

RENATA GONÇALVES DIAS

**CARACTERIZAÇÃO DA INFLAMAÇÃO ARTICULAR INDUZIDA POR
FOSFOLIPASE A₂ – GRUPO IIA: DETERMINAÇÃO DAS
ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS, COMPORTAMENTAIS E
MEDIAÇÃO QUÍMICA**

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Dra. Yara Cury

Co-orientadora: Dra. Gisele Picolo

São Paulo

2010

RESUMO

Dias RG. Caracterização da inflamação articular induzida por fosfolipase A₂ – grupo IIA: determinação das alterações histopatológicas, comportamentais e mediação química [tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2010.

As fosfolipases A₂ secretadas (sFLA₂) são encontradas em diversos tecidos animais e, particularmente as FLA₂ do grupo II são abundantes nos venenos de serpentes, incluindo o gênero *Bothrops*. As FLA₂ estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos, como inflamação e dor, componentes importantes de diferentes patologias, incluindo artrite. Contudo, não está totalmente caracterizado o papel da FLA₂ para a gênese e manutenção dos quadros de inflamação articular. Assim, este projeto teve por objetivo padronizar um novo modelo de artrite, utilizando uma sFLA₂ do grupo IIA (miotoxina II) isolada do veneno da serpente *Bothrops asper*, bem como avaliar a mediação química envolvida no processo nociceptivo presente neste quadro. Os resultados mostraram que esta FLA₂ induz inflamação articular, caracterizada pelo aumento de permeabilidade vascular, infiltrado celular e hiperalgesia. A hiperalgesia é um processo multimediado, envolvendo a participação de bradicinina, endotelina e citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF α e CINC-1). Apesar desta FLA₂ ser desprovida de atividade catalítica, foi detectada participação de prostanoídes neste processo, sendo sua produção decorrente da ativação de FLA₂ endógenas. Os resultados indicam ainda que a mobilização de polimorfonucleares é importante para a manifestação do fenômeno nociceptivo. Estes dados sugerem que esta FLA₂ pode se tornar uma ferramenta científica importante para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos processos de inflamação articular.

Palavras-chave: Phospholipase A₂. Inflamação articular. Miotoxina. *Bothrops asper*.

ABSTRACT

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

Secretory phospholipases A₂ (sPLA₂) are abundant in different kinds of animal tissues and, particularly group II PLA₂ are found in venom snakes, including snakes from *Bothrops* genus. PLA₂s are proteins involved in many physiological and pathophysiological processes, like inflammation and pain, which are important components of different pathologies including arthritis. However, the involvement of PLA₂ in the genesis and/or maintenance of articular inflammation is not well characterized. Then, the aim of this project is to characterize the articular inflammatory response induced by Lys 49-PLA₂ (IIA group) isolated from *B. asper* snake venom. For this purpose it was analyzed the inflammatory alterations induced by this PLA₂ and determined the chemical mediation of the nociceptive process involved in this disorder, developing a new experimental model of articular inflammation. Our results demonstrated that sPLA₂ induces articular inflammation characterized by increase in the vascular permeability, cell migration and hyperalgesia. Hyperalgesia is a multi-mediated process that involves the participation of bradykinin, endothelin and cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF α e CINC-1). Although this PLA₂ is enzymatically inactive, prostanoids are involved in the nociceptive process, being its production dependent of the endogenous phospholipase activation. In addition, cell mobilization contributes to the sensibility alteration. Together, these data indicate that this PLA₂ could be an important scientific tool for the understanding of the pathophysiological mechanisms involved in articular inflammation processes.

