a AR são sinovite, formação progressiva de *pannus*, erosão marginal do osso e destruição da cartilagem (MYERS et al., 1997; STUART; TOWNES; KANG, 1984).

O colágeno tipo II é considerado um antígeno em potencial na AR por ser um dos componentes mais abundantes da cartilagem articular (BRAND; KANG; ROSLONIEC, 2003). Anticorpos anticolágeno tipo II têm sido identificados no líquido sinovial (CREMER; ROSLONIEC; KANG, 1998; HIETALA et al., 2004), na cartilagem e em células B presentes na membrana sinovial de pacientes artríticos (CREMER; ROSLONIEC; KANG, 1998). Além disso, a transferência de anticorpos contra o colágeno tipo II é capaz de induzir artrite, pois estes anticorpos se ligam à cartilagem normal e ativam o sistema complemento (HIETALA et al., 2004).

Os sintomas da CIA se iniciam, em média, no 21º dia após injeção do colágeno tipo II (TRENTHAM; TOWNES; KANG, 1977). Segundo Stuart, Townes e Kang (1984), a lesão inicial observável é a deposição de fibrina na membrana sinovial no 5º dia após a imunização. No 12º dia observa-se intensa deposição de fibrina e hiperplasia do tecido e no 19º dia começa a infiltração de células mononucleares e polimorfonucleares.

A CIA envolve a ativação de linfócitos T e B autorreativos e antígeno-específicos (HOLMDAHL et al., 2001), tendo início com a ligação de anticorpos à superfície da cartilagem, mediante sistema complemento (CREMER; ROSLONIEC; KANG, 1998; HOLMDAHL et al., 2001; MYERS et al., 1997; STUART; WATSON; KANG, 1988). Ocorre, também, a formação de imunocomplexos que levam à infiltração de neutrófilos e, conseqüentemente, à artrite edematosa severa (HOLMDAHL et al., 2001). A inflamação ocorre tão rapidamente que em poucos dias há a destruição da cartilagem e erosão marginal do osso (STUART; WATSON; KANG, 1988).

No compartimento sinovial, as células T autorreativas são ativadas por células dendríticas e outras células apresentadoras de antígenos (APCs). Então, as células T proliferam e auxiliam as células B autorreativas, ou causam dano tecidual direto (BLÄSS; ENGEL; BURMESTER, 2001).

Os processos envolvendo citocinas, destruição tecidual e células T autorreativas são suficientes para manter a AR (BLÄSS; ENGEL; BURMESTER, 2001). As citocinas derivadas de células T promovem diferenciação e ativação de macrófagos, fibroblastos e osteoclastos, bem como formação de *pannus* altamente vascularizado, o que leva a um processo agressivo de erosão subcondral (HOLMDAHL et al., 2001). Os anticorpos também são importantes na geração da CIA (WOOLEY e CHAPEDELAINE, 1987).

1.3 TRATAMENTO CONVENCIONAL DA AR

Drogas modificadoras do curso da doença (DMARD) retardam os danos causados pela artrite ao modificarem a resposta imune e/ou bloquearem o efeito de citocinas pró-inflamatórias e/ou atuarem sobre células imunes, como células B, ou na interação entre células T e APCs (FAN e LEONG, 2007).

O metotrexato (MTX) é a DMARD mais utilizada para o tratamento da AR. Existem muitos mecanismos propostos para explicar os efeitos do MTX, mas ainda não se sabe como este fármaco modula a inflamação na AR (ŚWIERKOT e SZECHIŃSKI, 2006; WESSELS; HUIZINGA; GUCHELAAR, 2008).

O MTX é um análogo (CUTOLO et al., 2001; ŚWIERKOT e SZECHIŃSKI, 2006) e antagonista do folato (ŚWIERKOT e SZECHIŃSKI, 2006; TIAN e CRONSTEIN, 2007; WESSELS; HUIZINGA; GUCHELAAR, 2008). O folato, também conhecido como ácido

fólico ou ácido pteroilglutâmico, é reduzido a dihidrofolato e este a tetrahydrofolato pela ação da enzima dihidrofolato redutase (RANG et al., 2007). O tetrahydrofolato e poliglutamatos (produtos do metabolismo do MTX e do folato) estão envolvidos no metabolismo de purinas (CUTOLO et al., 2001). O MTX se liga ao dihidrofolato redutase com grande afinidade e os poliglutamatos se ligam tanto ao dihidrofolato redutase quanto às enzimas timidilato sintetase e 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo transformilase (AICAR) (CUTOLO et al., 2001; WESSELS; HUIZINGA; GUCHELAAR, 2008), inibindo a síntese de timidilato e de ácido inosínico, respectivamente (ŚWIERKOT e SZECHÍŃSKI, 2006). Consequentemente, o MTX interrompe a síntese de DNA e RNA e a proliferação celular (CUTOLO et al., 2001; ŚWIERKOT e SZECHÍŃSKI, 2006; WESSELS; HUIZINGA; GUCHELAAR, 2008).

Com o decréscimo da síntese de DNA e do metabolismo de purinas ocorre o aumento da liberação de adenosina no sangue. Em baixas concentrações de MTX, a adenosina extracelular atua preferencialmente por meio de receptores A_2 (CUTOLO et al., 2001; ŚWIERKOT e SZECHÍŃSKI, 2006; TIAN e CRONSTEIN, 2007). A ligação entre a adenosina e receptores A_2 causa aumento de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), inibição de proliferação de linfócitos e de secreção de TNF- α , IL-8 e IL-12. Além disso, o AMPC também causa imunossupressão por inibir a fagocitose, secreção de TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6 e IL-12 (CUTOLO et al., 2001; ŚWIERKOT e SZECHÍŃSKI, 2006). Ainda, a adenosina, via receptor A_2 , causa aumento de IL-10 (CUTOLO et al., 2001).

De acordo com a bula do medicamento Miantrex (2005), o MTX é citotóxico e apesar da ocorrência de efeitos tóxicos relacionar-se, em termos, com a dose e/ou frequência da administração, a toxicidade pode ocorrer em todas as doses. Em ratos, a DL50 intraperitoneal é de 6-25mg/kg de massa corporal e os principais alvos do MTX são o sistema hemolinfopoiético, trato gastrointestinal, pulmões, fígado, rins, testículos e pele (MIANTREX, 2005). Pacientes que utilizam MTX são propensos a abandonar o tratamento mais devido aos efeitos adversos que por falta de eficiência (TIAN e CRONSTEIN, 2007). Porém, a descontinuidade do tratamento com o MTX leva a uma rápida remissão clínica e aumento da gravidade da doença (ŚWIERKOT e SZECHÍŃSKI, 2006). Os efeitos adversos de baixas dosagens de MTX são leves, mas há exceções. Sintomas como anemia, neutropenia, estomatite e úlcera oral podem ocorrer pelo antagonismo ao folato, mas a suplementação de folato de modo geral ameniza esses sintomas (TIAN e CRONSTEIN, 2007). Quando o MTX não é suficientemente eficiente, agentes biológicos são utilizados para o tratamento, como bloqueadores de TNF- α , depletores de células B ou moduladores da coestimulação (BÉRTOLO et al., 2007). Porém, a imunossupressão causada por esses agentes aumenta a

probabilidade de infecções como a tuberculose (BÉRTOLO et al., 2007). Quando comparado com outros DMARDs, o MTX apresenta um perfil relativamente seguro (TIAN e CRONSTEIN, 2007).

Conforme Świerkot e Szechiński (2006), apesar dos agentes biológicos apresentarem maior eficiência em pacientes com artrite severa, os melhores resultados são obtidos em combinações de MTX e agente biológico, e estima-se que o MTX é a DMARD utilizada pela maioria dos pacientes. Uma triagem com 686 pacientes com AR avaliou os efeitos do monoterapêutico com etanercepte (receptor solúvel do TNF- α) e do MTX e da combinação de ambos os medicamentos, revelando menor destruição das articulações com a administração concomitante de MTX e etanercepte (KLARESKOG et al., 2004). Maini et al. (1998) realizaram um estudo com 101 pacientes com AR e constataram que a utilização de infliximabe (anticorpo quimérico contra o TNF- α) juntamente com o MTX promove melhora clínica superior a observada quando da administração isolada de infliximabe ou MTX. Assim, considerando o estado de conhecimento atual, parece ser oportuno e adequado que qualquer novo agente potencialmente antirreumático seja avaliado comparativamente ao MTX (ŚWIERKOT e SZECHIŃSKI, 2006).

1.4 TERAPIA COM VENENO DE ABELHA (BV)

A terapia com BV é utilizada, na acupuntura, para diminuir a dor e tratar doenças inflamatórias, como a AR (BAEK et al., 2006; KWON et al., 2002; LEE et al., 2001). Em modelos experimentais de artrite induzida por adjuvante, modelo experimental no qual *Micobacterium* mortos e suspensos em óleo mineral são utilizados para induzir artrite, o BV administrado no coxim plantar causa significativa diminuição do edema e da formação osteofítica (PARK et al., 2004). Ao BV vêm sendo atribuídos efeitos antiartríticos, não apenas quando utilizado na acupuntura (KWON et al., 2001), mas também quando inoculado pela via subcutânea (sc) no coxim plantar (LEE et al., 2001). Apesar deste relato sobre o efeito antiartrítico do BV na via sc, Kwon et al. (2001) estudaram os efeitos do BV bruto administrado em um acuponto e em pontos não relacionados a acupuntura e verificaram que quando o veneno é administrado em acuponto o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo é mais intenso do que quando administrado em pontos não relacionados a acupuntura.

O BV contém diversas substâncias como adolapina, peptídeo degranulador de mastócitos, melitina, apamina e fosfolipase A₂ (PLA₂) (JANG et al., 2005; LEE et al., 2001; PARK et al., 2004; STUHLMEIER, 2007). A dor local e a inflamação causadas por picadas de abelhas têm sido atribuídas a melitina e a PLA₂. Porém, segundo Saini, Peterson e Chopra (1997), nos casos em que a melitina do BV é descrita como inflamatória e nociceptiva, provavelmente há contaminação com a PLA₂.

A PLA₂ é uma enzima superexpressa em diversas doenças inflamatórias e degrada fosfolípidios de membrana e libera ácido araquidônico (substrato essencial para a formação de eicosanoides pró-inflamatórios), podendo levar a perda tecidual e de integridade e função do órgão atingido (LEE et al., 2001).

A melitina é o principal componente do BV (50% do peso seco), sendo conhecida por inibir *in vitro* a atividade enzimática da PLA₂ do BV, bem como do líquido sinovial de pacientes com AR (SAINI; PETERSON; CHOPRA, 1997), porque forma o complexo melitina-PLA₂ (LEE et al., 2001). A inibição da PLA₂ por este peptídeo é o mecanismo correntemente proposto para explicar os efeitos do BV (JANG et al., 2005; LEE et al., 2001; SAINI; PETERSON; CHOPRA, 1997). Além de bloquear a liberação de ácido araquidônico pela PLA₂, a melitina também bloqueia a produção de superóxido por neutrófilos e produz resistência à lise, mediada por complemento, em células leucêmicas humanas (LEE et al., 2001). A melitina induz apoptose de fibroblastos sinoviais por diminuir a expressão de BCL₂ (proteína antiapoptótica) e aumentar a expressão de BAX e CASP3 (proteínas pró-apoptóticas), diminuindo a proliferação de fibroblastos sinoviais em pacientes com AR (HONG et al., 2005). A atividade anti-inflamatória do BV e da melitina também vem sendo relacionada com a inibição de óxido nítrico (NO) e IL-6 (KWON et al., 2002).

O peptídeo degranulador de mastócitos e o peptídeo adolapina apresentam efeito anti-inflamatório, porém estão presentes em pequenas quantidades no BV (JANG et al., 2005; LEE et al., 2001), correspondendo a cerca de 1-3% e 0,1-0,8% do peso seco do veneno, respectivamente (STUHLMEIER, 2007). O peptídeo degranulador de mastócitos apresenta atividade neurotóxica, tendo sido relatado efeito convulsionante (STRONG e WADSWORTH, 2000).

Alguns dados contraditórios sobre os mecanismos anti-inflamatórios do tratamento com BV são descritos na literatura. Segundo Park et al. (2004), os efeitos benéficos do BV total e da melitina na inflamação ocorrem pela inibição da transcrição do fator de ativação nuclear κ B (NF κ B). No entanto, de acordo com Stuhlmeier (2007), a melitina induz a disruptura da membrana celular, por atuar como detergente e, além disso, tanto o BV quanto a melitina não

apresentam efeito inibitório sobre a IL-1 β ou o TNF- α induzidos pela ativação do NF κ B. O NF κ B é um fator de transcrição de grande importância na inflamação, pois sua ativação leva a superexpressão de genes pró-inflamatórios, ciclooxigenase (COX) -2, PLA₂ citosólica, NO sintetase indutível (iNOS) e TNF- α (PARK et al., 2004; STUHLMEIER, 2007). As vias de sinalização do NF κ B estão frequentemente alteradas em doenças autoimunes. Estímulos ambientais podem levar à ruptura da tolerância periférica e ao início da autoimunidade via NF κ B (KURYŁOWICZ e NAUMAN, 2008).

1.5 ATIVIDADES PEPTIDÁSICAS

A alteração da atividade de enzimas envolvidas no remodelamento do tecido normal (principalmente metaloproteases, collagenase e elastase) é responsável pela destruição da cartilagem e erosão óssea relacionadas às doenças degenerativas, como a AR (MANTLE; FALKOUS; WALKER, 1999). A suscetibilidade e curso dessa doença também poderiam estar associados a alterações de aminopeptidases, como neutra (APN), básica (APB) e dipeptidil peptidase 4 (DPP4), e endopeptidases, como a prolil oligopeptidase (POP). Como descrito a seguir, estas enzimas têm importante papel em processos imunológicos. Várias enzimas da classe de aminopeptidases aparentemente compartilham especificidades de hidrólise muito similares. Daí decorre a conveniência de abordá-las conjuntamente nas primeiras etapas de um estudo prospectivo que pretenda avaliá-las quanto ao envolvimento em processos fisiopatológicos.

A APN (EC 3.4.11.2) (BAUVOIS e DAUZONNE, 2006) é uma metaloproteinase idêntica à proteína CD13. Está presente em diversos tipos celulares, como monócitos/macrófagos, fibroblastos, neutrófilos, células endoteliais e epiteliais (BAUVOIS e DAUZONNE, 2006; LUAN e XU, 2007; OLIVO; TEIXEIRA; SILVEIRA, 2005; RIEMANN et al., 1997; SHIMIZU et al., 2002). O aumento da expressão de APN/CD13 em linfócitos T ou neutrófilos ocorre em diversas doenças inflamatórias, como AR, lupus eritematoso sistêmico, sarcoidose pulmonar e outras (BAUVOIS e DAUZONNE, 2006). Esta peptidase apresenta atividade quimiotática para linfócitos T (SHIMIZU et al., 2002) e está envolvida no processamento de peptídeos pelas APCs (LUAN e XU, 2007; RIEMANN et al., 1997) e no processamento de peptídeos para a apresentação de antígenos por MHC I (HATTORI e TSUJIMOTO, 2004), na adesão e migração celular (RIEMANN et al., 1997), degradação da

matriz extracelular em invasões tumorais (BAUVOIS e DAUZONNE, 2006; SHIMIZU et al., 2002), tumorigênese, dor, proliferação celular (LUAN e XU, 2007), angiogênese (BAUVOIS e DAUZONNE, 2006; LUAN e XU, 2007; SATO, 2004), e clivagem de angiotensina (Ang) III em Ang IV (RUIZ-ORTEGA; ESTEBAN; EGIDO, 2007). A Ang IV é capaz de ativar o NF κ B (RUIZ-ORTEGA; ESTEBAN; EGIDO, 2007), um importante fator na regulação da resposta celular fisiológica e patológica relacionado à gênese de diversas doenças inflamatórias (PASPARAKIS, 2009). A APN está presente na superfície de sinoviócitos e monócitos de pacientes com AR e pode estar envolvida na síntese de IL-6, pois cliva peptídeos solúveis envolvidos na cascata inflamatória, ou interage com proteínas de membranas de células envolvidas. A superexpressão da atividade APN foi descrita em células T de pacientes com AR (BAUVOIS e DAUZONNE, 2006; CHOMARAT et al., 1995) e em macrófagos elicitados (OLIVO; TEIXEIRA; SILVEIRA, 2005).

A APB (EC 3.4.11.6) é uma enzima citosólica. Sua atividade tem sido descrita em membrana celular de células T leucêmicas e normais. No entanto, não há descrição de domínios transmembrânicos na sua estrutura e uma hipótese é que interaja com um receptor de membrana (FOULON; CADEL; COHEN, 1999). A APB também exibe atividade de leucotrieno A₄ (LTA₄) hidrolase (EC 3.3.2.6), importante enzima da via do ácido araquidônico que hidrolisa o LTA₄, transformando-o em leucotrieno B₄ (LTB₄). Por isso, a APB é considerada como enzima bifuncional (FOULON; CADEL; COHEN, 1999; PENNING et al., 2002). O LTB₄ é um potente mediador pró-inflamatório sintetizado por células imunes, como eosinófilos, neutrófilos e macrófagos, o qual estimula a produção de várias citocinas (PENNING et al., 2002), age como um potente quimiotático para polimorfonucleares (HAEGGSTRÖM, 2000) e promove degranulação, aumento da liberação de enzimas lisossômicas e produção de superóxidos por neutrófilos (FORD-HUTCHINSON, 1990; SAMUELSSON et al., 1987). A atividade de APB foi detectada em fração solúvel de macrófagos, estando aumentada em macrófagos elicitados (OLIVO; TEIXEIRA; SILVEIRA, 2005). Assim como a APN, a atividade APB está presente no proteossoma, podendo estar relacionada com o processamento antigênico para apresentação de antígenos pelo MHC I (HATTORI e TSUJIMOTO, 2004) e é capaz de transformar a Ang III em Ang IV (RUIZ-ORTEGA; ESTEBAN; EGIDO, 2007).

A DPP4 (EC 3.4.14.5) ou CD26 é composta por um pequeno domínio citoplasmático, região transmembrânica e um domínio extracelular que apresenta atividade DPP4 (OHNUMA et al., 2006). É uma proteína multifuncional e suas diferentes funções dependem do tipo celular no qual é expresso, localização intra ou extracelular e concentrações do ligante,

cofator ou produto (BOONACKER e VAN NOORDEN, 2003). A DPP4 atua como serino protease, receptor, proteína coestimulatória, molécula de adesão para o colágeno e fibronectina e está envolvida na apoptose (BOONACKER e VAN NOORDEN, 2003). A DPP4 é reconhecida como um marcador da ativação de células T, células natural killer (NK) e células B (BOONACKER e VAN NOORDEN, 2003; OHNUMA et al., 2006; SEDO et al., 2005). A DPP4 auxilia a regulação do desenvolvimento, maturação e migração de linfócitos T CD4+, secreção de citocinas e produção de anticorpos dependentes de células T. Como marcador da ativação de células T, a DPP4 também está associada a processos de transdução de sinal de células T, como molécula coestimuladora. A atividade enzimática da CD26 parece ter grande importância no aumento da resposta celular (OHNUMA et al., 2006). Segundo Iwata et al. (1999), a DPP4 é um dos principais mediadores da RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted) *in vivo*, e a clivagem desta citocina aumenta o efeito indutor da migração leucocitária. A atividade DPP4 pode estar relacionada a proteases homólogas como a DPP2 ou a proteína ativadora de fibroblastos (FAP) (BOONACKER e VAN NOORDEN, 2003; CORDERO; SALGADO; NOGUEIRA, 2009), DPP8 e DPP9 (GORRELL, 2005; PITMAN et al., 2009; SEDO et al., 2005).

A POP (EC 3.4.21.26) é uma endopeptidase envolvida no catabolismo de vasopressina e hormônio liberador de hormônio luteinizante (BARRETT; RAWLINGS; WOESSNER, 1998). Alterações dos níveis da POP têm sido associadas a desordens neurodegenerativas (CUNNINGHAM e O'CONNOR, 1997). Na depressão severa está relacionada à ativação de células do sistema imune, autoimunidade e resposta inflamatória (CUNNINGHAM e O'CONNOR, 1997). Além disso, esta endopeptidase vem sendo descrita em doenças autoimunes, como lupus eritematoso sistêmico e AR (CUNNINGHAM e O'CONNOR, 1997) e, ainda, no diabetes melito induzido por estreptozotocina (ZAMBOTTI-VILLELA et al., 2007). Sua atividade foi detectada em fração solúvel de macrófagos, estando aumentada em macrófagos elicitados (OLIVO; TEIXEIRA; SILVEIRA, 2005).

Devido ao envolvimento de aminopeptidases em diversos processos patológicos, como descrito anteriormente, há uma intensa busca por inibidores para essas enzimas. Inibidores da DPP4, como a sitagliptina, já são amplamente utilizados na prática clínica para o tratamento da diabetes melito tipo II (NEUMILLER; WOOD; CAMPBELL, 2010). O CHR-2797 (Tosedostat) é um inibidor não seletivo de aminopeptidases que está sendo utilizado em estudos clínicos em pacientes com leucemia mielóide e em mielodisplasia (LÖWENBERG et al., 2010). Ansorge et al. (2010) descrevem que o IP10.C8 é um inibidor dual para a APN e peptidases com atividade DPP4 que já está em estudo clínico em pacientes com doenças

inflamatórias de pele. Além disso, os inibidores duais têm um amplo potencial para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como doenças autoimunes (ANSORGE et al., 2010; REINHOLD et al., 2007). A utilização de inibidores duais para a APN e DPP4 causa supressão da síntese de DNA, da produção de citocinas por linfócitos T (REINHOLD et al., 2007), e de linfócitos T auxiliares, e aumenta a atividade de células T regulatórias (BANK et al., 2006). Os inibidores duais apresentam efeitos amplificados quando comparados com os efeitos de inibidores individuais para DPP4 ou para APN (REINHOLD et al., 2007).

2 OBJETIVOS

Contribuir com o conhecimento da etiologia e com a prospecção de novos marcadores e alternativas terapêuticas para a AR, avaliando (i) a formação de edema, a algesia, a evolução da massa corporal, o título de anticorpos anticolágeno tipo II e o teor de TNF- α (marcadores moleculares) circulantes e os níveis de atividades APN, APB, DPP4 e POP no líquido e membrana sinoviais da articulação fêmuro-tíbio-patelar (joelho), bem como no plasma e em leucócitos (células mononucleares e polimorfonucleares) circulantes, em ratos submetidos à indução de artrite por colágeno tipo II; e (ii) se as eventuais alterações destes parâmetros, em ratos submetidos à indução e que desenvolveram artrite, seriam amenizadas por tratamentos com veneno de *Apis mellifera* e/ou com MTX (agente terapêutico de uso corrente na AR).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E TRATAMENTOS

Ratos (machos) Wistar, massa corporal entre 150-160g, foram mantidos em caixas de polietileno (tamanho interno comprimento x largura x altura de 56 x 35 x 19cm), com comida e água *ad libitum* em estante ventilada (Alesco Ind. Com. Ltda, Brasil), climatizada a 25 °C, umidade relativa 65,3±0.9% e fotoperíodo de 12h:12h claro:escuro (com início do período claro as 6:00 da manhã). Os animais foram anestesiados com solução de cetamina (Cetamin, Syntec, Brasil) (3,75%) e xilazina (Calmiun, Agener União, Brasil) (0,5%) em dose de 0,2mL/100g de massa corporal, via intraperitoneal (ip) e, então, submetidos à indução de artrite pela administração de colágeno tipo II de galinha dissolvido em 0,01M ácido acético e emulsificado em mesmo volume de adjuvante incompleto de Freund (preparados no momento do uso a 4 °C), em dose única de 0,4mg/0,2mL/animal, via intradérmica (id), no primeiro terço proximal da base da cauda (INDUZIDOS), ou com salina 0,9% (no mesmo esquema de administração do colágeno tipo II) (SIMULADOS). No 21º dia após estes tratamentos foram iniciadas as terapias, com BV e/ou com MTX nos animais induzidos que desenvolveram artrite e nos controles, até o 40º dia, três vezes por semana. Deste modo, foram formados os seguintes grupos experimentais:

INDUZIDOS:

- que desenvolveram artrite. Utilizou-se a presença de edema para separar os animais que desenvolveram artrite de animais que não desenvolveram a artrite. O edema das patas é a principal característica da artrite induzida, sendo utilizado como parâmetro de avaliação da presença de artrite em diversos outros estudos (CUZZOCREA et al., 2005; TRENTAM; TOWNES; KANG, 1977; WESTMAN; LUNDBERG; ERLANDSSON HARRIS, 2006). Esses animais foram subdivididos em:
 - ARTRÍTICO (grupo artrítico sem tratamento posterior);
 - ARTRÍTICO+BV, administrados com BV, na dose de 0,25mg/kg massa corporal (BAEK et al., 2006; ROH et al., 2004), em volume máximo de 50µL sc no dorso (grupo artrítico tratado com BV);

- ARTRÍTICO+MTX, administrados com MTX, na dose de 0,3mg/kg massa corporal (MIRSHAFIEY et al., 2006), volume de 100µL/100g massa corporal ip (grupo artrítico tratado com MTX);
- ARTRÍTICO+Bv+MTX, administrados com BV sc e MTX ip, no mesmo esquema dos grupos ARTRÍTICO+Bv e ARTRÍTICO+MTX (grupo artrítico com tratamento combinado BV+MTX);
- que não desenvolveram artrite, animais cujo diâmetro da pata posterior não apresentou diferença estatística com relação ao controle, constituindo o grupo:
 - RESISTENTE;

SIMULADOS, subdivididos em:

- CONTROLE (grupo simulado sem tratamento posterior);
- CONTROLE+Bv (grupo simulado tratado com BV), administrado como o grupo CONTROLE e recebendo, também, BV sc (idem aos ARTRÍTICOS+Bv);
- CONTROLE+MTX (grupo simulado tratado com MTX), administrado como o grupo CONTROLE e recebendo, também, MTX ip (idem aos ARTRÍTICOS+MTX);
- CONTROLE+Bv+MTX (grupo simulado tratado com BV e MTX), administrado como o grupo CONTROLE e recebendo, também, BV sc e MTX ip, em esquemas idênticos aos dois últimos grupos supracitados.

O BV (lote 092K 0693 Sigma) foi dissolvido em NaCl 0,9% a 4 °C .

O MTX (25mg/mL) (Miantrex, PFIZER) foi diluído em NaCl 0,9% a temperatura ambiente.

Para selecionar o esquema de indução de artrite adotado (colágeno tipo II de galinha dissolvido em 0,01M ácido acético e emulsificado em mesmo volume de adjuvante incompleto de Freund em dose única de 0,4mg/0,2mL/animal, via id, no primeiro terço proximal da base da cauda) como o mais conveniente ao estudo (aquele que causa maior incidência de edema, em ratos, em um período de até 30 dias), foram realizados ensaios pilotos de outros esquemas de administração da mesma emulsão, quais sejam: (i) Trentham, Townes e Kang (1977) (dose de 0,5mg/mL/animal, via id na região dorsal); (ii) Izal et al. (2008) (0,5mg/0,5mL/animal, via sc na região dorsal, com reforço de mesma dose após 7 dias); (iii) Cuzzocrea et al. (2005) (dose de 0,2mg/0,1mL/animal, via id na base da cauda, com reforço de mesma dose após 21 dias); (iv) Cremer (1988) (i) 0,2mg/0,2mL/ animal, via id no coxim plantar, com reforço de mesma dose após 7 dias, (ii) 0,4mg/0,2mL/animal, via sc

em dose única em dois locais do primeiro terço proximal da base da cauda e (iii) 0,4mg/0,2mL/animal, via id em dose única no primeiro terço proximal da base da cauda.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) (protocolo 432/07) e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2 COLETA DE MATERIAL

No 41º dia após a indução ou tratamento simulado, os animais foram anestesiados sob o mesmo esquema especificado no item 3.1. Então, foi feita a medida da espessura das patas e da massa corporal dos animais. Em seguida, cerca de 2mL de sangue foi coletado do ventrículo esquerdo com seringa sem heparina e 3mL com seringa heparinizada. O sangue sem heparina permaneceu por 45min a 37 °C e foi centrifugado a 200xg por 10min, para a obtenção do soro (sobrenadante). O sangue com heparina foi centrifugado a 200xg por 10min a temperatura ambiente para obtenção de plasma (sobrenadante), sendo o pellet destinado para a separação de células mononucleares. O líquido e a membrana sinoviais foram retirados de ambos os joelhos (articulações fêmuro-tíbio-patelares). A retirada do líquido sinovial foi realizada por lavagem com 200µL de NaCl 0,9%, do seguinte modo: o NaCl 0,9% foi injetado intraarticularmente em cada joelho e aspirado com seringa e, após essa lavagem, são excisados a membrana sinovial e juntamente o tecido conjuntivo da cápsula articular.

3.3 RECONHECIMENTO E AVALIAÇÃO DOS SINAIS CARACTERÍSTICOS DA ARTRITE

3.3.1 Medida da massa corporal

A massa corporal foi avaliada em animais de todos os grupos estudados.

3.3.2 Avaliação do diâmetro das patas

A quantificação do edema foi realizada pela medida do diâmetro dorso-plantar das patas posteriores na região do metatarso, com um micrômetro (Mitutoyo). Ambas as patas foram medidas e calculou-se a média do diâmetro para cada animal. Os animais artríticos não tratados foram considerados como 100% e os resultados dos grupos de animais artríticos tratados com BV, MTX e BV e MTX foram expressos como porcentagem relativa.

3.3.3 Marcadores moleculares

O anticorpo anticolágeno tipo II foi mensurado no plasma de animais de todos os grupos com kit de ensaio imunoenzimático (ELISA) (Chondrex), de acordo com as recomendações do fabricante.

A IL-6 foi avaliada no plasma de animais de todos os grupos com kit de ELISA (Biosource), de acordo com as recomendações do fabricante.

O TNF- α foi mensurado no plasma e soro de animais de todos os grupos com o kit de ELISA (Biosource), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.3.4 Hiperalgisia

O limiar mecânico de hiperalgisia foi avaliado com analgesímetro digital (Von Frey, Insight), como descrito por Guerrero et al. (2006), e os resultados foram expressos em gramas (g). Os animais foram mantidos individualmente em caixas de acrílico com assoalho de grade metálica, por 15 a 30min, em uma sala sem ruídos, para a adaptação ao ambiente. Então, com o sensor do analgesímetro, foi aplicada uma força perpendicular crescente no centro da superfície plantar de uma das patas posteriores, induzindo a flexão dorsal da articulação tibiotalar, até a retirada da pata. O teste foi repetido até a obtenção de três medidas das quais a variação máxima foi menor do que 2g.

3.4 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS LEUCOCITÁRIAS DO SANGUE

3.4.1 Separação de células mononucleares

Utilizou-se o método de Maldonado e Curi (2005) com modificações, o pellet resultante da centrifugação (200xg por 10min a temperatura ambiente) de 3mL de sangue heparinizado foi diluído em mesmo volume com NaCl 0,9% e cuidadosamente depositado sobre 3mL de Percoll ($\rho=1,077\text{mg/mL}$) (GE – Healthcare) e centrifugado a 200xg por 20min a temperatura ambiente. As células mononucleares foram retiradas do tubo e lavadas duas vezes com 1mL de NaCl 0,9%, por 10min a 200xg em temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em 0,5mL de NaCl 0,9% para a realização da contagem.

3.4.2 Hemólise

A hemólise do sangue total foi realizada para a obtenção de leucócitos periféricos totais e separação das células mononucleares e polimorfonucleares. O procedimento foi realizado de acordo com Kataranovski et al. (2001), utilizando tampão de hemólise contendo 155mM de cloreto de amônio, 10mM bicarbonato de potássio, 0,1mM EDTA, pH 7,4 e centrifugação, conforme segue. As células foram lavadas duas vezes com 1mL de NaCl 0,9% a 200xg por 5 min. Então, as células foram ressuspensas e depositadas sobre Percoll ($\rho=1,077\text{mg/mL}$) e centrifugadas a 200xg por 20min, como no procedimento para a separação de mononucleares descrito anteriormente.

3.5 CONTAGEM DE CÉLULAS

A quantificação do número total de leucócitos mononucleares foi realizada em alíquotas de 20 μL de suspensão de células diluídas em líquido de Turk (1:20, v/v) e contadas em câmara de Neubauer, ao microscópio óptico, para posterior utilização de células nos demais experimentos.

3.6 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada utilizando 40 μL de suspensão de células diluídas em tripan (v/v) e contadas em câmara de Neubauer, ao microscópio óptico.

3.7 INCUBAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES COM BV E MTX

As células mononucleares dos animais controles e artríticos sem tratamento (5×10^5 células/mL) foram incubadas com BV ou MTX em concentrações de 5µg/mL, 0,5µg/mL e 0,05µg/mL ou salina 0,9% em meio RPMI 1640 (Cultilab, Brasil) acrescido de soro bovino fetal (10%) por 1h, a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram separadas do sobrenadante da incubação por meio de centrifugação a 200xg por 10min, o sobrenadante foi desprezado, e as células foram lavadas duas vezes em salina utilizando a mesma centrifugação. Em seguida, as células foram ressuspensas em salina 0,9% para a contagem celular e avaliação da viabilidade celular. As células incubadas com salina 0,9% e BV ou MTX em concentração de 0,05µg/mL foram aliqüotadas para a separação das frações FS e FM para a medida das atividades peptidásicas APN, APB e DPP4. Os resultados foram expressados como porcentagem relativa à amostra incubada apenas com salina 0,9%.

3.8 EFEITOS DIRETOS DO BV E DO MTX SOBRE ATIVIDADES AMINOPEPTIDÁSICAS DO PLASMA

Os efeitos diretos do BV e do MTX sobre as atividades APN, APB e DPP4 foram avaliados em amostras de plasma de animais controles normais incubadas com BV ou MTX, ambos nas concentrações de 50µg, 500µg ou 5000µg por mL, por 20min a 37 °C. Após a incubação, a medida das atividades foi realizada conforme o item 4.9. Considerou-se as atividades das amostras sem BV ou MTX como 100%. As atividades das amostras incubadas com BV ou MTX foram calculadas como porcentagem de atividade enzimática relativa a amostras não incubadas com esses agentes.

3.9 PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL (FS) E FRAÇÃO DE MEMBRANA SOLUBILIZADA (FM) DA MEMBRANA SINOVIAL E DE CÉLULAS MONONUCLEARES

As membranas sinoviais dos joelhos de um mesmo animal foram homogeneizadas em tampão 10mM Tris-HCl, pH 7,4, (0,1g de tecido/3mL), por 3min a 15.000rpm (Polytron-Aggregate, Kinematica) e ultracentrifugadas a 100.000xg por 35min (Hitachi modelo HIMAC

CP60E). O sobrenadante corresponde a FS. Os pellets foram lavados duas vezes com o mesmo tampão (ultracentrifugação a 100.000xg por 35min), homogeneizados por 3min a 800rpm (homogeneizador Tecnal TE 099), em mesmo volume de tampão 10mM Tris-HCl, pH 7,4, acrescido de Triton X-100 (0,1%). Em seguida, os homogenatos foram ultracentrifugados a 100.000xg por 35min. Os sobrenadantes resultantes dessa ultracentrifugação correspondem a FM.

As células mononucleares incubadas ou não ($3,0 \times 10^6$ células/mL) foram sonicadas em tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,4, a uma amplitude de 40 por 10s e ultracentrifugadas, conforme descrito no parágrafo anterior, para a obtenção de FS e FM.

Os procedimentos foram realizados a 4 °C. As FS e FM foram utilizadas para determinar as atividades enzimáticas e teor de proteína.

3.10 MEDIDA DE PROTEÍNA TOTAL

Foi medida pelo método de Bradford (1976) com o kit Bio-Rad (Hercules, USA), utilizando triplicatas de 40μL de amostras de líquido sinovial e FS (diluída 10 vezes) e FM (diluída duas vezes) de membrana sinovial e de mononucleares, e plasma (diluído 500 vezes), lidas a 630nm em espectrofotômetro leitor de microplaca Bio-Tek Power Wave X® (Bio-Tek Instruments, EUA). O conteúdo da proteína foi extrapolado pela comparação com as respectivas curvas-padrão obtidas com albumina de soro bovino (BSA) dissolvida no mesmo diluente da amostra.

3.11 MEDIDA DE DESIDROGENASE LÁCTICA (LDH)

A medida de LDH foi realizada de acordo com o método de Bergmeyer e Brent (1972). Utilizou-se triplicatas de 3μL de amostras de FS e FM de membrana sinovial e de mononucleares incubados com 297μL de tampão 100mM de fosfato, pH 7,4, contendo 200mM de NaCl e 1,6mM de solução de piruvato de sódio e 0,2mM de sal dissódico de nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (NADH). As leituras foram realizadas espectrofotometricamente a 340nm em leitor de microplaca Bio-Tek Power Wave X®, a primeira no tempo zero e a segunda após 10min de incubação a 37 °C. A atividade LDH foi

determinada subtraindo-se o valor da leitura, após 10min de incubação, do obtido no tempo zero e, então, o resultado foi extrapolado por comparação com uma curva-padrão de NADH. A atividade LDH foi expressa como mmol NADH oxidado/min/mg proteína.

3.12 ATIVIDADES PEPTIDÁSICAS

Foram mensuradas no plasma e nas FS e FM da membrana sinovial e de células mononucleares, bem como no líquido sinovial não processado. As amostras foram incubadas a 37 °C, por 30min, num volume final de 300µL, em microplacas de 96 poços (Corning Inc., EUA), com solução pré-aquecida de substratos diluídos a 0,5mM (APB), 0,2mM (DPP4), ou 0,125mM (APN e POP) em seus respectivos tampões 0,05M contendo 0,1mg/mL de BSA. A quantidade de β -naftilamina (APB, APN e POP) ou 4-metoxi- β -naftilamina (DPP4) liberada na reação foi estimada fluorimetricamente, utilizando leitor de microplaca (FL600FA, Bio-Tek), no comprimento de onda de emissão de 460/40nm e comprimento de onda de excitação de 360/40nm. Os valores da leitura do “branco” do tempo zero de incubação foram subtraídos dos valores do incubado de 30min e o resultado foi extrapolado por comparação com as respectivas curvas-padrão (β -naftilamina ou 4-metoxi- β -naftilamina dissolvidas na mesma solução utilizada na incubação). As atividades foram expressas como picomoles de substrato hidrolisado/min/mg proteína.