Keywords: Phospholipase A₂. Articular inflammation. Myotoxin. *Bothrops asper*.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

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

Dados de literatura demonstram que nestes quadros inflamatórios articulares, independentemente da etiologia, existe a presença de níveis elevados de fosfolipases no fluido sinovial dos pacientes, em especial, de fosfolipase secretada do tipo II-A (Forster et al., 1985; Hurtig et al., 2001; Leistad et al., 2004). As fosfolipases são as enzimas-chave na liberação de ácido aracdônico, substrato para biossíntese de diversos mediadores lipídicos que desencadeiam os processos inflamatórios (Dennis, 1994) entretanto, apesar das evidências de presença de níveis elevados de fosfolipases A₂ no fluido sinovial de pacientes com inflamação articular, não está totalmente caracterizada a contribuição destas enzimas, para a gênese e manutenção das artrites.

As fosfolipases A₂ (FLA₂) constituem uma família de proteínas estruturalmente relacionadas, capazes de hidrolisar a ligação acil-éster na posição sn-2 de fosfoglicerídeos e liberar quantidades equimolares de ácidos graxos livres, como ácido araquidônico e lisofosfolipídeos (van Scharrenburg et al., 1982; Dennis, 1994). O ácido aracdônico é substrato para biossíntese de mediadores lipídicos envolvidos na resposta inflamatória, tais como prostaglandinas, leucotrienos e fatores de agregação plaquetária (Parente et al., 2001) que são capazes de afetar a permeabilidade vascular e o fluxo de sangue da microcirculação promovendo a infiltração celular para o sítio inflamatório, além de promover dano tecidual pela liberação de enzimas lisossomais, proteínas catiônicas e espécies reativas de oxigênio (artigo para revisão) (Harris, 1993).

As FLA₂ estão amplamente distribuídas em diversos tecidos de mamíferos, principalmente de humanos, camundongos e bovinos, além de serem encontradas em venenos de serpentes, de abelhas, no lagarto Heloderma, plantas e no caracol marinho Conodipina sp (Ho et al., 2001). As FLA₂ são divididas em

quatro principais tipos: as FLA₂ citosólicas (cFLA₂), FLA₂ independentes de cálcio (iFLA₂), FLA₂ secretadas (sFLA₂) e as PAF acetilhidrolases ou lipoproteínas associadas a FLA₂ (LpPLA₂) (Burke e Dennis, 2009) e juntas compõem 15 grupos de FLA₂ e muitos subgrupos, cujas enzimas diferem na estrutura e mecanismos catalíticos (Schaloske, 2006; Six e Dennis, 2006; Burke e Dennis, 2009; Magrioti e Kokotos, 2010).

Conforme citado anteriormente, a sFLA₂ do tipo II-A está presente no fluido sinovial de pacientes com inflamação articular e por isso estas sFLA₂ apresentam particular interesse neste estudo. Neste sentido, as sFLA₂ utilizam como unidade catalítica a histidina na posição 48 e o aspartato na posição 99 e requerem quantidades milimolares de cálcio para catálise. São divididas em 11 grupos (I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XIII e XIV) com base na estrutura primária e na presença de pontes dissulfídicas intramoleculares segundo a revisão de Burke e Dennis (2009). Em 2001, foi relatada por Soragni et al. (2001) a primeira fosfolipase isolada de fungos e bactérias, denominada TbSP1, proposta como pertencente ao grupo XIII destas enzimas. Canaan et al. (2004) propuseram a existência de um grupo adicional de FLA₂ secretadas, constituído por enzimas presentes em parvovírus, que foi caracterizada como do grupo XIV destas enzimas.

As sFLA₂ estão amplamente distribuídas, sendo encontradas em animais vertebrados e invertebrados, plantas, bactérias e vírus. Em mamíferos são encontradas 10 isoenzimas com atividade catalíticas (Murakami et al., 2001). As sFLA₂ desempenham várias funções fisiológicas, contudo as funções destas enzimas, inclusive na produção de eicosanóides, não estão totalmente esclarecidas (Lambeau e Gelb, 2008).