A atividade APN foi medida utilizando 10µL de FS de membrana sinovial contendo de 1,3 a 7,7µg de proteína; 25µL de FM de membrana sinovial contendo de 2,6 a 15µg de proteína; 50µL de FS de mononucleares contendo de 22 a 72µg de proteína; 100µL de FM de mononucleares contendo de 13 a 44µg de proteína; 10µL de líquido sinovial contendo de 5 a 20µg de proteína; ou 25µL de plasma contendo de 200 a 450µg de proteína, incubada com L-alanina- β -naftilamida em tampão fosfato, pH 7,4 contendo 1mM DL-ditiotreitol (DTT) (Sigma).

A atividade APB foi medida utilizando 25µL de FS de membrana sinovial contendo de 2,8 a 20µg de proteína; 25µL de FM de membrana sinovial contendo de 2,6 a 15µg de proteína; 25µL de líquido sinovial contendo de 12 a 49µg de proteína; 50µL de FS de mononucleares contendo de 22 a 72µg de proteína; 100µL de FM de mononucleares contendo de 13 a 44µg de proteína; ou 25µL de plasma contendo de 205 a 450µg de proteína, incubada com L-

arginina- β -naftilamida (Sigma) em tampão fosfato, pH 6,5 contendo 150 mM NaCl e 0,02mM puromicina (Sigma).

A atividade DPP4 foi medida utilizando 25 μ L de FS de membrana sinovial contendo de 2,8 a 20 μ g de proteína; 25 μ L de FM de membrana sinovial contendo de 2,6 a 15 μ g de proteína; 50 μ L de FS de mononucleares contendo de 22 a 72 μ g de proteína; 100 μ L de FM de mononucleares contendo de 13 a 44 μ g de proteína; 10 μ L de líquido sinovial contendo de 5 a 20 μ g de proteína; ou 25 μ L de plasma contendo de 51 a 112mg de proteína, incubada com H-Gly-Pro-4-metoxi- β -naftilamida (Península, EUA) em tampão Tris-HCl, pH 8,3.

A atividade POP foi medida utilizando 25 μ L de FS de membrana sinovial contendo de 2,8 a 20 μ g de proteína; 50 μ L de líquido sinovial contendo de 24 a 98 μ g de proteína; ou 50 μ L de plasma contendo de 410 a 900 μ g de proteína, incubada com Z-Gly-L-Pro-2-naftilamida (Sigma) em tampão fosfato, pH 7,4 contendo 2mM DTT.

As atividades APN, APB e DPIV de FS e FM de leucócitos mononucleares foram medidas nas mesmas condições citadas para FS e FM de membrana sinovial.

As atividades APN, APB e DPP4 foram mensuradas, sob as mesmas condições citadas anteriormente, em amostras de BV ou MTX em concentrações de 50 μ g, 500 μ g ou 5000 μ g por mL, em volume de 25 μ L por poço.

3.13 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente usando os programas computacionais GraphPad Instat™, GraphPad Prism™. A análise de regressão foi utilizada para obter as curvas-padrão de albumina, β -naftilamina, metoxi- β -naftilamina e NADH. A análise de variância (ANOVA) comparou (i) valores de espessura das patas posteriores e teor de anticorpos anticolágeno tipo II dos grupos controle (tratados ou não) e resistentes, bem como de artríticos (tratados ou não), e (ii) valores de todos os parâmetros sob estudo dos grupos artríticos (tratados ou não) e resistentes e do controle não tratado. Foi adotado o teste post hoc de Dunnett. O teste t de Student foi utilizado para comparar valores de LDH e de TNF- α . Em todos os cálculos foi fixado o nível crítico mínimo de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 INDUÇÃO DE ARTRITE

O método de Cremer (1988) (iii), com modificação, foi adotado no presente estudo por causar maior incidência de sinais de artrite (60%) (n=10) em relação aos outros métodos.

A incidência de sinais de artrite em ensaios piloto no presente estudo utilizando outros protocolos foi: 0% (n=10) pelo método de Trentham, Townes e Kang (1977); 20% (n=10) pelo método de Izal et al. (2008); 16,7% (n=12) pelo método de Cuzzocrea et al. (2005); 10% (n=10) pelo método de Cremer (1988) (i); e 25% (n=12) pelo método de Cremer (1988) (ii).

O sinal macroscópico da CIA está ilustrado na **Figura 1**, a qual mostra as patas posteriores de um animal controle (sem edema) e de um animal artrítico (com edema). Animais resistentes não apresentaram diferença estatística comparados aos controles não tratados, ou seja, as patas posteriores destes animais apresentaram-se como as patas posteriores de animais controle sem tratamento.

Figura 1 - Aspecto macroscópico de patas posteriores de animal controle (fotografia à esquerda) e de animal artrítico (fotografia à direita).

4.2 MASSA CORPORAL

A avaliação da massa corporal mostrou não haver diferenças significativas entre os animais controle, com e sem tratamento, e animais resistentes (ANOVA, $p=0,4585$). Os valores da massa corporal desses grupos foram: 370 ± 11 g (n=10) no grupo controle não tratado; 376 ± 10 g (n=9) no grupo controle tratado com BV; 399 ± 8 g (n=9) no grupo controle tratado com MTX;

387±18g (n=11) no grupo controle tratado com BV e MTX; e 375±8g (n=17) em animais resistentes.

A **Figura 2** mostra um decréscimo significativo da massa corporal de animais artríticos não tratados, enquanto que os animais artríticos tratados não apresentaram diferenças significativas com relação aos controles não tratados.

Figura 2 - Massa corporal de animais controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX), artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes. Valores são média ± EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA, $p=0,0060$. Teste post hoc de Dunnett, $**p<0,01$ em relação ao controle não tratado.

4.3 AVALIAÇÃO DO EDEMA

A avaliação do diâmetro das patas posteriores dos animais controle com ou sem tratamento e de animais resistentes não mostrou diferenças significativas, ANOVA, $p=0,6455$. Os valores de espessura foram: 5,56±0,1mm (n=8) em animais controle não tratados; 5,59±0,09mm (n=9) em controle tratado com BV; 5,69±0,06mm (n=9) em controle tratado com MTX; 5,54±0,05mm (n=11) em controle tratado com BV e MTX; e 5,6±0,06mm (n=13) em animais resistentes.

A **Figura 3** mostra que o edema persiste em todos os animais artríticos tratados, mas a **Figura 4** mostra que há um decréscimo significativo no grau de edema nos animais artríticos tratados com MTX em relação ao grupo artrítico não tratado.

Figura 3 - Diâmetro das patas posteriores nos ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX), artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes.

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA, $p < 0,0001$; Teste post hoc de Dunnett, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao controle não tratado.

Figura 4 - Porcentagem relativa de edema das patas posteriores nos grupos artríticos tratados com BV e/ou MTX, em relação aos animais artríticos não tratados (100%).

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA, $p < 0,05$; Teste post hoc de Dunnett, * $p < 0,05$ em relação ao grupo artrítico não tratado.

4.4 AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS MARCADORAS

A **Tabela 1** mostra a marcante diferença do título de anticorpos anticolágeno tipo II no plasma entre os animais sob simulação da indução (controle, controle+BV, controle+MTX, controle+BV+MTX) e os induzidos (artríticos, artríticos+BV, artríticos+MTX, artríticos+BV+MTX e resistentes), a qual é independente do tratamento aplicado. É notável a existência

de títulos elevados de anticorpo anticolágeno tipo II nos animais induzidos que não desenvolveram edema.

As medidas do teor de IL-6 no plasma de animais desses mesmos grupos foram altamente inconclusivas (dados não mostrados) sugerindo a suspeita quanto à especificidade e/ou adequação do kit utilizado para o ensaio o qual, inclusive, teve sua produção descontinuada pelo fabricante.

As medidas do teor de TNF- α no plasma foram negativas em todos os grupos. Utilizando-se soro, ao invés do plasma, constatou-se a presença de TNF- α em animais artríticos sem tratamento e ausência nos animais dos demais grupos, conforme mostra a **Tabela 2**.

Tabela 1 – Anticorpo anticolágeno tipo II no plasma de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX), artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes.

Grupo	Anticorpo anticolágeno tipo II ($\mu\text{g/mL}$)
Controle	0,039 $\pm$ 0,018 (2)
Controle+BV	0,015 $\pm$ 0,0003 (3)
Controle+MTX	0,018 $\pm$ 0,002 (2)
Controle+BV+MTX	0,024 $\pm$ 0,007(2)
Artríticos	186 $\pm$ 5,7 (3)**
Artríticos+BV	192 $\pm$ 1,1 (3)**
Artríticos+MTX	193 $\pm$ 2,2 (3)**
Artríticos+BV+MTX	193 $\pm$ 0,8 (3)**
Resistentes	191 $\pm$ 1,5 (3)**

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses.

Comparação entre animais artríticos, com ou sem tratamento com BV e/ou MTX, resistentes e controles não tratados: ANOVA, $p < 0,0001$; Teste post hoc de Dunnett, ** $p < 0,01$ em relação aos controles não tratados.

Comparação entre animais controle tratados com BV e/ou MTX e controle não tratados: ANOVA, $p = 0,2756$.

Comparação entre artríticos tratados com BV e/ou MTX e sem tratamento: ANOVA, $p = 0,3867$.

Tabela 2 – TNF- α no soro de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX), artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes.

Grupo	TNF- α (pg/mL)
Controle	zero (2)
Controle+BV	zero (2)
Controle+MTX	zero (2)
Controle+BV+MTX	zero (2)
Artríticos	21,1 $\pm$ 1,2 (4)*
Artríticos+BV	zero (3)
Artríticos+MTX	zero (3)
Artríticos+BV+MTX	zero (3)
Resistentes	zero (3)

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses.

Comparação entre artrítico sem tratamento e controle sem tratamento: * $p \leq 0,0003$, teste t-Student não pareado, bicaudal.

4.5 HIPERALGESIA

A avaliação do limiar mecânico de hiperalgesia entre os animais controle com ou sem tratamento e animais resistentes não mostrou diferenças significativas em comparação com o grupo controle não tratado, ANOVA $p=0,9706$. Os valores do limiar mecânico desses grupos foram: 46 $\pm$ 2g (n=4) em animais controle não tratados; 45 $\pm$ 3g (n=5) em animais controle tratados com BV; 45 $\pm$ 1g (n=3) em animais controle tratados com MTX; 45 $\pm$ 1g (n=3) em animais controle tratados com BV e MTX; e 44 $\pm$ 0,5g (n=4) em animais resistentes.

A **Figura 5** mostra a diminuição do limiar mecânico de hiperalgesia dos animais artríticos tratados ou não, em comparação ao controle sem tratamento.

Figura 5 - Limiar mecânico de hiperalgesia das patas posteriores dos grupos controle sem tratamento e artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX.

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA, $p < 0,0001$. Teste post hoc de Dunnett em relação ao controle não tratado: ** $p < 0,01$.

A **Figura 6** mostra que entre os grupos artríticos com ou sem tratamento há aumento significativo do limiar mecânico de animais artríticos tratados com MTX e de tratados com BV e MTX em comparação com o grupo artrítico não tratado.

Figura 6 - Porcentagem relativa de limiar de hiperalgesia nos grupos artríticos tratados com BV e/ou MTX, em relação aos animais artríticos não tratados.

Valores são porcentagem relativa aos artríticos não tratados $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA, $p = 0,0008$; Teste post hoc de Dunnett, ** $p < 0,01$ em relação ao grupo artrítico não tratado.

4.6 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS LEUCOCITÁRIAS DO SANGUE

Não foi possível separar os polimorfonucleares do sangue periférico com o gradiente de Percoll, com ou sem a utilização de tampão de hemólise.

As células mononucleares de cada animal foram satisfatoriamente separadas com o gradiente de Percoll ($\rho=1,077\text{g/mL}$) e utilizadas no presente estudo.

4.7 SEPARAÇÃO DE FS E FM

A **Figura 7** mostra que a atividade da LDH foi muito maior na FS que na FM da membrana sinovial, tanto em animais controle sem tratamento como em artríticos. O mesmo padrão de atividade, presença de LDH na FS e ausência na FM, foi observado nos demais grupos sob estudo (dados não mostrados).

Figura 7 - Atividade de desidrogenase láctica (LDH) das frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) da membrana sinovial de ratos controle sem tratamento e artríticos sem tratamento.

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. $*p \leq 0,0001$, teste t-Student não pareado, bicaudal.

4.8 APB

A **Figura 8** mostra os níveis de atividade APB no plasma de animais de todos os grupos estudados. Observou-se menor atividade APB no plasma de animais controle tratados com BV e/ou MTX e em animais artríticos tratados com MTX e tratados com BV e MTX, com relação ao controle não tratado.

Figura 8 - Atividade de aminopeptidase básica (APB) do plasma de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita). Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA: $p < 0,0001$ em ambos os gráficos. Teste post hoc de Dunnett em relação ao controle não tratado: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

A **Figura 9** mostra os níveis de atividade APB no líquido sinovial de animais de todos os grupos estudados. Observou-se menor atividade APB no líquido sinovial de animais controle tratados com BV e/ou MTX, e em artríticos tratados com MTX e em resistentes, com relação ao controle não tratado.

Figura 9 - Atividade de aminopeptidase básica (APB) do líquido sinovial de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita). Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA: grupos controle $p < 0,0001$; grupos controle sem tratamento, artríticos com e sem tratamento e resistentes $p = 0,0002$. Teste post hoc de Dunnett em relação ao controle não tratado: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

A **Figura 10** mostra os níveis de atividade APB na FS da membrana sinovial de animais de todos os grupos estudados. Observou-se aumento da atividade APB na FS dos grupos controle tratado com BV e MTX e artríticos tratados com BV e MTX, com relação ao controle não tratado.

Figura 10 - Atividade de aminopeptidase básica (APB) da fração solúvel (FS) da membrana sinovial de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita).

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA: grupos controle $p < 0,0001$; grupos controle sem tratamento, artríticos com e sem tratamento e resistentes $p = 0,006$. Teste post hoc de Dunnett em relação ao controle não tratado: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

A **Figura 11** mostra os níveis de atividade APB na FM da membrana sinovial de animais de todos os grupos estudados. Não houve diferença estatística significativa entre os controles com ou sem tratamento. Observou-se aumento da atividade APB na FM do grupo artrítico não tratado, com relação ao controle não tratado.

Figura 11 - Atividade de aminopeptidase básica (APB) da fração de membrana solubilizada (FM) de membrana sinovial de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita).

Valores são média ± EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA: grupos controle $p=0,0666$; grupos controle sem tratamento, artríticos com e sem tratamento e resistentes $p=0,0071$. Teste post hoc de Dunnett em relação ao controle não tratado: * $p<0,05$.

A **Figura 12** mostra o decréscimo dos níveis de atividade APB na FS de leucócitos mononucleares de animais de todos os grupos estudados, com relação ao controle não tratado.

Figura 12 - Atividade de aminopeptidase básica (APB) da fração solúvel (FS) de leucócitos mononucleares de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita).

Valores são média ± EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA: $p<0,0001$ em ambos os gráficos. Teste post hoc de Dunnett em relação ao controle não tratado: ** $p<0,01$.

A **Figura 13** mostra os níveis de atividade APB na FM de leucócitos mononucleares de animais de todos os grupos estudados. Observou-se aumento da atividade APB na FM do

grupo controle tratado com MTX e em animais resistentes, com relação ao controle não tratado.

Figura 13 - Atividade de aminopeptidase básica (APB) da fração de membrana solubilizada (FM) de leucócitos mononucleares de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita).

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA: grupos controle $p=0,0002$; grupos controle sem tratamento, artríticos com e sem tratamento e resistentes $p<0,0001$. Teste post hoc de Dunnett em relação ao controle não tratado: $**p<0,01$.

4.9 APN

A **Figura 14** mostra os níveis de atividade APN no plasma animais de todos os grupos estudados. Observou-se um decréscimo da atividade APN nos grupos controle tratados com BV e MTX e artríticos tratados com BV e MTX, com relação ao controle não tratado.

Figura 14 - Atividade de aminopeptidase neutra (APN) do plasma de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita).

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA: grupos controle $p=0,0003$; grupos controle sem tratamento, artríticos com e sem tratamento e resistentes $p<0,0001$. Teste post hoc de Dunnett em relação ao controle não tratado: * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

A **Figura 15** mostra os níveis de atividade APN no líquido sinovial de animais de todos os grupos estudados. Observou-se um decréscimo da atividade APN no grupo controle tratado com BV e MTX e aumento no grupo artrítico não tratado, com relação ao controle não tratado.

Figura 15 - Atividade de aminopeptidase neutra (APN) do líquido sinovial de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita). Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA: grupos controle $p=0,0153$; grupos controle sem tratamento, artríticos com e sem tratamento e resistentes $p=0,0003$. Teste post hoc de Dunnett em relação ao controle não tratado: * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

A **Figura 16** mostra os níveis de atividade APN na FS da membrana sinovial de animais de todos os grupos estudados. Não houve diferença estatística entre os controles com ou sem tratamento. Observou-se aumento da atividade APN no grupo artrítico não tratado e artríticos tratados com BV e MTX, com relação ao controle não tratado.

Figura 16 - Atividade de aminopeptidase neutra (APN) da fração solúvel (FS) da membrana sinovial de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita).

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA: grupos controle $p=0,1999$; grupos controle sem tratamento, artríticos com e sem tratamento e resistentes $p=0,0003$. Teste post hoc de Dunnett em relação ao controle não tratado: * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

A **Figura 17** mostra os níveis de atividade APN na FM da membrana sinovial de animais de todos os grupos estudados. Observou-se um decréscimo da atividade APN nos grupos controle tratados com BV, artríticos tratados com BV e nos controles tratados com BV e MTX, com relação ao controle não tratado.

Figura 17 - Atividade de aminopeptidase neutra (APN) da fração de membrana solubilizada (FM) da membrana sinovial de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita).

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA: grupos controle $p=0,0026$; grupos controle sem tratamento, artríticos com e sem tratamento e resistentes $p=0,0011$. Teste post hoc de Dunnett em relação ao controle não tratado: * $p<0,05$.

A **Figura 18** mostra os níveis de atividade APN na FS de leucócitos mononucleares de animais de todos os grupos estudados. Observou-se um decréscimo da atividade APN nos grupos controle tratados com BV e nos tratados com MTX e aumento nos artríticos tratados com MTX e tratados com BV e MTX, com relação ao controle não tratado.

Figura 18 - Atividade de aminopeptidase neutra (APN) da fração solúvel (FS) de leucócitos mononucleares de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita).

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA: grupos controle $p < 0,0001$; grupos controle sem tratamento, artríticos com e sem tratamento e resistentes $p = 0,0059$. Teste post hoc de Dunnett em relação ao controle não tratado: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

A **Figura 19** mostra os níveis de atividade APN na FM de leucócitos mononucleares de animais de todos os grupos estudados. Observou-se aumento da atividade APN no grupo controle tratado com MTX e um decréscimo em artríticos não tratados, artríticos tratados com MTX e artríticos tratados com BV e MTX, em relação ao controle não tratado.

Figura 19 - Atividade de aminopeptidase neutra (APN) da fração de membrana solubilizada (FM) de leucócitos mononucleares de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita).

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA: grupos controle $p=0,0071$; grupos controle sem tratamento, artríticos com e sem tratamento e resistentes $p=0,0002$. Teste post hoc de Dunnett em relação ao controle não tratado: * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

4.10 DPP4

A **Figura 20** mostra os níveis de atividade DPP4 no plasma de animais de todos os grupos estudados. Observou-se aumento da atividade DPP4 nos grupos controle tratado com BV, artrítico tratado com BV e nos animais resistentes, e um decréscimo da atividade em animais controle tratados com MTX, artríticos tratados com MTX e em controle tratado com BV e MTX, com relação ao controle não tratado.

Figura 20 - Atividade de dipeptidil peptidase 4 (DPP4) do plasma de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita).

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA: $p < 0,0001$ em ambos os gráficos. Teste post hoc de Dunnett em relação ao controle não tratado: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

A **Figura 21** mostra os níveis de atividade DPP4 no líquido sinovial de animais de todos os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os controles com ou sem tratamento. Observou-se aumento da atividade DPP4 no grupo artrítico tratado com BV, com relação ao controle não tratado.

Figura 21 - Atividade de dipeptidil peptidase 4 (DPP4) do líquido sinovial de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita). Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA: grupos controle $p = 0,6322$; grupos controle sem tratamento, artríticos com e sem tratamento e resistentes $p = 0,0040$. Teste post hoc de Dunnett em relação ao controle não tratado: ** $p < 0,01$.

A **Figura 22** mostra os níveis de atividade DPP4 na FS da membrana sinovial de animais de todos os grupos estudados. Não foram observadas diferenças significativas de todos os grupos em relação ao controle não tratado. Porém, a ANOVA evidencia que há diferenças, obviamente relativas aos demais grupos, comparados entre si, as quais não foram analisadas no presente estudo (vide “Discussão”).

Figura 22 - Atividade de dipeptidil peptidase 4 (DPP4) da fração solúvel (FS) da membrana sinovial de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita).

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA: grupos controle $p=0,012$; grupos controle sem tratamento, artríticos com e sem tratamento e resistentes $p=0,0018$. Teste post hoc de Dunnett em relação ao controle não tratado: $p>0,05$.

A **Figura 23** mostra os níveis de atividade DPP4 na FM da membrana sinovial de animais de todos os grupos estudados. Observou-se aumento da DPP4 após o tratamento com BV e MTX tanto em animais controle como em animais artríticos.

Figura 23 - Atividade de dipeptidil peptidase 4 (DPP4) da fração de membrana solubilizada (FM) da membrana sinovial de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita).

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA: grupos controle $p<0,0001$; grupos controle sem tratamento, artríticos com e sem tratamento e resistentes $p=0,0015$. Teste post hoc de Dunnett em relação ao controle não tratado: $**p<0,01$.

A **Figura 24** mostra os níveis de atividade DPP4 na FS de leucócitos mononucleares de animais de todos os grupos estudados. Observou-se um decréscimo da DPP4 em animais controle tratados com BV e em animais artríticos não houve diferenças significativas, em relação aos controles não tratados.

Figura 24 - Atividade de dipeptidil peptidase 4 (DPP4) da fração solúvel (FS) de leucócitos mononucleares de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita).

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA: grupos controle $p=0,0011$; grupos controle sem tratamento, artríticos com e sem tratamento e resistentes $p=0,1053$. Teste post hoc de Dunnett em relação ao controle não tratado: * $p<0,05$.

A **Figura 25** mostra os níveis de atividade DPP4 na FM de leucócitos mononucleares de animais de todos os grupos estudados. Observou-se aumento da DPP4 após os tratamentos com MTX e com BV e MTX, tanto em animais controle como em artríticos, e um decréscimo da atividade em animais artríticos não tratados.

Figura 25 - Atividade de dipeptidil peptidase 4 (DPP4) da fração de membrana solubilizada (FM) de leucócitos mononucleares de ratos controle com e sem tratamento com veneno de abelha (BV) e/ou

metotrexato (MTX) (gráfico à esquerda) e de ratos artríticos com e sem tratamento com BV e/ou MTX e resistentes à indução (gráfico à direita).

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA: grupos controle $p=0,0007$; grupos controle sem tratamento, artríticos com e sem tratamento e resistentes $p<0,0001$. Teste post hoc de Dunnett em relação ao controle não tratado: * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

4.11 POP

A atividade POP, medida nas condições de ensaio adotadas, não foi detectada em nenhuma das amostras avaliadas em todos os grupos sob estudo.

4.12 EFEITOS DIRETOS DO BV SOBRE ATIVIDADES AMINOPEPTIDÁSICAS DO PLASMA

A **Figura 26** mostra a porcentagem das atividades APN, APB e DPP4 em amostras de plasma de animais controle sem tratamento incubadas com BV nas concentrações de 50 μ g/mL, 500 μ g/mL e 5000 μ g/mL, relativa a amostras de plasma não incubadas. O BV diminuiu a atividade APN na concentração de 5000 μ g/mL (**Figura 26A**) e aumentou a atividade DPP4 nas concentrações de 500 μ g/mL e 5000 μ g/mL (**Figura 26C**); no entanto, não foi capaz de causar alterações nos níveis de APB (**Figura 26B**).

A

B **C**

Figura 26 - Efeito do BV nas concentrações de 50µg/mL, 500µg/mL e 5000µg/mL sobre as atividades APN (**Figura 26A**), APB (**Figura 26B**) e DPP4 (**Figura 26C**) do plasma.

Valores são média $\pm$ EPM. Valores em porcentagem relativa a amostras de plasma não incubadas com BV, consideradas como 100%. Número de animais entre parênteses. ANOVA: APN, $p < 0,0001$; APB, $p = 0,128$; DPP4, $p < 0,0001$. Teste post hoc de Dunnett em relação à amostra não incubada: * $p < 0,05$.

4.13 EFEITOS DIRETOS DO MTX SOBRE ATIVIDADES AMINOPEPTIDÁSICAS DO PLASMA

A **Figura 27** mostra a porcentagem das atividades APN, APB e DPP4 em amostras de plasma incubadas com MTX nas concentrações de 50µg/mL, 500µg/mL e 5000µg/mL, relativa a amostras de plasma não incubadas. O MTX diminuiu a atividade APN (**Figura 27A**), APB (**Figura 27B**) e DPP4 (**Figura 27C**) nas concentrações de 500µg/mL e 5000µg/mL.

A

B

C

Figura 27 - Efeito do MTX nas concentrações de 50µg/mL, 500µg/mL e 5000µg/mL sobre as atividades APN (**Figura 27A**), APB (**Figura 27B**) e DPP4 (**Figura 27C**) do plasma. Valores são média $\pm$ EPM. Valores em porcentagem relativa a amostras de plasma não incubadas com MTX, consideradas como 100%. Número de animais entre parênteses. ANOVA: APN, APB, DPP4, $p < 0,0001$. Teste post hoc de Dunnett em relação à amostra não incubada: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.14 EFEITOS DIRETOS DO BV E MTX SOBRE LEUCÓCITOS MONONUCLEARES

4.14.1 Viabilidade

A viabilidade dos leucócitos mononucleares mostrou-se inversamente proporcional à concentração de BV ou MTX. Os resultados da viabilidade celular das incubações foram: $97 \pm 0,6\%$ ($n=9$) em amostras incubadas apenas com salina 0,9%; zero ($n=3$) em amostras $5 \mu\text{g/mL}$ BV; $73 \pm 2\%$ ($n=3$) em amostras incubadas com $0,5 \mu\text{g/mL}$ BV; $86 \pm 1\%$ ($n=11$) em amostras incubadas com $0,05 \mu\text{g/mL}$ BV; $45 \pm 4\%$ ($n=3$) em amostras incubadas com $5 \mu\text{g/mL}$ MTX; $88 \pm 1\%$ ($n=3$) em amostras incubadas com $0,5 \mu\text{g/mL}$ MTX; e $93 \pm 0,7\%$ ($n=11$) em amostras incubadas com $0,05 \mu\text{g/mL}$ MTX.

A dose de $0,05 \mu\text{g/mL}$ foi utilizada para a incubação com BV ou MTX por apresentar os menores níveis de morte celular.

4.14.2 Atividades aminopeptidásicas

A comparação das atividades aminopeptidásicas de leucócitos mononucleares incubados com salina 0,9% e de leucócitos incubados com BV ou MTX não mostrou diferenças estatisticamente significativas, tanto as células provenientes de animais controle (**Tabela 3**) como de animais artríticos (**Tabela 4**).

Tabela 3 – Incubação de leucócitos mononucleares de animais controle com BV ou MTX

Grupo	APN		APB		DPP4	
	FS	FM	FS	FM	FS	FM
Controle	100 ± 33 (6)	100 ± 31 (3)	100 ± 51 (5)	100 ± 43 (4)	100 ± 18 (6)	100 ± 14 (5)
Controle+BV	82 ± 20 (6)	183 ± 30 (3)	45 ± 16 (6)	51 ± 14 (5)	130 ± 12 (6)	99 ± 18 (5)
Controle+MTX	82 ± 20 (6)	196 ± 47 (5)	45 ± 16 (5)	47 ± 19 (5)	130 ± 12 (6)	108 ± 19 (5)
ANOVA	$p=0,8440$	$p=0,3167$	$p=0,3802$	$p=0,3287$	$p=0,2611$	$p=0,9210$

Valores são média $\pm$ EPM. Valores em porcentagem relativa a amostras não incubadas, consideradas como 100%. Número de animais entre parênteses.

Tabela 4 – Incubação de leucócitos mononucleares de artríticos com BV ou MTX

Grupo	APN		APB		DPP4	
	FS	FM	FS	FM	FS	FM
Artríticos	100±19 (9)	100±24 (6)	100±35 (9)	100±15 (8)	100±35 (9)	100±25 (7)
Artríticos+BV	83±14 (9)	74±32 (5)	84±23 (5)	91±20 (6)	134±34 (9)	78±19 (9)
Artríticos+MTX	104±12 (8)	144±51 (7)	95±26 (7)	64±18 (4)	102±23 (8)	81±28 (8)
ANOVA	p=0,6030	p=0,4787	p=0,9434	p=0,4201	p=0,6956	p=0,7936

Valores são média ± EPM. Valores em porcentagem relativa a amostras não incubadas, consideradas como 100%. Número de animais entre parênteses.

4.15 ATIVIDADES AMINOPEPTIDÁSICAS DO BV E MTX

Não foram detectadas as atividades APN, APB e DPP4 em amostras de MTX nas concentrações utilizadas.

Em amostras de BV, detectou-se somente a atividade DPP4. A atividade DPP4 variou entre 1,1 a 2,8pmoles de substrato hidrolisado por min por µg de BV (contendo 0,05 a 0,199mg de proteína/mL).

4.16 SUMÁRIO DE RESULTADOS

A opção de análise de dados adotada no presente estudo não incluiu a comparação das atividades aminopeptidásicas entre os grupos artríticos tratados com BV e/ou MTX e grupo artrítico sem tratamento, pois esta análise parece útil somente para avaliar comparativamente a eficiência destes tratamentos em relação a parâmetros que sejam bem conhecidos como sinais da doença ou de sua melhora. Seria condição adequada para empreender esta comparação que os efeitos individuais de cada um dos tratamentos sobre as atividades aminopeptidásicas (ou outros parâmetros que se pretendesse comparar) fossem bem conhecidos. No contexto do presente estudo não existem tais condições e esta análise seria complicadora, pouco informativa e até inconveniente. As atividades aminopeptidásicas foram apenas triadas pela primeira vez nas amostras sob estudo quanto ao seu envolvimento na AR e, portanto, não se pode discernir seguramente se esta ou aquela alteração nessas atividades,

devido a este ou aquele tratamento, seriam “benéficas” ou “deletérias”, sobretudo considerando o tratamento com o BV, cujos efeitos em geral são ainda muito controversos. Além disso, vários outros tratamentos ou variantes desses tratamentos poderiam ser incluídos numa comparação estatística, sob critérios exclusivamente dependentes do objetivo pretendido (ou de quantos medicamentos ou formas de tratamento se quisesse avaliar). Deste modo, no presente estudo a comparação entre os grupos artríticos tratados com BV e/ou MTX e grupo artrítico sem tratamento limitou-se a parâmetros consagrados, como o edema e o limiar de hiperalgesia, e não precisou ser estendida para a massa corporal e teor de TNF- α somente porque o teste pos-hoc apontou em primeira análise a diferença única do grupo artrítico sem tratamento, em relação aos demais grupos controle e artríticos tratados. Assim sendo, resumizando os resultados obtidos, a **Tabela 5** mostra a comparação dos diferentes grupos em relação ao grupo controle sem tratamento, a **Tabela 6** complementa a **Tabela 5**, mostrando os resultados de edema e de limiar de hiperalgesia de animais artríticos tratados com BV e/ou MTX em comparação com animais artríticos não tratados e a **Tabela 7** mostra os resultados das atividades APB, APN e DPP4 após a incubação com BV ou MTX em concentrações de 50 μ g/mL, 500 μ g/mL e 5000 μ g/mL.

Tabela 5 – Sumário dos resultados obtidos em comparação ao grupo controle sem tratamento.

Parâmetro avaliado		Alteração em relação aos animais controle sem nenhum tratamento							
		Grupos							
		CONTROLE			INDUZIDOS				
		BV	MTX	BV+MTX	S/TRATAR	BV	MTX	BV+MTX	RESISTENTE
MASSA CORPORAL		A	A	A	↓↓	A	A	A	A
EDEMA		A	A	A	↑↑	↑	↑	↑↑	A
Ac ANTI-CII		A	A	A	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
TNF-α		A	A	A	↑↑	A	A	A	A
LIMIAR DE HIPERALGESIA		A	A	A	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	A
APB	P	↓↓	↓↓	↓↓	A	A	↓	↓↓	A
	LS	↓↓	↓↓	↓↓	A	A	↓↓	A	↓
	FS-M	A	↑↑	A	A	A	A	↑	A
	FM-M	A	A	A	↑	A	A	A	A
	FS-L	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	FM-L	A	↑↑	A	A	A	A	A	↑↑
APN	P	A	A	↓	A	A	A	↓	A
	LS	A	A	↓	↑↑	A	A	A	A
	FS-M	A	A	A	↑↑	A	A	↑	A
	FM-M	↓	A	↓	A	↓	A	A	A
	FS-L	↓↓	↓↓	A	A	A	↑	↑	A
	FM-L	A	↑↑	A	↓	A	↓↓	↓↓	A
DPP4	P	↑↑	↓↓	↓	A	↑↑	↓↓	A	↑↑
	LS	A	A	A	A	↑↑	A	A	A
	FS-M	A	A	A	A	A	A	A	A
	FM-M	A	A	↑↑	A	A	A	↑↑	A
	FS-L	↓	A	A	A	A	A	A	A
	FM-L	A	↑↑	↑↑	↓	A	↑	↑	A

Ac anti-CII= anticorpo anti colágeno tipo II; APB= aminopeptidase básica; APN=aminopeptidase neutra; DPP4=dipeptidil peptidase 4; FS=fração solúvel; FM=fração de membrana solubilizada; M=membrana sinovial; LM= leucócitos mononucleares; LS=líquido sinovial; P=plasma sanguíneo; BV=veneno de abelha; MTX=metotrexato; A=ausente; ↓=diminuição; ↑=aumento.

Tabela 6 – Sumário dos resultados obtidos de edema e de limiar de hiperalgesia de animais artríticos tratados com BV e/ou MTX em comparação com animais artríticos não tratados.

Parâmetro avaliado	Alteração em animais artríticos tratados em relação aos artríticos sem tratamento		
	Grupos artríticos tratados		
	BV	MTX	BV+MTX
EDEMA	A	↓	A
LIMIAR DE HIPERALGESIA	A	↑↑	↑↑

BV=veneno de abelha; MTX=metotrexato; A=ausente; ↓=diminuição; ↑=aumento.

Tabela 7 – Sumário das atividades aminopeptidásicas após a incubação com BV ou MTX em plasma de controles sem tratamento.

Parâmetro avaliado	Atividades aminopeptidásicas após incubação					
	BV			MTX		
	50µg/mL	500µg/mL	5000µg/mL	50µg/mL	500µg/mL	5000µg/mL
APB	A	A	A	A	↓↓	↓↓
APN	A	A	↓	A	↓	↓↓
DPP4	↑	↑	↑	A	↓↓	↓↓

APB= aminopeptidase básica; APN=aminopeptidase neutra; DPP4=dipeptidil peptidase 4; BV=veneno de abelha; MTX=metotrexato; A=ausente; ↓=diminuição; ↑=aumento.

5 DISCUSSÃO

5.1 DOSE E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DO MTX E BV

Adotou-se a dose de 0,25mg de BV/kg de massa corporal em ratos descrita por Baek et al. (2006) e Roh et al. (2004), pois estes autores relatam que o BV causou diminuição da hiperalgesia, quando administrado em um acuponto. No presente estudo, utilizamos a via sc no dorso dos animais, pois ao administrar o BV em um não acuponto, pode-se verificar os efeitos sistêmicos do BV, sem a interferência da acupuntura. Além disso, outros artigos que avaliam os efeitos terapêuticos do BV não descrevem de forma detalhada a dose utilizada, tal como relatam Suh et al. (2006) que administraram 5µL de BV/mL via ip em ratos. Adotou-se a dose e via ip de MTX descrita por Mirshafiey et al. (2006) pois os autores a descrevem como efetiva para a melhora de parâmetros histopatológicos em ratos com CIA. Baixas doses de MTX (0,33mg/kg em ratos artríticos, a cada dois dias por quatro semanas) são descritas como benéficas ao tratamento da artrite (XINQIANG et al., 2010). Além disso, uma dose maior, como de 0,75mg/kg, é descrita como causadora de má formação óssea em ratos tratados diariamente por uma semana (XIAN et al., 2007).

5.2 MASSA CORPORAL

A caquexia é um quadro comum na AR e se caracteriza pela perda de massa muscular, com ou sem diminuição da massa corporal (HARTOG; HULSMAN; GARSSSEN, 2009; ROUBENOFF, 2009), sendo um fator importante no aumento da morbidade e mortalidade prematura em pacientes com essa doença (GRANADO et al., 2007; ROUBENOFF, 2009). Diversos fatores podem estar envolvidos na patogênese dessa caquexia reumatoide, dentre eles o TNF- α (ROUBENOFF, 2009).

De acordo com Granado et al. (2007), no modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos, após 10 dias da injeção de adjuvante há perda de massa corporal, mesmo antes da manifestação dos primeiros sinais da artrite. Além disso, há decréscimo da massa de músculos como coração e o gastrocnemius. Simjee et al. (2007) descrevem que em ratos com artrite induzida por adjuvante o decréscimo da massa corporal é amenizado após o tratamento com

MTX. Em camundongos com CIA o decréscimo da massa de músculos esqueléticos também é amenizado após o tratamento com MTX (HARTOG; HULSMAN; GARSSSEN, 2009).