A caracterização de proteínas de membrana e solúveis, que se ligam as sFLA₂ sugere que, além da atividade enzimática, estas enzimas possam funcionar também como ligantes de alta afinidade. Dois tipos de receptores para FLA₂ foram isolados: receptor tipo N (neuronal), que tem afinidade elevada pelas FLA₂ neurotóxicas de venenos animais, sendo considerado o receptor que medeia os efeitos tóxicos destes venenos; e um receptor tipo M (músculo), que apresenta estrutura semelhante ao receptor para manose de macrófagos e é expresso por células do músculo esquelético, pulmões, rins e fígado (Valentin et al., 2000).

1.1 Fosfolipases A₂ miotóxicas

As sFLA₂ são enzimas abundantes nos venenos de serpentes do gênero Bothrops e estão envolvidas em uma ampla variedade de processos fisiológicos, incluindo digestão fosfolipídica e defesa do hospedeiro,

além de causarem vários efeitos fisiopatológicos, caracterizados por efeitos neurotóxico, cardiotoxico, anticoagulante, antiplaquetário, hemolítico, inflamatório e mionecrótico (Rosenberg et al., 1986; Harris et al., 1991; Lambeau e Gelb, 2008; Boyanovsky e Webb, 2009).

Algumas das sFLA₂ presentes nos venenos das serpentes do gênero *Bothrops* possuem importante atividade miotóxica (Queiroz et al., 1984; Gutierrez e Lomonte, 1995; Queiroz et al., 2002). Estas fosfolipases são estruturalmente caracterizadas como pertencentes ao grupo II. A atividade miotóxica destas sFLA₂ não depende exclusivamente de sua atividade catalítica, visto que apesar da homologia sequencial, algumas fosfolipases, destituídas de atividade enzimática e incapazes de hidrolisar fosfolípidos, também apresentam atividade miotóxica. Está bem estabelecido que as FLA₂ dos grupos I e II possuem aspartato na posição 49 (Asp49) e apresentam atividade catalítica elevada, como, por exemplo, a miotoxina III de *B. atrox* e de *B. asper*, a miotoxina II de *B. godmani*, as frações SIII e SIV de *B. insularis* e as toxinas PLA-B e PLA-N de *Trimeresurus flavoviridis*. No entanto, outras FLA₂ homólogas, com baixa ou nenhuma atividade catalítica, como por exemplo, a miotoxina II da *B. asper*, a Bothropstoxina-I (BTX-I) de *B. jararacussu*, a piratoxina I de *B. pirajái*, a Moojetoxina I da *B. moojeni*, a BnSp-7 da *B. neuwiedi pauloensis* e as BPI e BPII de *Trimeresurus flavoviridis*, mantém potente atividade miotóxica. Estas FLA₂ têm como característica, a presença de uma lisina na posição 49 (Lys 49) (Gutierrez, 1985; Canduri, Mancuso et al., 1998). Estudos de cristalografia mostraram que o grupo σ -amino do resíduo Lys49 está localizado na posição ocupada pelo íon cálcio, cofator essencial para a estabilização do intermediário tetraédrico durante a reação de catálise pelas FLA₂-Asp49 (Holland et al., 1990; Arni et al., 1995; Lee e Schmid-Schonbein, 1995), o que explica a baixa ou nenhuma atividade catalítica destas fosfolipases. Apesar da redução ou ausência de atividade enzimática, as sFLA₂-Lys49 homólogas mantém a habilidade de lesar membranas biológicas e sintéticas, por um mecanismo pouco conhecido, mas que parece estar relacionado com a capacidade de promover um efluxo de íons potássio e aumentar a liberação de ATP no meio extracelular e induzir a lesão em células vizinhas (Rufini et al., 1992; Gutierrez e Lomonte, 1995; Cintra-Francischinelli et al., 2010).

Tem sido sugerido que sítios ricos em aminoácidos carregados positivamente presentes na molécula destas FLA₂, são importantes para o desencadeamento de sua atividade farmacológica (Lomonte et al., 1994; Landucci et al., 1998; Landucci et al., 2000).