A avaliação da massa corporal obtida no presente estudo corrobora os dados da literatura. Os animais artríticos apresentaram um decréscimo da massa corporal, a qual sugere a caquexia reumatoide, e animais artríticos tratados com BV e/ou MTX não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle não tratado, ou seja, tanto o BV como o MTX foram capazes de reverter esse quadro. O BV é descrito como anti-inflamatório e antinociceptivo (BAEK et al., 2006; KWON et al., 2002; LEE et al., 2001). Tanto o BV bruto como um de seus componentes isolados, a melitina, foram descritos por Park et al. (2004) como inibidores da transcrição do NF κ B, o qual é responsável pela transcrição do TNF- α . O MTX também é capaz de diminuir os níveis de TNF- α , via AMPc (WESSELS; HUIZINGA; GUCHELAAR, 2008). Os resultados obtidos no ensaio de TNF- α corroboram a ação do BV e do MTX na diminuição dos níveis dessa citocina. Porém, além dessa diminuição, outros mecanismos devem estar envolvidos no efeito benéfico do BV e do MTX na caquexia reumatoide, já que Roubenoff (2009) mostrou que somente a utilização de terapia anti-TNF- α não reverte esse quadro. Alterações de atividades aminopeptidásicas em órgãos periféricos (ZAMBOTTI-VILLELA et al., 2008) e na circulação (ALPONTI e SILVEIRA, 2009; ZAMBOTTI-VILLELA et al., 2008) têm sido relacionadas ao balanço energético e uma vez que o BV e o MTX alteram algumas dessas atividades enzimáticas na AR, poderiam também influenciar o quadro de caquexia reumatoide por meio dessas alterações.

5.3 EDEMA

Evidenciou-se que o MTX ameniza o edema apresentado por animais artríticos. O MTX é a DMARD utilizada pela maioria dos pacientes artríticos (ŚWIERKOT e SZECHÍŃSKI, 2006) e, por ser análoga e antagonista do folato, inibe a síntese de DNA e RNA e a proliferação celular, causando aumento da adenosina plasmática e diminuição de citocinas (CUTOLO et al., 2001; ŚWIERKOT e SZECHÍŃSKI, 2006; WESSELS; HUIZINGA; GUCHELAAR, 2008). Porém, houve a ausência deste efeito antiedematogênico com a administração conjunta de BV e MTX no presente estudo. Pode haver a contraposição fisiológica dos efeitos isolados do BV e MTX ou um possível incremento do estresse causado pela aplicação de ambos os tratamentos (uma injeção intraperitoneal e outra subcutânea),

prejudicando a resposta adequada ao tratamento, considerando-se que o estresse é um importante fator em doenças autoimunes (CUTOLO e STRAUB, 2009; STOJANOVICH, 2010).

Trentham, Townes e Kang (1977) afirmam que a incidência de edema em seu método de indução é de 44%. Por sua vez, Cuzzocrea et al. (2005) afirmam que a incidência em seu método de indução é de 100%. No entanto, o presente estudo não confirmou essa eficiência preconizada para ambos os métodos. Alguns fatores podem interferir no êxito da manifestação de sinais macrocópicos de artrite induzida por estes métodos. Possivelmente, a influência genética, principalmente de moléculas do MHC II, e epigenética, como glicosilação de proteínas, tenham papéis primordiais no desenvolvimento e perpetuação da artrite, tanto em humanos como em modelos animais (BRAND; KANG; ROSLONIEC, 2003; HOLMDAHL, 2006; STRIETHOLT et al., 2008). Há uma forte relação entre a AR e as moléculas do MHC II, como a HLA-DR (BRAND; KANG; ROSLONIEC, 2003; COPE, 2003; OHNUMA et al., 2006), mas apesar dessa clara relação, sua função na patogênese dessa doença ainda não é conhecida (BRAND; KANG; ROSLONIEC, 2003). As moléculas do MHC II selecionam e apresentam peptídeos imunogênicos para as células T CD4+ e também selecionam o repertório de receptores de células T no timo (COPE, 2003). A glicosilação de colágeno tipo II em camundongos também tem papel importante no desenvolvimento da artrite, devido à ligação de epítomos glicosilados com o MHC II e a ativação de células T. Foi observado também o predomínio de respostas de células T contra colágeno glicosilado em pacientes com AR (BRAND; KANG; ROSLONIEC, 2003). Além disso, Brand, Latham e Rosloniec (2007) e Cremer (1988) relatam que quando o colágeno não é mantido a 4 °C pode ocorrer desnaturação e, conseqüentemente, menor incidência, o que não é o caso do presente estudo, onde foram adotados procedimentos adequados de preservação do colágeno a 4 °C, desde a armazenagem até a dissolução, emulsificação e administração.

O método de Cremer (1988), o qual foi adotado no presente estudo por apresentar a maior incidência de edema, é uma modificação do método de Trentham, Townes e Kang (1977). A administração em dose única na cauda, adotada no presente estudo, ao invés de uma dose inicial e uma dose de reforço preconizadas no método original, mostrou ser bem mais amena em causar estresse aos animais. A via id, adotada no presente estudo, também deve propiciar uma lenta absorção do composto e maior tempo de exposição, contribuindo com essa maior ocorrência de animais edematosos (60%). De acordo com Gad (2007a), a absorção do composto é mais lenta pela via id (devido a uma menor vascularização da pele comparada

com outras áreas de administração), e esta lenta absorção está relacionada a efeitos mais sustentados do que por vias de absorção rápida.

5.4 HIPERALGESIA

Pacientes com AR frequentemente apresentam maior percepção de dor e o desenvolvimento dessa hiperalgesia é atribuído, em parte, às citocinas proinflamatórias (WOOD, 2009). Camundongos com CIA apresentam maior nocicepção do que animais controle, e o tratamento com MTX causou melhora discreta, porém significativa (AL-ABD et al., 2010). Os resultados da hiperalgesia do presente estudo mostram que animais artríticos sem tratamento apresentam baixo limiar de hiperalgesia. Os tratamentos com BV ou MTX não foram capazes de igualar o limiar de hiperalgesia dos artríticos ao nível dos controles sem tratamento. Porém, em comparação com animais artríticos sem tratamento, os tratamentos com MTX e com BV e MTX causaram aumento desse limiar. O tratamento com BV não apresentou diferenças em comparação com artríticos sem tratamento, sendo, então, esse efeito da associação de BV e MTX provavelmente atribuível ao MTX. Segundo Kwon et al. (2001), ratos com artrite induzida por adjuvante apresentam menor limiar de hiperalgesia, o qual é revertido pelo tratamento com BV. Kwon et al. (2001) utilizaram 1mg BV/ kg de massa corporal, em acupontos em ratos diariamente e a dose adotada no presente estudo (0,25mg BV/kg) é inferior a esta. No entanto, Chen et al. (2006) utilizam 0,2mg de BV em ratos com peso entre 250 e 300g via sc para induzir nocicepção e relatam um decréscimo significativo do limiar de hiperalgesia. Entre outras causas, esses resultados controversos podem ser gerados pela via de administração e diferença na composição do BV utilizada em cada estudo.

5.5 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA ARTRITE POR MARCADORES MOLECULARES

5.5.1 Anticorpo anticolágeno tipo II

O aumento do título de anticorpos anticolágeno tipo II não é um indicativo diagnóstico diferencial da AR, pois ocorre em outras doenças (MORGAN, 1990). No presente estudo,

independentemente do tratamento, os animais artríticos apresentaram altos título de anticorpos anticolágeno tipo II, bem como os animais resistentes. Conforme Harris, Liljeström e Klareskog (1997), altos títulos desses anticorpos são esperados em animais imunizados com colágeno tipo II. O presente estudo confirmou esta expectativa em todos os animais imunizados. É notável a demonstração de que o efeito antiedematogênico do MTX não tem relação com alterações no título de anticorpos anticolágeno tipo II nos animais artríticos. Embora a transferência passiva de anticorpos contra o colágeno tipo II tenha sido descrita como um modelo para induzir uma artrite semelhante à AR em ratos e camundongos (KANNAN; ORTMANN; KIMPEL, 2005; MORGAN, 1990; NANDAKUMAR, 2010; TRENTHAM e DYNESIUS-TRENTHAM, 1995), até o momento não havia dados sobre o título desses anticorpos em animais que não desenvolvessem sinais macroscópicos da artrite, em especial o edema das patas posteriores, tal qual mostrado no presente estudo. Segundo Nandakumar (2010), a resposta de células B em modelos experimentais de CIA ocorre contra uma série de epítopos da tripla hélice de colágeno. Então, uma hipótese para o aumento do título desses anticorpos em ratos imunizados que desenvolvem ou não este sinal é a de que o colágeno, como uma molécula grande que contém diferentes epítopos, pode ser imunorreativo, em diferentes graus, para diferentes anticorpos contra os seus diferentes epítopos. Esta hipótese admitiria a existência de anticorpos patogênicos e não patogênicos (MORGAN, 1990; NANDAKUMAR, 2010) para o colágeno tipo II. Além disso, os efeitos de anticorpos contra o colágeno dependem de outros fatores, como o receptor $Fc\gamma$. A ligação e ativação do receptor $Fc\gamma$ são necessárias para o desenvolvimento da doença, visto que em camundongos injetados com anticorpo anticolágeno tipo II a ausência de ativação desse receptor leva à resistência (NANDAKUMAR, 2010). Assim, existência de alto título de autoanticorpos contra o colágeno tipo II em animais resistentes à manifestação da artrite reforçam a concepção de que o desencadeamento da artrite é multifatorial.

5.5.2 IL-6

A avaliação do teor de IL-6 não foi útil ao presente estudo pela falta de confiabilidade no kit comercial. Como são raros os fornecedores de kits para esta medida em ratos, optou-se por substituí-la pela medida de $TNF-\alpha$.

5.5.3 TNF- α

O TNF- α é uma das principais citocinas pró-inflamatórias da AR, sendo encontrado em altas concentrações no soro e líquido sinovial de pacientes com esta doença (DOAN e MASSAROTTI, 2005).

Os ensaios realizados em amostras de plasma apresentaram resultados negativos. Segundo o fabricante, amostras de plasma heparinizado podem ser utilizadas, já que o manual descreve ensaios de linearidade de diluição com amostras heparinizadas. No entanto, alguns estudos indicam que a heparina pode se ligar ao TNF- α (AXELSSON et al., 2010; KENIG et al., 2008). Esta é uma hipótese para explicar nossos resultados falso-negativos, já que em amostras de soro, detectou-se a presença de TNF- α em animais artríticos não tratados e ausência nos demais grupos, demonstrando que os tratamentos isolados ou em conjunto do BV e do MTX são capazes de reverter o aumento dessa citocina. A ausência de TNF- α em animais artríticos tratados pode ser relacionada à manutenção da massa corporal e alterações das atividades aminopeptidásicas. No entanto, apesar da relação de citocinas com a hiperalgesia (WOOD, 2009), a ausência de TNF- α não se relacionou com alterações significativas do limiar de hiperalgesia e tampouco com a melhora do edema nos animais artríticos tratados com BV, as quais foram observadas nos artríticos tratados com MTX.

5.6 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS LEUCOCITÁRIAS DO SANGUE

A separação de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares do sangue periférico de ratos proporcionou número baixo e insuficiente de polimorfonucleares para a finalidade do presente estudo.

A contagem de neutrófilos realizada em rato sadio foi de 12% do total de leucócitos sanguíneos, dado este que está de acordo com a literatura, visto que em ratos Wistar os neutrófilos perfazem 9-34% do total de leucócitos do sangue, enquanto que os linfócitos correspondem a 65-84,5% (GAD, 2007b). Assim, o baixo número de neutrófilos é a causa mais provável dos resultados obtidos. A metodologia adotada, proposta pela GE – Healthcare, utiliza sangue humano e neste os neutrófilos representam mais de 70% dos leucócitos do (HALLETT e WILLIAMS, 2008). Outro fator prejudicial à obtenção de neutrófilos é sua densidade similar à das hemácias, sendo que a camada de hemácias poderia também conter

neutrófilos. Por isso, foi utilizado um tampão de hemólise para lisar as hemácias e tentar melhorar a obtenção dos polimorfonucleares presentes, o que não ocorreu. Portanto, apesar da importante atuação dos neutrófilos nas inflamações, principalmente nas articulações (HALLETT e WILLIAMS, 2008; KITSIS e WEISSMANN, 1991), não houve viabilidade para a avaliação desse tipo celular no presente estudo.

5.7 LDH

O LDH é um reconhecido marcador citosólico (HOSOKAWA et al., 1992) e a obtenção de maior teor desta atividade enzimática em fração solúvel do que em fração unida à membrana reflete a eficiência do procedimento de fracionamento adotado.

5.8 ATIVIDADES PEPTIDÁSICAS E ARTRITE

Em geral, o presente estudo revelou que: 1- As atividades APB, APN e DPP4 são expressas nas frações solúvel e de membrana solubilizada da membrana sinovial e de leucócitos mononucleares, no líquido sinovial e no plasma de animais normais e artríticos, enquanto a atividade POP, medida por meio de ensaio de uso corrente, é indetectável em todos esses materiais; 2- Os tratamentos com BV e/ou MTX influenciam as atividades APB, APN e DPP4 tanto em animais normais quanto nos artríticos; 3- Essa influência em alguns casos é distinta entre normais e artríticos; 4- Os animais resistentes à indução de artrite caracterizam-se pelo decréscimo da atividade APB no líquido sinovial e na fração solúvel de leucócitos mononucleares e aumento da atividade APB na fração de membrana de leucócitos mononucleares e da atividade DPP4 plasmática; 5- Os animais artríticos sem tratamento caracterizam-se pelo aumento da atividade de APN na fração solúvel da membrana sinovial e no líquido sinovial, decréscimo da atividade APN na fração de membrana de leucócitos mononucleares, aumento da atividade APB na fração de membrana da membrana sinovial, decréscimo da atividade APB na fração solúvel de leucócitos mononucleares e decréscimo da atividade DPP4 na fração de membrana de leucócitos circulantes.

5.8.1 APB

5.8.1.1 A APB e a inflamação

A APB apresenta atividade LTA₄ hidrolase, sendo que a natureza bi-funcional desta enzima é reforçada pela relação filogenética próxima a da LTA₄ hidrolase (PHAM et al., 2007), sendo que a última também exibe atividade APB *in vitro* (GRICE et al., 2008; HAEGGSTRÖM; THOLANDER; WETTERHOLM, 2007; KIRKLAND et al., 2008; LIANG et al., 2007; MURPHY e GIJÓN, 2007; PHAM et al., 2007). A LTA₄ hidrolase é uma enzima ubíqua (GRICE et al., 2008; HAEGGSTRÖM; THOLANDER; WETTERHOLM, 2007; MURPHY e GIJÓN, 2007) altamente específica para o LTA₄, convertendo-o a LTB₄ (HAEGGSTRÖM; THOLANDER; WETTERHOLM, 2007; MURPHY e GIJÓN, 2007; PENNING et al., 2002). O LTB₄ é produzido por diversas células imunocompetentes, como neutrófilos e macrófagos, estimula diversas citocinas (PENNING et al., 2002), ativa células inflamatórias, como neutrófilos, macrófagos, células T e B (GRICE et al. 2008; KIRKLAND et al., 2008), e é um mediador inflamatório potente que amplifica diversas doenças inflamatórias, como a AR (GRICE et al. 2008; LIANG et al., 2007; PENNING et al., 2002). Devido à grande importância do LTB₄ em estados inflamatórios, diversos estudos buscam um inibidor seletivo para a LTA₄ hidrolase (GRICE et al., 2008; KIRKLAND et al., 2008; PENNING et al., 2002). Apesar da importância da atividade LTA₄ hidrolase em processos inflamatórios, a atuação dessa atividade na artrite não será abordada no presente trabalho, pois a medida dessa atividade envolve outra metodologia (HPLC) e outros reagentes específicos e de custo vultoso.

A ação fisiológica da APB ainda é pouco conhecida. Além da atividade LTA₄ hidrolase *in vitro*, a APB é capaz de hidrolisar a Ang III, formando a Ang IV (RUIZ-ORTEGA; ESTEBAN; EGIDO, 2007). Inicialmente, a APB foi descrita apenas como sendo citosólica e secretada, mas em alguns tecidos está associada à membrana celular (FOULON; CADEL; COHEN, 1999; BALOGH et al., 1998) e, também, é encontrada no complexo de Golgi, e possivelmente transita do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi (BALOGH et al., 1998). Dentro da célula, a atividade APB poderia estar envolvida no processamento antigênico, pois está presente no proteassoma (HATTORI e TSUJIMOTO, 2004). Os peptídeos gerados por degradação no proteassoma são transportados para o retículo endoplasmático (HATTORI e TSUJIMOTO, 2004) onde podem se ligar ao MHC II (LI et al.,

2005). Além disso, no retículo endoplasmático, muitos peptídeos sofrem clivagem do resíduo N-terminal (HATTORI e TSUJIMOTO, 2004) e a APB poderia atuar também nesse compartimento, auxiliando o processamento antigênico. A APB associada à membrana poderia ter ação sobre peptídeos extracelulares (BALOGH et al., 1998), como a Ang III, formando a Ang IV.

Os animais artríticos apresentaram aumento da APB da FM da membrana sinovial, o que poderia resultar na formação de Ang IV e agravar a inflamação no local afetado pela artrite. Esse aumento não é observado após os tratamentos e, portanto, poderia ser um marcador da AR. Além disso, destaca-se também o decréscimo da atividade APB do líquido sinovial como uma das peculiaridades dos animais resistentes à indução de artrite e que poderia refletir um mecanismo da resistência ao desenvolvimento da artrite.

5.8.1.2 A APB, o BV e o MTX

No presente estudo a atividade APB do líquido sinovial e do plasma de ratos normais foi consistentemente reduzida por BV, MTX e BV+MTX. O decréscimo da APB poderia resultar na diminuição do processamento antigênico e na diminuição da formação de Ang IV, peptídeo que causa a ativação do NFκB. Este efeito seria benéfico, mas somente o MTX manteve esse efeito na FM, plasma e líquido sinovial dos animais artríticos. O MTX foi o tratamento mais eficiente para reduzir o edema e, diferentemente dos demais tratamentos, causou tanto a normalização da APB na FM da membrana sinovial quanto o decréscimo desta atividade no plasma. Assim, pode-se supor que o decréscimo da APB na FM membrana sinovial e plasma tenha alguma influência na formação do edema, possivelmente via NFκB, por formação da Ang IV. Vários estímulos podem ativar esse fator, como estresse oxidativo, radiação e citocinas inflamatórias (MANKAN et al., 2009). Quando ativado, o NFκB regula a transcrição de mais de 400 genes relacionados à imunorregulação, inflamação, carcinogênese e apoptose (AHN e AGGARWAL, 2005). Apesar do BV ser descrito como inibidor da transcrição desse fator, a utilização do MTX foi mais eficiente na diminuição do edema. Isso pode indicar que dentre os mecanismos anti-inflamatórios do MTX está o decréscimo da atividade APB que, por sua vez, diminui a formação de Ang IV e, consequentemente, a ativação do NFκB. Além disso, a inibição da produção de citocinas pelo MTX (CUTOLO et al., 2001) é outro fator que diminuiria a ativação do NFκB.

5.8.2 APN

5.8.2.1 A APN e a inflamação

A APN está distribuída em diferentes tipos celulares (BAUVOIS e DAUZONNE, 2006; SHIMIZU et al., 2002) e é relacionada à degradação da matriz extracelular, processamento antigênico (REINHOLD et al., 2007), quimiotaxia de células T (SHIMIZU et al., 2002), motilidade e adesão celular em processos angiogênicos (FUKASAWA et al., 2006) e metaboliza encefalinas e substância P. A substância P é um peptídeo regulatório com ação inflamatória, a qual modula tanto o tônus vascular e permeabilidade quanto a função de células imunes e a proliferação celular (WALSH et al., 1993). Além disso, assim como a APB, a APN também hidrolisa Ang III, formando Ang IV que pode causar a ativação de NFκB (RUIZ-ORTEGA; ESTEBAN; EGIDO, 2007). Já as encefalinas apresentam efeito antinociceptivo (THANAWALA; KADAM; GHOSH, 2008). Devido a importância da APN em processos inflamatórios e na angiogênese (FUKASAWA et al., 2006), há uma intensa busca por inibidores para esta enzima e inibidores duais para a APN e DPP4 (DRAG; GRZYWA; OLEKSYSYN, 2007; FUKASAWA et al., 2006; REINHOLD et al., 2007; THANAWALA; KADAM; GHOSH, 2008; WANG et al., 2008; ZHANG e XU, 2008). O aumento da atividade APN no plasma e líquido sinovial em animais artríticos sem tratamento, evidenciado no presente estudo, reforça a ideia de que inibidores para a APN seriam benéficos para o tratamento de doenças autoimunes (ANSORGE et al., 2010; REINHOLD et al., 2007).

Segundo Shimizu et al. (2002), há aumento da atividade APN no líquido sinovial de pacientes com AR, comparativamente a pacientes com osteoartrite, utilizando a Leu-7-amido-4-metilcumarina (Leu-AMC) como substrato. O mesmo resultado foi obtido por Mantle, Falkous e Walker (1999) com substrato Leu-AMC. Porém, utilizando substrato de Ala-AMC não houve diferença da atividade entre pacientes com AR e osteoartrite. Suh et al. (2006) obtiveram aumento da atividade hidrolítica tanto com substrato Leu-AMC como Ala-AMC. Shimizu et al. (2002) também mostraram um aumento da expressão gênica da APN em fibroblastos sinoviais de pacientes com AR. Na forma secretada, no líquido sinovial, a APN poderia atuar localmente sobre peptídeos como Ang III e substância P e favorecer a perpetuação do estado inflamatório na articulação. No citosol, o aumento da APN também poderia contribuir na proteólise que ocorre para a formação de ligantes de moléculas MHC I (HATTORI e TSUJIMOTO, 2004; SAVEANU et al., 2005). Sabe-se que peptídeos

citossólicos também podem se ligar a moléculas MHC II para serem apresentados para células CD4⁺ (LI et al., 2005). Alguns estudos imunohistoquímicos demonstram aumento da atividade APN na membrana de fibroblastos sinoviais de pacientes com AR (SHIMIZU et al., 2002) e na membrana de vasos sanguíneos sinoviais (WALSH et al., 1993). Pela mesma técnica foi observado aumento da APN/CD13 em sinoviócitos (CHOMARAT et al., 1995) e no tecido sinovial (HARINGMAN et al., 2006) de pacientes com AR. No entanto, no presente estudo não foi observado aumento da atividade APN no plasma e na FM da membrana sinovial. Como sugerido pelos resultados de Mantle, Falkous e Walker (1999), pode haver diferenças no nível de atividade enzimática de acordo com o substrato utilizado, i.e. atividade APN elevada utilizando o substrato Leu-AMC e não alterado com Ala-AMC. Além disso, somente a detecção imunohistoquímica de APN não é suficientemente indicativa da existência de atividade enzimática.

Diante destes resultados controversos, o presente estudo mostra efetivamente que o aumento da atividade APN da fração solúvel da membrana sinovial e do líquido sinovial de artríticos sem tratamento foi uma peculiaridade que emerge como um novo potencial “marcador” bioquímico desta doença, com significado diagnóstico e, talvez, prognóstico, já que não persiste nos animais tratados e com melhora parcial do edema articular. Ainda, baseado no presente estudo é plausível supor que a APN estaria envolvida no processamento antigênico ou de peptídeos (assim como a APB), como encefalinas, substância P e Ang III, bem como na quimiotaxia de células inflamatórias (mais como um fator citossólico do que como um sinalizador na membrana celular).

5.8.2.2 A APN, o BV e o MTX

O presente estudo também mostrou que o BV diminui a atividade APN na fração membranal da membrana sinovial de animais normais e artríticos. Por sua vez, o MTX e o BV isoladamente amenizaram o aumento da atividade APN na fração solúvel da membrana sinovial e no líquido sinovial de animais artríticos. Assim, o MTX poderia contribuir na diminuição da inflamação e dor nos artríticos, o que é corroborado pela diminuição do edema e do limiar de hiperalgesia dos animais tratados com este agente. E, apesar de não ter sido constatada alteração da APN da FM da membrana sinovial de animais artríticos, não se pode excluir a possibilidade de que o decréscimo desta atividade pelo BV resulte em uma ação anti-

inflamatória. Em animais tratados concomitantemente com BV e MTX, as alterações não correspondem as que ocorrem com os tratamentos isolados, pois o tratamento com ambos os agentes causou um decréscimo da atividade APN no líquido e plasma de animais controle, e aumento na FS e decréscimo na FM da membrana sinovial de animais artríticos. As alterações causadas pelo tratamento conjunto poderiam implicar em efeitos opostos, maior processamento de antígenos devido ao aumento da APN na FS da membrana sinovial (HATTORI e TSUJIMOTO, 2004; SAVEANU et al., 2005) e diminuição do processamento de encefalinas, substância P e Ang III pelo decréscimo da APN no plasma. No entanto, o efeito pró-inibitório parece predominar, pois o tratamento conjunto não foi capaz de diminuir o edema causado pela artrite. Então, o aumento da APN na FS da membrana sinovial e a presença de edema nos animais artríticos tratados concomitantemente com BV e MTX sugere que a utilização conjunta de ambos os agentes não é benéfica. Ademais, o tratamento com MTX não causou alterações dos níveis de APN em animais controle e normalizou os níveis dessa atividade nos artríticos. Isso indica que somente durante a artrite o agente anti-inflamatório atuaria sobre os níveis de APN. Esse efeito seria benéfico por não modificar a atuação fisiológica da enzima.

5.8.3 DPP4

5.8.3.1 A DPP4 e a inflamação

A DPP4 é uma enzima envolvida no catabolismo de quimiocinas, citocinas, substância P e outros (SEDO et al., 2005, WALSH et al., 1993). Além disso, modula as respostas imunes regulando linfócitos (BUSSO et al., 2005). A literatura apresenta alguns dados divergentes sobre alterações da atividade DPP4 na AR. Segundo Sedo et al. (2005), em pacientes com AR há decréscimo significativo da DPP4 do líquido sinovial, comparativamente a pacientes com osteoartrite e indivíduos saudáveis; e aumento de expressão de DPP4 na membrana e diminuição da secreção da enzima para o plasma. Segundo Busso et al. (2005), a DPP4 plasmática também está diminuída em camundongos artríticos. No entanto, Suh et al. (2006) não constatarem diferenças dos níveis de atividade DPP4 no plasma de animais artríticos e controle. Mantle, Falkous e Walker (1999) também não observaram diferenças dos níveis de DPP4 plasmática entre pacientes com AR e controle.

A origem da DPP4 plasmática não é completamente entendida (LAMBEIR et al., 2003). O mecanismo mais aceito para explicar a liberação da DPP4 para o plasma é a proteólise de DPP4 de membranas celulares, que possivelmente ocorre por enzimas presentes no plasma (GORRELL; GYSBERS; MCCAUGHAN, 2001). A DPP4 está presente na membrana de diversas células, como monócitos/macrófagos, fibroblastos, neutrófilos, células endoteliais e epiteliais (BAUVOIS e DAUZONNE, 2006; LUAN e XU, 2007; OLIVO; TEIXEIRA; SILVEIRA, 2005; RIEMANN et al., 1997; SHIMIZU et al., 2002). Em células T e NK inativas há baixa da DPP4, mas esta expressão é rapidamente superregulada quando essas células são ativadas (CORDERO; SALGADO; NOGUEIRA, 2009). Acredita-se também que uma parte da DPP4 provenha de células T (CORDERO; SALGADO; NOGUEIRA, 2009; LAMBEIR et al., 2003). Estima-se que cerca de 90% da atividade DPP4 é derivada da molécula CD26/DPP4 de membrana (CORDERO; SALGADO; NOGUEIRA, 2009; GORRELL; GYSBERS; MCCAUGHAN, 2001) e os 10% restantes seriam moléculas não relacionadas à DPP4 e que apresentam atividade DPP4, como a DPP2 e a FAP- α (CORDERO; SALGADO; NOGUEIRA, 2009).

No presente estudo, os níveis de atividade DPP4 em amostras de plasma, líquido sinovial e FS e FM de membrana sinovial de animais artríticos sem tratamento não diferiram dos controles sem tratamento. Tem sido proposto que a DPP4 apresenta um efeito dual na AR, e os níveis da DPP4 podem depender da severidade da doença (BUSSO et al., 2005). De acordo com Busso et al. (2005), a DPP4 solúvel inibiria a produção de citocinas, e na membrana estimularia a imunidade celular na AR. Por um lado, níveis baixos de DPP4 são relacionados com a severidade da doença (BUSSO et al., 2005) e por outro, em modelo experimental de artrite a utilização de inibidores de DPP4 parece reduzir a progressão da doença (WILLIAMS et al., 2003). O presente estudo evidencia o aumento da DPP4 do plasma como uma das peculiaridades dos animais resistentes à indução de artrite. Esse aumento no plasma dos resistentes poderia estar relacionado ao aumento da clivagem de quimiocinas e citocinas séricas, diminuindo-as e, consequentemente, evitando o desencadeamento da resposta inflamatória.

5.8.3.2 A DPP4, o BV e o MTX

O BV aumentou e o MTX diminuiu a atividade DPP4 do plasma de animais normais e artríticos. No plasma de animais normais a administração conjunta de ambos resulta em predominância do efeito do MTX, ou seja, ocorre um decréscimo da atividade. O aumento plasmático da DPP4 causado pelo BV deve ser um reflexo da presença dessa atividade no próprio veneno. Lee et al. (2007) descreveram a presença de DPP4 no BV, sendo detectada também no presente estudo. No entanto, Suh et al. (2006) não encontraram aumento da atividade DPP4 no plasma de animais administrados com BV, mas esta discordância pode decorrer da quantidade de BV administrada e da duração do tratamento. A utilização conjunta de BV e MTX causou aumento da DPP4 da FS e da FM de membrana sinovial e não amenizou o edema apresentado por animais artríticos. Como já mencionado, a DPP4 de membrana poderia estimular a imunidade celular (BUSSO et al., 2005; OHNUMA et al., 2006) e, portanto, não seria indicada a utilização simultânea de ambos os agentes. Considerados conjuntamente, esses dados sugerem que o aumento de DPP4, tanto no plasma como na membrana sinovial, não tem relação direta com a manutenção do edema, mas deve ter relação com sua formação (e resistência à indução de artrite). Se há aumento das citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias substratos da DPP4 e há maior atividade DPP4 em contraposição, os níveis dessas citocinas podem ser mantidos sob controle. Ao contrário, a diminuição da atividade DPP4 no plasma relacionada com a diminuição do edema e associada ao tratamento com MTX nos artríticos possivelmente decorre de efeitos indiretos deste fármaco, causando diminuição dos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias substratos da DPP4, ou diminuindo a proliferação de células produtoras da enzima (dado o efeito citotóxico conhecido do MTX) e, por consequência, diminuição da secreção de DPP4 para a circulação.

Pouco se conhece sobre os efeitos do MTX sobre a DPP4. Olivo et al. (2008) mostraram que em macrófagos peritoneais elicitados de camundongos tratados com MTX há aumento da atividade DPP4 solúvel e de membrana, comparados com macrófagos residentes. No presente estudo também foi constatado aumento da atividade DPP4 em leucócitos mononucleares de animais artríticos e controles tratados com MTX (vide adiante, seção 5.8.5), mas não foram observadas alterações dos níveis de DPP4 na FS e FM da membrana sinovial e no líquido sinovial de animais controle e artríticos tratados somente com MTX, em comparação ao controle sem tratamento. Por sua vez, o BV aumentou a atividade DPP4 no líquido sinovial de animais artríticos, em comparação ao controle sem tratamento. A membrana sinovial é composta por sinoviócitos semelhantes a macrófagos, sinoviócitos semelhantes a fibroblastos, células NK (CHAN et al., 2008), macrófagos, células dendríticas, (MÜLLER-LADNER et al.,

2005), neutrófilos (WESTMAN; LUNDBERG; ERLANDSSON HARRIS, 2006) e células T e B (BRAND; KANG; ROSLONIEC, 2003). Então, a avaliação da atividade DPP4 nesta mistura tem caráter muito amplo, pois não permite evidenciar eventuais alterações em tipos celulares específicos.

O MTX causa diminuição da proliferação e recrutamento celular (CUTOLO et al., 2001), podendo promover a diminuição do número de células que expressam a DPP4 na membrana, como linfócitos e outras células imunes. Assim, a menor quantidade de células com atividade DPP4 de membrana resultaria em menor clivagem desta enzima para o plasma, explicando o seu menor teor no plasma de animais tratados com MTX. Além disso, considerando o decréscimo da atividade DPP4 no plasma de animais controle e artríticos tratados com MTX, é possível supor, como já mencionado, ou que há menor clivagem de citocinas e mediadores inflamatórios pelo decréscimo da atividade DPP4 (SEDO et al., 2005; WALSH et al., 1993) e, assim, o MTX seria um tratamento desvantajoso neste sentido, ou que, dada a menor produção de citocinas causada pelo MTX, o decréscimo da DPP4 não seria prejudicial, pois haveria concomitante decréscimo na quantidade de seus substratos como efeito do MTX.

Em animais tratados concomitantemente com BV e MTX, o aumento da DPP4 da fração de membrana da membrana sinovial é outra possível explicação para o decréscimo desta atividade no plasma, pois poderia estar havendo menor liberação de DPP4 da membrana para o plasma. Isso poderia decorrer de interações do MTX juntamente com o BV com enzimas plasmáticas responsáveis pela clivagem.

Outro mecanismo proposto para explicar a ação terapêutica do MTX é a inibição da adenosina desaminase (ADA) que consequentemente aumentaria a adenosina plasmática, causando imunossupressão por diminuir a proliferação celular e a produção de citocinas (CUTOLO et al., 2001). Neste sentido, sabe-se que a DPP4 de várias espécies de mamíferos se acopla a ADA, tornando-a mais efetiva (SEDO et al., 2005). No entanto, no presente estudo não é plausível supor que a DPP4 diminui por não ter a ADA para se ligar, considerando-se que em ratos foi descrita a incapacidade da DPP4 em se ligar a ADA (IWAKI-EGAWA; WATANABE; FUJIMOTO, 1997).

5.8.4 POP

Um estudo realizado por Mantle, Falkous e Walker (1999) cita o possível envolvimento da POP no processamento antigênico na AR, no qual esta atividade mostrou-se elevada no líquido sinovial de pacientes com esta doença, comparativamente a pacientes com osteoartrite. Porém, não houve diferença desta atividade do plasma entre estes grupos (MANTLE; FALKOUS; WALKER, 1999). A ausência de detecção em níveis consistentes e reprodutíveis da atividade POP desestimulou a continuidade de sua investigação no presente estudo.

5.8.5 Aminopeptidases e leucócitos mononucleares

A avaliação de atividades enzimáticas de leucócitos entre grupos controle e artríticos e grupos com ou sem tratamento é muito delicada, pois existem diferentes tipos de leucócitos e cada qual pode apresentar uma proporção e/ou alteração distinta de acordo com uma situação. A DPP4, por exemplo, pode apresentar diferentes funções de acordo com o tipo celular ou sua presença no meio intra ou extracelular (BOONACKER e VAN NOORDEN, 2003).

A atividade APB na FS de leucócitos mononucleares foi surpreendente. Houve um decréscimo dessa atividade em todos os grupos controle e artríticos com e sem tratamento, em comparação com animais controle não tratados. Até o momento, não existem dados na literatura que justifiquem as alterações observadas. Sabe-se que a APB apresenta atividade LTA_4 hidrolase e que *in vitro* a LTA_4 hidrolase apresenta atividade APB (GRICE et al., 2008; KIRKLAND et al., 2008; LIANG et al., 2007; MURPHY e GIJÓN, 2007; PHAM et al., 2007). As manipulações para a indução da artrite e para os tratamentos dos animais poderiam ter provocado o aumento da LTA_4 , sendo que a LTA_4 hidrolase é inativada pelo seu substrato, fenômeno conhecido como inativação suicida (HAEGGSTRÖM, 2000), o que consequentemente causaria o decréscimo da APB. Além disso, os leucócitos poderiam ser mais suscetíveis ao decréscimo de LTA_4 hidrolase, por serem os principais produtores de LTB_4 . Outro resultado surpreendente foi o aumento da atividade APB na FM de leucócitos mononucleares de animais resistentes e de controles tratados com MTX, o qual pode ser outro mecanismo de resistência à artrite. É notável que a maior atividade de APB na FM de leucócitos mononucleares ocorre concomitantemente com uma menor atividade no líquido sinovial (e uma tendência de decréscimo também no plasma) nos animais resistentes, sugerindo um significado primordial da condição de estabilidade desta enzima na membrana destas células para o desenvolvimento da doença.

A atividade APN de leucócitos mononucleares parece apresentar um padrão de aumento na FM e decréscimo na FS ou vice-versa. Em animais controles a APN parece diminuir na FS e aumentar na FM, enquanto que em animais artríticos ocorre o inverso, em comparação com animais controle não tratados. Assim, poderia estar havendo uma translocação da proteína da membrana para o citoplasma ou do citoplasma para a membrana. Além disso, as alterações opostas de controles e artríticos podem decorrer, como já mencionado, dos diferentes tipos celulares presentes em cada tratamento. Não foram encontrados dados na literatura que investigassem a APN em células de sangue periférico na artrite. Proost et al. (2007) descrevem que a quimiocina CXCL11 é clivada pela APN. Quando intacta, a CXCL11 atrai linfócitos e células NK para o local da inflamação. No presente estudo observou-se um decréscimo da atividade APN na FM de leucócitos de animais artríticos, o qual poderia estar relacionado a uma menor clivagem de CXCL11 e, conseqüentemente, promover a quimiotaxia. No entanto, paradoxalmente, a utilização de inibidores da APN é descrita como benéfica na diminuição de inflamações (THANAWALA; KADAM; GHOSH, 2008; WANG et al., 2008; ZHANG e XU, 2008). Então, a APN poderia ter um efeito dual na AR dependendo da sua localização, assim como a DPP4.