1.2 Efeitos inflamatórios e nociceptivos de fosfolipases miotóxicas

Vários dados de literatura têm mostrado que as FLA₂ isoladas de venenos de serpentes induzem resposta inflamatória e dor (Teixeira et al., 2003) contribuindo significativamente para o quadro inflamatório local observado nos envenenamentos por estas serpentes. Grande parte do conhecimento dos mecanismos farmacológicos envolvidos no processo inflamatório acarretado por estas FLA₂ miotóxicas foi obtido após a descoberta das variantes Lys49, reconhecidas como toxinas homólogas às FLA₂, mas destituídas de atividade enzimática (Ownby et al., 1999).

Dados da literatura têm mostrado que as FLA₂s isoladas de venenos de animais são capazes de induzir inflamação *in vivo*, provavelmente pelo aumento de produção de mediadores inflamatórios lipídicos (Murakami et al., 2001; Kudo et al., 2002; Lambeau et al., 2008). Em relação as FLA₂ obtidas de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, foi demonstrado que miotoxinas com estrutura de FLA₂ (variantes Lys49 e Asp49) isoladas do veneno de *B. asper* e *B. jararacussu*, induzem a formação de edema (Ownby et al., 1999; Chaves et al., 1998; Landucci et al., 1998). O edema acarretado por FLA₂ isoladas do veneno da *Bothrops asper* é multimediado, envolvendo a participação de histamina, serotonina, prostaglandina, cininas e óxido nítrico, além de receptores alfa-adrenérgicos (Gutiérrez et al., 1986; Osaka, 1989; Chaves et al., 1998, Chaves et al., 1995; Teixeira et al., 2003; Chaves et al., 2006; Olivo et al., 2007).

Algumas das FLA₂ isoladas de venenos botrópicos acarretam ainda, a desgranulação de mastócitos, com conseqüente liberação de mediadores inflamatórios envolvidos no aumento da permeabilidade vascular (Landucci et al., 1998; Landucci et al., 2000, Fernandez et al., 2010). Estas ações inflamatórias dependem, pelo menos em parte, e em especial, para as FLA₂ variantes Lys49, das propriedades catiônicas destas moléculas (Chaves et al., 1998; Landucci et al., 1998; Lambeau e Gelb, 2008). Estes dados corroboram a hipótese de que estas FLA₂ básicas exercem seus efeitos biológicos por meio de interações eletrostáticas destes resíduos catiônicos com sítios negativos na membrana celular, representados principalmente pelos proteoglicanos, enquanto que resíduos hidrofóbicos, principalmente os aromáticos, interagem e penetram a bicamada fosfolipídica da membrana celular, resultando na sua desestabilização (Nunez et al., 2001).

Além do componente vascular, as fosfolipases miotóxicas afetam também o componente celular da resposta inflamatória. A injeção intraplantar (i.pl) em ratos, da Miotoxina II (FLA₂-Lys49) isolada do veneno de *B. asper*, acarreta intenso infiltrado neutrofílico (Lomonte, 1994). Ainda, em modelo de pleurisia em ratos, foi observado que a Bothropstoxina I e II, duas miotoxinas, variantes Lys49 e Asp49, respectivamente, isoladas do veneno de *B. jararacussu* e a piratoxina I (*B. pirajai*) induzem o

recrutamento de leucócitos, por mecanismo independente da atividade enzimática (de Castro et al., 2000). Ensaios *in vitro* evidenciaram que FLA₂ miotóxicas são também capazes de acarretar quimiotaxia de neutrófilos humanos, resultante da liberação de leucotrieno B₄ e PAF (Gambero et al., 2002). Adicionalmente, Zuliani et al. (2005) mostraram que a MII (destituída de atividade enzimática) e a miotoxina III (MIII, com atividade enzimática) obtida do veneno da *B. asper* estimulam, diferentemente o processo de fagocitose e a atividade do “burst” respiratório de macrófagos. Nestes estudos foi observado que a MII estimula a fagocitose via receptores para Fc da IgG, complemento, manose e β-glucano, enquanto a MIII, que apresenta atividade enzimática é capaz de estimular a fagocitose somente via receptores para manose e β-glucano (Zuliani et al., 2005b). Estudos experimentais têm mostrado ainda, que as MII e a MIII estimulam a produção e liberação de diversos mediadores inflamatórios no local da administração e também em ensaios *in vitro*, tais como: IL-1, IL-6, TNF-α, leucotrienos, tromboxana, prostaglandina E₂ e prostaglandina D₂ (Zuliani et al., 2005; Moreira et al., 2008). Estes estudos têm sugerido ainda que a ciclooxigenase do tipo 2 é a principal isoforma envolvida na síntese de prostaglandinas e leucotrienos induzida por estas FLA₂s (Moreira et al., 2008).