A atividade DPP4 tem sido descrita como elevada em células ativadas de sangue periférico. Ellingsen et al. (2007) observaram, por citometria de fluxo, um aumento da densidade de CD26 em monócitos e linfócitos T CD4+, coletados do sangue periférico de pacientes com AR. Além disso, há um decréscimo da CD26 em monócitos de pacientes tratados com MTX que apresentam melhora, mas o mesmo não ocorre em pacientes não responsivos ao tratamento. No presente estudo, observou-se um decréscimo da atividade CD26/DPP4 em FM de leucócitos mononucleares de animais artríticos e não um aumento, como seria de se esperar em conformidade com os dados da literatura. Segundo Busso et al. (2005), camundongos *knockout* para a CD26/DPP4 apresentam sintomas exacerbados de artrite após a indução com adjuvante, em comparação com ratos sem alterações genéticas, mas a utilização de inibidores da DPP4 é benéfica nesses animais. Busso et al. (2005) relata que os efeitos benéficos de inibidores da DPP4 podem estar relacionados à inibição de moléculas com atividade DPP4, como a DPP8 e DPP9. Não se conhece os substratos naturais da DPP8 e da DPP9, mas análises por *Northern Blot* indicam que a expressão de mRNA é abundante em células da linhagem leucocítica e em tecidos tumorais como melanoma (GORREL, 2005). Já Ansorge et al. (2010) sugerem que a DPP8 e DPP9 regulam a progressão do ciclo celular e a produção de citocinas. Além disso, no presente estudo, em animais artríticos o tratamento com BV normalizou os níveis de DPP4 e os tratamentos com MTX e com BV e MTX causaram

aumento da atividade DPP4 na FM de leucócitos mononucleares. Aparentemente, os tratamentos apresentam mecanismos compensatórios à alteração da atividade DPP4. Diversas moléculas com atividade DPP4 já foram descritas, como a DPP8 e DPP9 (GORRELL, 2005; PITMAN et al., 2009; SEDO et al., 2005) e, então, é necessário reconhecer os tipos de moléculas com atividade DPP4 e qual a importância de cada uma para prosseguir com investigações mais complexas sobre os efeitos de tratamentos medicamentosos que interfiram com a atividade DPP4.

5.9 LEUCÓCITOS MONONUCLEARES INCUBADOS COM BV E MTX

O MTX e o BV causaram maior nível de morte celular conforme o aumento das concentrações utilizadas nas incubações.

A conhecida citotoxicidade do MTX possivelmente foi responsável pelo decréscimo de 55% da viabilidade celular de leucócitos mononucleares incubados com dose de 5µg/mL.

Os efeitos do BV descritos na literatura são contraditórios, como já mencionado. A incubação de leucócitos mononucleares com BV em concentração de 5µg/mL causou morte de 100% das células. Park et al. (2004) realizaram incubações de macrófagos RAW 264.7 e monócitos THP-1 com BV em concentrações de 5, 0,1 e 0,5µg/mL e não observaram efeitos citotóxicos. No entanto, Stuhlmeier (2007) afirma que leucócitos mononucleares e polimorfonucleares, fibroblastos dermais, sinoviócitos e células Hep G2 são incapazes de manter a integridade da membrana celular em concentrações de 10µg/mL de BV, e essa incapacidade é dependente da concentração de BV. A melitina, principal componente do BV, apresenta a capacidade de causar ruptura da membrana celular por atuar como um detergente (STUHLMEIER, 2007). Os níveis de viabilidade celular observados apresentam uma relação inversa com essa propriedade do BV (apresentam-se menores conforme as concentrações de BV aumentam).

A ausência de diferença estatística significativa das atividades enzimáticas de células incubadas com BV ou MTX, em comparação com as células incubadas com salina 0,9%, não era esperada, visto que tanto o BV como o MTX causam alterações dessas atividades *in vivo* e também tem efeito direto, como o observado em plasma incubado com estes agentes. O tempo de incubação de 1h pode ter sido insuficiente para promover alterações das enzimas estudadas. Além disso, não se pode descartar a possibilidade dos efeitos observados *in vivo* em

leucócitos mononucleares resultarem de efeitos indiretos, ações sistêmicas causadas pelos tratamentos.

5.10 EFEITO DIRETO DO BV E DO MTX SOBRE AS ATIVIDADES AMINOPEPTIDÁSICAS DO PLASMA

Não foram encontrados dados na literatura sobre efeitos diretos do BV ou MTX sobre as atividades enzimáticas sob estudo.

O BV causou um decréscimo de cerca de 50% da atividade APN na concentração de 5000µg/mL e não alterou a atividade APB no plasma. A menor atividade pode ser indicativa de que no BV há algum inibidor da APN, mas não da APB. Porém, as alterações ocorridas na APN e APB plasmáticas após o tratamento *in vivo* com BV não correspondem às ocorridas nos incubados. Após o tratamento, houve um decréscimo da APB plasmática em animais controle e não houve alteração na atividade APN de controles e artríticos. Fatores sistêmicos e/ou dose de BV utilizado no tratamento podem ter causado essa divergência de resultados. Já a atividade DPP4, como já descrito anteriormente, está presente no BV (LEE et al., 2007). No presente estudo, foi comprovado que também está presente no lote de BV utilizado. Assim, o aumento da atividade DPP4 no plasma após o tratamento *in vivo* com BV reforça a presença desta atividade no BV.

No presente estudo, o MTX causou inibição de 50% e 100% em todas as enzimas estudadas (APB, APN e DPP4) no plasma nas concentrações de 500µg MTX/mL e de 5000µg MTX/mL, respectivamente. Isso pode indicar uma inibição direta do MTX sobre as atividades aminopeptidásicas no plasma, visto que não há interferência de fatores sistêmicos. O MTX também causou decréscimo das atividades APB e a DPP4 plasmáticas após o tratamento *in vivo* nos animais, o que reforça a hipótese de inibição enzimática pelo MTX. No entanto, o mesmo não foi observado com a APN, após o tratamento *in vivo*. Essa ausência de alteração de atividade APN poderia decorrer da quantidade de MTX administrado no tratamento não ter sido suficiente para causar a inibição, ou devido a possíveis fatores sistêmicos interferirem na interação entre as duas moléculas. Xinqiang et al. (2010) descrevem que baixas doses de MTX causam aumento de linfócitos T reguladores e supressão de células T auxiliaadoras e de citocinas pró-inflamatórias. Estes efeitos são semelhantes aos observados com a utilização de inibidores duais para a APN e DPP4 (ANSORGE et al., 2009). Para comprovar ou não a

inibição de aminopeptidases pelo MTX, outras abordagens complementares teriam de ser adotadas como, por exemplo, uma eletroforese capilar em amostra de MTX incubada com aminopeptidases isoladas, para verificar se há interação entre as moléculas e descartar a possibilidade de fatores plasmáticos atuarem no decréscimo das atividades catalíticas. Caso seja confirmada a ação do MTX sobre as aminopeptidases, seria aberto um novo rumo para a terapêutica e estudo dos mecanismos de ação do MTX.

6 CONCLUSÕES

- O método de Cremer (1988) (ii), com modificação da via de administração, é mais efetivo em comparação com outros protocolos avaliados, em termos de indução de edema articular das patas posteriores (e o menos estressante) em ratos Wistar.
- 40% dos animais submetidos a este regime de indução são resistentes, ou seja, não desenvolvem edema articular das patas posteriores.
- Animais artríticos apresentam menor massa corporal.
- O aumento do título de anticorpos anticolágeno tipo II no plasma é uma consequência consistente da indução pelo método adotado no presente estudo, mas não é um marcador da inflamação articular.
- O TNF- α sérico distingue animais artríticos sem tratamento de controles e artríticos tratados com BV e/ou MTX.
- As atividades APB, APN e DPP4 são expressas nas frações solúvel e de membrana solubilizada da membrana sinovial e de leucócitos mononucleares, no líquido sinovial e no plasma de animais normais e artríticos.
- A atividade POP é indetectável em frações solúvel e de membrana solubilizada da membrana sinovial, no líquido sinovial e no plasma de animais normais e artríticos.
- Os animais resistentes à indução de artrite apresentam decréscimo da atividade APB no líquido sinovial e na FS de leucócitos mononucleares e aumento na FM de leucócitos mononucleares e de atividade DPP4 no plasma.
- O aumento da atividade APN da fração solúvel da membrana sinovial e do líquido sinovial é um novo potencial “marcador” desta doença, relacionado com o edema.
- Os tratamentos com BV e/ou MTX reverteram o aumento de TNF- α causado pela artrite induzida por colágeno tipo II.
- O MTX, mas não o BV, ameniza o edema articular das patas posteriores e a nocicepção típicas dos ratos artríticos.
- O MTX diminui diretamente *in vitro* as atividades APN, APB e DPP4 do plasma.
- BV diminui diretamente *in vitro* a atividade APN do plasma.
- BV ou MTX não afetaram diretamente *in vitro* as atividades APN, APB e DPP4 de leucócitos mononucleares isolados de animais controles normais.

• Os tratamentos com BV e/ou com o MTX modulam distintamente *in vivo* as atividades APB, APN e DPP4 expressas nas frações solúvel e de membrana solubilizada da membrana sinovial e de leucócitos mononucleares, no líquido sinovial e no plasma de animais normais e artríticos:

- O decréscimo da atividade APB no líquido sinovial e no plasma de ratos artríticos pelo MTX poderia ser um dos mecanismos responsáveis pelo efeito benéfico deste medicamento na artrite, e a diminuição da APB da FS de leucócitos mononucleares em todos os grupos pode decorrer do aumento da LTA4 e sua inativação suicida;
- O decréscimo da atividade APN na fração membranal da membrana sinovial e a normalização do nível desta atividade na fração solúvel da membrana sinovial e no líquido sinovial pelo BV poderiam contribuir na melhora da inflamação e nocicepção nos artríticos. Em leucócitos mononucleares o aumento da APN na FS e diminuição na FM, ou vice-versa, pode indicar a translocação da proteína da membrana para o citoplasma ou do citoplasma para a membrana; a APN pode ter um efeito dual na AR dependendo de sua localização, pois apresentou-se reduzida na FM de leucócitos mononucleares.
- O aumento da atividade DPP4 no plasma e no líquido sinovial pelo BV, seja por ação do veneno no organismo ou pela presença desta atividade enzimática no próprio veneno, bem como o decréscimo da atividade DPP4 no plasma pelo MTX devem, respectivamente, no primeiro caso gerar a diminuição direta dos níveis de citocinas e quimiocinas, mas sem repercussão significativa sobre o edema formado e, no segundo, ser consequência da diminuição dos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e/ou da proliferação de células produtoras da enzima pelo MTX, com redução do edema; a diminuição da atividade DPP4 na FM de leucócitos mononucleares pode decorrer da atuação de proteínas com atividade DPP4 na AR e os tratamentos com BV e/ou MTX reverterem essa diminuição.
- A utilização conjunta de MTX e BV, ao aumentar a APB e APN no plasma e a DPP4 de membrana, pode causar aumento de citocinas e mediadores pró-inflamatórios e estimular a imunidade celular, o que explicaria a ausência de efeito sobre o edema artrítico e sobre os níveis de APN na FM de leucócitos mononucleares. No entanto, o tratamento conjunto foi capaz de reverter a diminuição da DPP4 na FM de leucócitos mononucleares.

7 PERSPECTIVAS

Algumas perspectivas para novas abordagens decorrem do presente estudo, entre as quais:

- avaliação do paralelismo entre alterações das atividades APB e LTA₄ hidrolase no modelo experimental de CIA;
- caracterização cinética dos efeitos inibitórios do (i) MTX sobre APN, APB e DPP4 do plasma e do (ii) BV sobre APN do plasma;
- avaliação de APB, APN e DPP4 em plasma sanguíneo e sobrenadante e pellet celular solubilizado de líquido sinovial (e, eventualmente, em membrana sinovial) de pacientes com inflamação articular crônica e sob acompanhamento clínico pelo Hospital de Basurto (Bilbao, Espanha);
- avaliação de efeito antiedematogênico de inibidores de APB e APN no modelo experimental de CIA;
- avaliação de efeito antiedematogênico de anticorpos anti-APB e anti-APN no modelo experimental de CIA;
- separação, purificação e caracterização da DPP4 do BV;
- efeito de anticitocinas, anti-células B, inibidores de co-estimulação linfocitária e anti-moléculas de adesão sobre APB, APN e DPP4 no modelo experimental de CIA.

REFERÊNCIAS*

AHN, K. S.; AGGARWAL, B. B. Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1056, p. 218-233, 2005.

AL-ABD, A. M. et al. Nimesulide improves the disease modifying anti-rheumatic profile of methotrexate in mice with collagen-induced arthritis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 644, n. 1-3, p. 245-250, 2010.

ALPONTI, R. F.; SILVEIRA, P. F. Neutral aminopeptidase and dipeptidyl peptidase IV activities in plasma of monosodium glutamate obese and food-deprived rats. **Obesity (Silver Spring)**, n. 18, v. 7, p. 1312-1317, 2010.

ANSORGE, S. et al. Recent insights into the role of dipeptidyl aminopeptidase IV (DPIV) and aminopeptidase N (APN) families in immune functions. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 47, n. 3, p. 253-261, 2009.

AXELSSON, J. et al. Cytokines in blood from septic patients interact with surface-immobilized heparin. **A. S. A. I. O. J.**, v. 56, n. 1, p. 48-51, 2010.

BAEK, Y. H. et al. Antinociceptive effect and the mechanism of bee venom acupuncture (Apipuncture) on inflammatory pain in the rat model of collagen-induced arthritis: Mediation by alpha2-Adrenoceptors. **Brain Res.**, v. 1073-1074, p. 305-310, 2006.

BALOGH, A. et al. Aminopeptidase B: a processing enzyme secreted and associated with the plasma membrane of rat pheochromocytoma (PC12) cells. **J. Cell Sci.**, v. 111, n. 2, p. 161-169, 1998.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. London: Academic Press, 1998.

BAUVOIS, B.; DAUZONNE, D. Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. **Med. Res. Rev.**, v. 26, n. 1, p. 88-130, 2006.

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

BERGMAYER, H. U.; BRENT, E. **Methods in enzymatic analysis**. London: Academic Press, 1972. v. 2.

BÉRTOLO, M. B. et al. Atualização do consenso brasileiro no diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 47, n. 3, p. 151-159, 2007.

BLÄSS, S.; ENGEL, J. M.; BURMESTER, G. R. The immunologic homunculus in rheumatoid arthritis. A new viewpoint of immunopathogenesis in rheumatoid arthritis and therapeutic consequences. **Z. Rheumatol.**, v. 60, n. 1, p. 1-16, 2001.

BOONACKER, E.; VAN NOORDEN, C. J. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 82, n. 2, p. 53-73, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND, D. D.; KANG, A. H.; ROSLONIEC, E. F. Immunopathogenesis of collagen arthritis. **Springer Semin. Immunopathol.**, v. 25, n. 1, p. 3-18, 2003.

BRAND, D. D.; LATHAM, K. A.; ROSLONIEC, E. F. Collagen-induced arthritis. **Nat. Protoc.**, v. 2, n. 5, p. 1269-1275, 2007.

BUSSO, N. et al. Circulating CD26 is negatively associated with inflammation in human and experimental arthritis. **Am. J. Pathol.**, v. 166, n. 2, p. 433-442, 2005.

CHAN, A. et al. Mediation of the proinflammatory cytokine response in rheumatoid arthritis and spondylarthritis by interactions between fibroblast-like synoviocytes and natural killer cells. **Arthritis Rheum.**, v. 58, n. 3, p. 707-717, 2008.

CHEN, H. S. et al. Pivotal involvement of neurogenic mechanism in subcutaneous bee venom-induced inflammation and allodynia in unanesthetized conscious rats. **Exp. Neurol.**, v. 200, n. 2, p. 386-391, 2006.

CHOMARAT, P. et al. Contribution of IL-1, CD14, and CD13 in the increased IL-6 production induced by in vitro monocyte-synoviocyte interactions. **J. Immunol.**, v. 155, n. 7, p. 3645-3652, 1995.

COPE, A. P. Exploring the reciprocal relationship between immunity and inflammation in chronic inflammatory arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 6, n. 42, p. 716-731, 2003.

CORDERO, O. J.; SALGADO, F. J.; NOGUEIRA, M. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 58, n. 11, p. 1723-1747, 2009.

CREMER, M. Type II collagen-induced arthritis in rats. In: DIAMOND, H. S.; GREENWALD, R. A. **Handbook of animal model for the rheumatic diseases**. Boca Raton: CRC Press, 1988. v. 1, p. 17-27.

CREMER, M. A.; ROSLONIEC, E. F.; KANG, A. H. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. **J. Mol. Med.**, v. 76, n. 3-4, p. 275-288, 1998.

CUNNINGHAM, D. F.; O'CONNOR, B. Proline specific peptidases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1343, n. 2, p. 160-186, 1997.

CUTOLO, M. et al. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 60, n. 8, p. 729-735, 2001.

CUTOLO, M.; STRAUB, R. H. Insights into endocrine-immunological disturbances in autoimmunity and their impact on treatment. **Arthritis Res. Ther.**, v. 11, n. 2, p. 218-224, 2009.

CUZZOCREA, S. et al. Synergistic interaction between methotrexate and a superoxide dismutase mimetic: pharmacologic and potential clinical significance. **Arthritis Rheum.**, v. 52, n. 12, p. 3755-3760, 2005.

DOAN, T.; MASSAROTTI, E. Rheumatoid arthritis: an overview of new and emerging therapies. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 45, n. 7, p. 751-762, 2005.

DRAG, M.; GRZYWA, R.; OLEKSYSZYN, J. Novel hydroxamic acid-related phosphinates: inhibition of neutral aminopeptidase N (APN). **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 17, n. 6, p. 1516-1519, 2007.

ELLINGSEN, T. et al. In active chronic rheumatoid arthritis, dipeptidyl peptidase IV density is increased on monocytes and CD4(+) T lymphocytes. **Scand. J. Immunol.**, v. 66, n. 4, p. 451-457, 2007.

FAN, P. T.; LEONG, K. H. The use of biological agents in the treatment of rheumatoid arthritis. **Ann. Acad. Med. Singapore**, v. 36, pt. 2, p. 128-134, 2007.

FORD-HUTCHINSON, A. W. Leukotriene B4 in inflammation. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 1990.

FOULON, T.; CADEL, S.; COHEN, P. Amino-peptidase B (EC 3.4.11.6). **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 31, n. 7, p. 747-750, 1999.

FUKASAWA, K. et al. Amino-peptidase N (APN/CD13) is selectively expressed in vascular endothelial cells and plays multiple roles in angiogenesis. **Cancer Lett.**, v. 243, n. 1, p. 135-143, 2006.

GABRIEL, S. E. Why do people with rheumatoid arthritis still die prematurely? **Ann. Rheum. Dis.**, v. 67, p. iii30-34, 2008. Suppl. 3.

GAD, S. C. The mouse: toxicology. In: _____. **Animal models in toxicology**. Boca Raton: CRC Press, 2007a. p. 67.

GAD, S. C. The rat: pathology. In: _____. **Animal models in toxicology**. Boca Raton: CRC Press, 2007b. p. 193-216.

GORRELL, M. D.; GYSBERS, V.; MCCAUGHAN, G. W. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. **Scand. J. Immunol.**, v. 54, n. 3, p. 249-264, 2001.

GRANADO, M. et al. Experimental arthritis inhibits the insulin-like growth factor-I axis and induces muscle wasting through cyclooxygenase-2 activation. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 292, n. 6, p. E1656-E1665, 2007.

GRICE, C. A. et al. Identification of a potent, selective, and orally active leukotriene a4 hydrolase inhibitor with anti-inflammatory activity. **J. Med. Chem.**, v. 51, n. 14, p. 4150-4169, 2008.

GRIFFITHS, M. M. Immunogenetics of collagen-induced arthritis in rats. **Int. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 1, p. 1-15, 1988.

GUERRERO, A. T. et al. Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 84, n. 2, p. 244-251, 2006.

HAEGGSTRÖM, J. Z. Structure, function, and regulation of leukotriene A4 hydrolase. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.**, v. 161, n. 2, pt 2, p. S25-31, 2000.

HAEGGSTRÖM, J. Z.; THOLANDER, F.; WETTERHOLM, A. Structure and catalytic mechanisms of leukotriene A4 hydrolase. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 83, n. 3, p. 198-202, 2007.

HALLETT, M. B.; WILLIAMS, A. S. Stopping the traffic: a route to arthritis therapy. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, n. 10, p. 2650-2653, 2008.

HARINGMAN, J. J. et al. Chemokine and chemokine receptor expression in paired peripheral blood mononuclear cells and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and reactive arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 65, n. 3, p. 294-300, 2006.

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

HARTOG, A.; HULSMAN, J.; GARSSSEN, J. Locomotion and muscle mass measures in a murine model of collagen-induced arthritis. **B.M.C. Musculoskelet Disord**, v. 10, p. 59-65, 2009.

HATTORI, A.; TSUJIMOTO, M. Processing of antigenic peptides by aminopeptidases. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n. 6, p. 777-780, 2004.

HIETALA, M. A. et al. Complement activation by both classical and alternative pathways is critical for the effector phase of arthritis. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, n. 4, p. 1208-1216, 2004.

HOLMDAHL, R. et al. Arthritis induced in rats with nonimmunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis. **Immunol. Rev.**, v. 184, p. 184-202, 2001.

HOLMDAHL R. Dissection of the genetic complexity of arthritis using animal models. **Immunol. Lett.**, v. 103, n. 2, p. 86-91, 2006.

HONG, S. J. et al. Bee venom induces apoptosis through caspase-3 activation in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. **Toxicon**, v. 46, n. 1, p. 39-45, 2005.

HOSOKAWA, R. et al. Lactate dehydrogenase isoenzymes in matrix vesicles (review). **Bone Miner.**, v. 17, n. 2, p. 177-181, 1992.

IMBODEN, J. B. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 4, p. 417-434, 2009.

IWAKI-EGAWA, S.; WATANABE, Y.; FUJIMOTO, Y. CD26/dipeptidyl peptidase IV does not work as an adenosine deaminase-binding protein in rat cells. **Cell Immunol.**, v. 178, n. 2, p. 180-186, 1997.

IWATA, S. et al. CD26/dipeptidyl peptidase IV differentially regulates the chemotaxis of T cells and monocytes toward RANTES: possible mechanism for the switch from innate to acquired immune response. **Int. Immunol.**, v. 11, n. 3, p. 417-426, 1999.

IZAL, I. et al. IGF-1 gene therapy to protect articular cartilage in a rat model of joint damage. **Arch. Orthop. Trauma Surg.**, v. 128, n. 2, p. 239-247, 2008.

JANG, H. S. et al. Effects of bee venom on the pro-inflammatory responses in RAW264.7 macrophage cell line. **J. Ethnopharmacol.**, v. 99, n. 1, p. 157-160, 2005.

KANNAN, K.; ORTMANN, R. A.; KIMPEL, D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. **Pathophysiology**, v. 12, n. 3, p. 167-181, 2005.

KATARANOVSKI, M. et al. Peripheral blood granulocyte activity following contact sensitization of rats with dinitrochlorobenzene. **Toxicology**, v. 162, n. 2, p. 121-136, 2001.

KENIG, M. et al. Identification of the heparin-binding domain of TNF-alpha and its use for efficient TNF-alpha purification by heparin-Sepharose affinity chromatography. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed Life Sci.**, v. 867, n. 1, p. 119-125, 2008.

KIRKLAND, T. A. et al. Synthesis of glutamic acid analogs as potent inhibitors of leukotriene A4 hydrolase. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, n. 9, p. 4963-4983, 2008.

KITSIS, E.; WEISSMANN, G. The role of the neutrophil in rheumatoid arthritis. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 265, p. 63-72, 1991.

KLARESKOG, L. et al. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. **Lancet**, v. 363, n. 9410, p. 675-681, 2004.

KOBAYASHI, S. et al. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of environmental factors. **F. E. B. S. J.**, v. 275, n. 18, p. 4456-4462, 2008.

KURYŁOWICZ, A.; NAUMAN, J. The role of nuclear factor-kappaB in the development of autoimmune diseases: a link between genes and environment. **Acta Biochim. Pol.**, v. 55, n. 4, p. 629-647, 2008.

KWON, Y. B. et al. Antinociceptive effects of bee venom acupuncture (apipuncture) in rodent animal models: a comparative study of acupoint versus non-acupoint stimulation. **Acupunct Electrother. Res.**, v. 26, n. 1-2, p. 59-68, 2001.

KWON, Y. B. et al. The water-soluble fraction of bee venom produces antinociceptive and anti-inflammatory effects on rheumatoid arthritis in rats. **Life Sci.**, v. 71, n. 2, p. 191-204, 2002.

LAMBEIR, A. M. et al. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v. 40, n. 3, p. 209-294, 2003.

LEE, J. H. et al. Bee venom pretreatment has both an antinociceptive and anti-inflammatory effect on carrageenan-induced inflammation. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 63, n. 3, p. 251-259, 2001.

LEE, V. S. et al. Molecular cloning of the precursor polypeptide of mastoparan B and its putative processing enzyme, dipeptidyl peptidase IV, from the black-bellied hornet, *Vespa basalis*. **Insect Mol. Biol.**, v. 16, n. 2, p. 231-237, 2007.

LI, P. et al. Compartmentalization of class II antigen presentation: contribution of cytoplasmic and endosomal processing. **Immunol. Rev.**, v. 207, p. 206-217, 2005.

LIANG, A. M. et al. Development of a homogeneous time-resolved fluorescence leukotriene B₄ assay for determining the activity of leukotriene A₄ hydrolase. **J. Biomol. Screen.**, v. 12, n. 4, p. 536-545, 2007.

LÖWENBERG, B. et al. Phase I/II clinical study of Tosedostat, an inhibitor of aminopeptidases, in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. **J. Clin. Oncol.**, n. 28, v. 28, p. 4333-4338, 2010.

LUAN, Y.; XU, W. The structure and main functions of aminopeptidase N. **Curr. Med. Chem.**, v. 14, n. 6, p. 639-647, 2007.

MACKAY, I. R.; ROWLEY, M. J. Autoimmune epitopes: autoepitopes. **Autoimmun. Rev.**, v. 3, n. 7-8, p. 487-492, 2004.

MAINI, R. N. et al. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 41, n. 9, p. 1552-1563, 1998.

MALDONADO, C.; CURI, R. **Como Cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

MANKAN, A. K. et al. NF-kappaB regulation: the nuclear response. **J. Cell Mol. Med.**, v. 13, n. 4, p. 631-643, 2009.

MANTLE, D.; FALKOUS, G.; WALKER, D. Quantification of protease activities in synovial fluid from rheumatoid and osteoarthritis cases: comparison with antioxidant and free radical damage markers. **Clin. Chim. Acta**, v. 284, n. 1, p. 45-58, 1999.

MCINNES, I. B.; STURROCK, R. D. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. In: HENDERSON, B.; EDWARDS, J. C. W.; PETTIPHER, E. R. **Mechanisms and models in rheumatoid arthritis**. London: Academic Press Inc., 1995. p. 3-24.

MIANTREX: metotrexato. Responsável técnico José Francisco Bomfim. Bentley, Austrália: Pfizer, 2005. Bula de remédio.

MIRSHAFIEY, A. et al. Design of a new line in treatment of experimental rheumatoid arthritis by artesunate. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 28, n. 3, p. 397-410, 2006.

MORGAN, K. What do anti-collagen antibodies mean? **Ann. Rheum. Dis.**, v. 49, n. 1, p. 62-65, 1990.

MÜLLER-LADNER, U. et al. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. **Nat. Clin. Pract. Rheumatol.**, v. 1, n. 2, p. 102-110, 2005.

MURPHY, R. C.; GIJÓN, M. A. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. **Biochem. J.**, v. 405, n. 3, p. 379-395, 2007.

MYERS, L. K. et al. Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. **Life Sci.**, v. 61, n. 19, p. 1861-1878, 1997.

NAKAMURA, R. M. Progress in the use of biochemical and biological markers for evaluation of rheumatoid arthritis. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 14, n. 6, p. 305-313, 2000.

NANDAKUMAR, K. S. Pathogenic antibody recognition of cartilage. **Cell Tissue Res.**, v. 339, n. 1, p. 213-220, 2010.

NEUMILLER, J. J.; WOOD, L.; CAMPBELL R. K. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Pharmacotherapy**, v. 30, n. 5, p. 463-484, 2010.

OHNUMA, K. et al. T-cell activation via CD26 and caveolin-1 in rheumatoid synovium. **Mod. Rheumatol.**, v. 16, n. 1, p. 3-13, 2006.

OLIVO, R. A.; TEIXEIRA, C. F.; SILVEIRA, P. F. Representative aminopeptidases and prolyl endopeptidase from murine macrophages: comparative activity levels in resident and elicited cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 69, n. 10, p. 1441-1450, 2005.

OLIVO, R. A. et al. Methotrexate and cyclosporine treatments modify the activities of dipeptidyl peptidase IV and prolyl oligopeptidase in murine macrophages. **Clin. Dev. Immunol.**, v. 2008, p. 1-10, 2008.

PANAYI, G. S. B cells: a fundamental role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? **Rheumatology (Oxford)**, v. 44, n. S2, p. ii3-ii7, 2005.

PARK, H. J. et al. Antiarthritic effect of bee venom: inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF-kappaB through interaction with the p50 subunit. **Arthritis Rheum.**, v. 50, n. 11, p. 3504-3515, 2004.

PASPARAKIS, M. Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, n. 11, p. 778-788, 2009.

PENNING, T. D. et al. Synthesis of potent leukotriene A(4) hydrolase inhibitors. Identification of 3-[methyl[3-[4-(phenylmethyl)phenoxy]propyl]amino]propanoic acid. **J. Med. Chem.**, v. 45, n. 16, p. 3482-3490, 2002.

PHAM, V. L. et al. Aminopeptidase B, a glucagon-processing enzyme: site directed mutagenesis of the Zn²⁺-binding motif and molecular modelling. **B. M. C. Biochem.**, v. 8, p. 21-41, 2007.

PITMAN, M. R. et al. Dipeptidyl peptidase 8 and 9--guilty by association? **Front Biosci.**, v. 14, p. 3619-3633, 2009.

PRAKKEN, B. et al. Heat shock proteins in juvenile idiopathic arthritis: keys for understanding remitting arthritis and candidate antigens for immune therapy. **Curr. Rheumatol. Rep.**, v. 4, n. 6, p. 466-473, 2002.

PROOST, P. et al. Proteolytic processing of CXCL11 by CD13/aminopeptidase N impairs CXCR3 and CXCR7 binding and signaling and reduces lymphocyte and endothelial cell migration. **Blood**, v. 110, n. 1, p. 37-44, 2007.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RAVELLI, A.; MARTINI, A. Juvenile idiopathic arthritis. **Lancet**, v. 369, n. 9563, p. 767-778, 2007.

REINHOLD, D. et al. Dual inhibition of dipeptidyl peptidase IV and aminopeptidase N suppresses inflammatory immune responses. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1110, p. 402-409, 2007.

RIEMANN, D. et al. Induction of aminopeptidase N/CD13 on human lymphocytes after adhesion to fibroblast-like synoviocytes, endothelial cells, epithelial cells, and monocytes/macrophages. **J. Immunol.**, v. 158, n. 7, p. 3425-3432, 1997.

ROH, D. H. et al. Acupoint stimulation with diluted bee venom (apipuncture) alleviates thermal hyperalgesia in a rodent neuropathic pain model: involvement of spinal alpha 2-adrenoceptors. **J. Pain**, v. 5, n. 6, p. 297-303, 2004.

ROUBENOFF, R. Rheumatoid cachexia: a complication of rheumatoid arthritis moves into the 21st century. **Arthritis Res. Ther.**, v. 11, n. 2, p. 108, 2009.

RUIZ-ORTEGA, M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J. The regulation of the inflammatory response through nuclear factor-kappaB pathway by angiotensin IV extends the role of the renin angiotensin system in cardiovascular diseases. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 17, n. 1, p. 19-25, 2007.

SAINI, S. S.; PETERSON, J. W.; CHOPRA, A. K. Melittin binds to secretory phospholipase A2 and inhibits its enzymatic activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 238, n. 2, p. 436-442, 1997.

SAMUELSSON, B. et al. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. **Science**, v. 237, n. 4819, p. 1171-1176, 1987.

SATO, Y. Role of aminopeptidase in angiogenesis. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n. 6, p. 772-776, 2004.

SAVEANU, L. et al. Complexity, contradictions, and conundrums: studying post-proteasomal proteolysis in HLA class I antigen presentation. **Immunol. Rev.**, v. 207, p. 42-59, 2005.

SCHEPP, C. P. et al. Autoantibodies in juvenile idiopathic arthritis: glucose-6-phosphate isomerase is not a specific target. **J. Rheumatol.**, v. 31, n. 8, p. 1630-1638, 2004.

SEDO, A. et al. Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologs: contributing factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? **Arthritis Res. Ther.**, v. 7, n. 6, p. 253-269, 2005.

SHIMIZU, T. et al. CD13/aminopeptidase N-induced lymphocyte involvement in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 46, n. 9, p. 2330-2338, 2002.

SIMJEE, S. U. et al. Quantitative gait analysis as a method to assess mechanical hyperalgesia modulated by disease-modifying antirheumatoid drugs in the adjuvant-induced arthritic rat. **Arthritis Res. Ther.**, v. 9, n. 5, p. R91-R97, 2007.

SOKKA, T.; ABELSON, B.; PINCUS, T. Mortality in rheumatoid arthritis: 2008 update. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v. 26, n. 5, p. S35-S61, 2008.

STOJANOVICH, L. Stress and autoimmunity. **Autoimmun. Rev.**, v. 9, n. 5, p. A271-276, 2010.

STRIETHOLT, S. et al. Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res. Ther.**, v. 10, n. 5, p. 219-227, 2008.

STRONG, P. N.; WADSWORTH, J. D. F. Pharmacologically active peptides and proteins from bee venom. In: ROCHAT, H.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F. **Animal toxins: facts and protocols**. Basel: Birkhäuser, 2000. p. 127-151.

STUART, J. M.; TOWNES, A. S.; KANG, A. H. Collagen autoimmune arthritis. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 199-218, 1984.

STUART, J. M.; WATSON, W. C.; KANG, A. H. Collagen autoimmunity and arthritis. **F. A. S. E. B. J.**, v. 2, n. 14, p. 2950-2956, 1988.

STUHLMEIER, K. M. Apis mellifera venom and melittin block neither NF-kappa B-p50-DNA interactions nor the activation of NF-kappa B, instead they activate the transcription of proinflammatory genes and the release of reactive oxygen intermediates. **J. Immunol.**, v. 179, n. 1, p. 655-664, 2007.

SUH, S. J. et al. Effects of bee venom on protease activities and free radical damages in synovial fluid from type II collagen-induced rheumatoid arthritis rats. **Toxicol. In Vitro**, v. 20, n. 8, p. 1465-1471, 2006.

ŚWIERKOT, J.; SZECHIŃSKI, J. Methotrexate in rheumatoid arthritis. **Pharmacol. Rep.**, v. 58, n. 4, p. 473-492, 2006.

THANAWALA, V.; KADAM, V. J.; GHOSH, R. Enkephalinase inhibitors: potential agents for the management of pain. **Curr. Drug Targets**, v. 9, n. 10, p. 887-894, 2008.

TIAN, H.; CRONSTEIN, B. N. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. **Bull. N. Y. U. Hosp. Jt. Dis.**, v. 65, n. 3, p. 168-173, 2007.

TRAN, C. N.; LUNDY, S. K.; FOX, D. A. Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, v. 12, n. 3, p. 183-189, 2005.

TRENTAM, D. E.; TOWNES, A. S.; KANG, A. H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. **J. Exp. Med.**, v. 146, n. 3, p. 857-868, 1977.

TRENTAM, D. E.; DYNESIUS-TRENTAM, R. Collagen-induced arthritis. In: HENDERSON, B.; EDWARDS, J. C. W.; PETTIPHER, E. R. **Mechanisms and models in rheumatoid arthritis**. London: Academic Press Inc., 1995. p. 447-456.

WAGNER-WEINER, L. Pediatric rheumatology for the adult rheumatologist. **J. Clin. Rheumatol.**, v. 14, n. 2, p. 109-119, 2008.

WALLACE, C. A. et al. Patterns of clinical remission in select categories of juvenile idiopathic arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 52, n. 11, p. 3554-3562, 2005.

WALSH, D. A. et al. Neuropeptide degrading enzymes in normal and inflamed human synovium. **Am. J. Pathol.**, v. 142, n. 5, p. 1610-1621, 1993.

WANG, Q. et al. Design, synthesis, and QSAR studies of novel lysine derives as aminopeptidase N/CD13 inhibitors. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, n. 10, p. 5473-5481, 2008.

WESSELS, J. A.; HUIZINGA, T. W.; GUCHELAAR, H. J. Recent insights in the pharmacological actions of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 47, n. 3, p. 249-255, 2008.

WESTMAN, E.; LUNDBERG, K.; ERLANDSSON HARRIS, H. Arthritogenicity of collagen type II is increased by chlorination. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 145, n. 2, p. 339-345, 2006.

WEYAND, C. M.; GORONZY, J. J. HLA polymorphisms and T cells in rheumatoid arthritis. **Int. Rev. Immunol.**, v. 18, n. 1-2, p. 37-59, 1999.

WILLIAMS, Y. N. et al. Dipeptidyl peptidase IV on activated T cells as a target molecule for therapy of rheumatoid arthritis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 131, n. 1, p. 68-74, 2003.

WOOD, P. B. Enhanced pain perception in rheumatoid arthritis: novel considerations. **Curr. Pain Headache Rep.**, v. 13, n. 6, p. 434-439, 2009.

WOOLEY, P. H.; CHAPEDELAINE, J. M. Immunogenetics of collagen-induced arthritis. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 8, n. 1, p. 1-22, 1987.

WOOLLEY, D. E. Cellular Mechanisms of Cartilage Destruction. In HENDERSON, B.; EDWARDS, J. C. W.; PETTIPHER, E. R. **Mechanisms and models in rheumatoid arthritis**. London: Academic Press Inc., 1995. p. 115-132.

XIAN C. J. et al. Cellular mechanisms for methotrexate chemotherapy-induced bone growth defects. **Bone**, v. 5, n. 41, p. 842-850, 2007.

XINQIANG, S. Therapeutic efficacy of experimental rheumatoid arthritis with low-dose methotrexate by increasing partially CD4+CD25+ Treg cells and inducing Th1 to Th2 shift in both cells and cytokines. **Biomed. Pharmacother.**, v. 7, n. 64, p. 463-471, 2010.

ZAMBOTTI-VILLELA, L. et al. Prolyl, cystyl and pyroglutamyl peptidase activities in the hippocampus and hypothalamus of streptozotocin-induced diabetic rats. **Peptides**, v. 28, n. 8, p. 1586-1595, 2007.

ZAMBOTTI-VILLELA, L. et al. Prospective evaluation of aminopeptidase activities in plasma and peripheral organs of streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 31, n. 6, p. 492-498, 2008.

ZHANG, X.; XU, W. Aminopeptidase N (APN/CD13) as a target for anti-cancer agent design. **Curr. Med. Chem.**, v. 15, n. 27, p. 2850-2865, 2008.