Apesar das inúmeras atividades inflamatórias descritas para FLA₂ isoladas de venenos de serpentes (Pruzanski e Vadas, 1991; Wang e Teng, 1992; Chaves et al., 1998; Landucci et al., 1998; Teixeira et al., 2003), pouco se conhecia sobre os efeitos nociceptivos destas toxinas e sua contribuição para a dor observada nos envenenamentos ofídicos. A primeira evidência de que FLA₂ miotóxicas induzem nocicepção foi apresentada por Chacur e colaboradores (Chacur et al., 2004), demonstrando que a MII e MIII, isoladas do veneno de *Bothrops asper*, acarretam hiperalgesia, quando injetadas na pata de ratos, mas apenas a MIII é capaz de induzir alodinia. Por outro lado, em um modelo de neurite inflamatória induzida também em ratos, ambas as toxinas foram capazes de acarretar alodinia (Chacur et al., 2004). Estudos experimentais sobre a mediação química envolvida no efeito hiperalgésico destas FLA₂, injetadas por via i.pl., mostraram que este fenômeno é um processo multimediado, dependente da ação da bradicinina em receptores B₂, e pelo menos parcialmente, da liberação de histamina, serotonina e citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL-1). Além disso, foi demonstrado que a hiperalgesia induzida pela MII, destituída de atividade enzimática, é mediada também por prostanóides e por aminas simpatomiméticas (Chacur et al., 2003). A caracterização dos mecanismos centrais (medula espinhal) envolvidos nos fenômenos nociceptivos causados por ambas as fosfolipases mostraram que astrócitos e microglia são essenciais para o desencadeamento destes fenômenos (Chacur et al., 2004). Ainda na medula espinhal, receptores NK₁ (Natural Killer tipo 1) e para CGRP

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

1.3 Inflamação articular

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

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

Durante a inflamação articular (ou artrites), ocorrem dois principais processos fisiopatológicos: inflamação e perda da cartilagem articular. O tecido sinovial inflamado apresenta intenso infiltrado celular, caracterizado principalmente por linfócitos e macrófagos. Células polimorfonucleares, como neutrófilos, estão também presentes no fluído articular, principalmente na fase aguda do processo (Harris, 1990; Yanni et al., 1994), sendo a mobilização destas células mediada por quimiocinas, C5a e leucotrieno B₄. Em relação às células inflamatórias, tem sido demonstrada correlação entre a presença

de macrófagos e a lesão cartilaginosa (Mulherin et al., 1996). Os macrófagos, presentes principalmente na membrana sinovial, tornam-se ativados, produzindo diferentes mediadores químicos, além de enzimas da família das metaloproteinases, que podem favorecer a destruição da cartilagem (Mulherin et al., 1996) e do osso. Hiperplasia e hipertrofia sinovial podem ocorrer, com aumento no volume do fluido sinovial. Os sinais clássicos da inflamação estão presentes, incluindo a dor (Evans e Robbins, 1996).

As artrites podem ser de diferentes tipos e origens, como por exemplo, injúria mecânica ou deposição de cristais, como na osteoartrite (OA) ou decorrente de processos autoimunes, como na artrite reumatóide (AR). A OA é o tipo mais comum de artrite, sendo caracterizada por fibrose capsular, formação de osteofito e inflamação da membrana sinovial (Tehranzadeh et al., 2005). A artrite reumatóide é uma doença sistêmica articular degenerativa, caracterizada pela destruição progressiva da cartilagem e de estruturas ósseas das articulações (Firestein, 1991). A OA e AR são caracterizadas principalmente pelo desequilíbrio entre a síntese e a degradação da matriz extracelular da cartilagem articular, estando a degradação dos complexos de proteoglicanos acelerada nestes pacientes (Saxne et al., 1987; Bensouyad et al., 1990; Poole et al., 1994). A perda de proteoglicanos é causada pela grande expressão de proteinases, resultante de um desequilíbrio dessas enzimas e seus inibidores (Schuricht et al., 2005). As metaloproteinases de matriz (MMPs) têm papel central na degradação da cartilagem (Martel-Pelletier e Pelletier, 1987). As MMPs são secretadas na forma inativa, pelos condrócitos e por células sinoviais, em resposta à presença de mediadores inflamatórios como IL-1 β , TNF- α e IFN- δ (interferon- δ), são armazenadas na matriz e ativadas após clivagem (Palmer et al., 1988; Murrell et al., 1995; Nagase 1997). A estromelina (MMP-3) e as colagenases são as principais MMPs envolvidas na degradação do colágeno durante inflamação articular (van Meurs et al., 1999; van Kujik et al., 2010). Dentre as colagenases, as MMPs 1, 8 e 13 se distinguem das outras enzimas pela sua habilidade de clivar o colágeno tipo II, o principal componente da matriz extracelular da cartilagem articular (Mitchell et al., 1996). Em decorrência dos seus efeitos sobre a matriz extracelular, as gelatinases, particularmente a MMP 2 e MMP 9, são também consideradas importantes para a progressão da degradação da cartilagem, durante a artrite (Ahrens et al., 1996; Goldbach-Mansky et al., 2000; Itoh et al., 2002).

A atividade das MMPs é controlada em parte, pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (Baker et al., 2002). O desequilíbrio entre estas proteinases e seus inibidores acarreta alteração na proteólise dos componentes da cartilagem articular. Na artrite, a cartilagem tem baixa

capacidade intrínseca de recuperação e o processo contínuo de destruição da cartilagem acarreta degradação irreversível da fibra do colágeno.

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

Nos processos inflamatórios, de maneira geral, a IL-1 β está envolvida com diversas fases deste processo, como o recrutamento leucocitário, febre e aumento da permeabilidade vascular (Goldblum et al., 1988; Moser et al., 1989; Dinarello, 1994). Ainda, é sabido que a IL-1 β estimula a expressão de COX-2 e subsequente liberação de prostaglandinas (Bernheim, 1986; Zucali, Dinarello et al., 1986; Crofford et al., 1994), que por sua vez, são capazes de sensibilizar nociceptores e por isso é um importante mediador hipernociceptivo inflamatório (Ferreira et al., 1988). A hipernocicepção induzida por IL-1 β é mediada pela ativação de receptores de membrana específicos e subsequente síntese de prostaglandinas (Hori et al., 1990; Oka et al., 1993). No entanto, além da sensibilização de nociceptores por produção de prostanóides, ocorre a participação de outros mediadores inflamatórios como a serotonina, histamina e outras citocinas, entre elas o TNF- α (Doak e Sawynok, 1997; Parada et al., 2001; Oliveira et al., 2005). Tanto o TNF- α como a IL-1 aumentam a produção e secreção de metaloproteinases de matriz e catepsinas em fibroblastos (Dayer et al., 1985; Lemaire et al., 1997; Vincenti e Brinckerhoff, 2002; Schuricht et al., 2005).

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

et al., 2004; Witowski et al., 2004). Dados experimentais tem mostrado ainda, que esta citocina induz nocicepção (Pinto et al., 2010).

A IL-18 também tem papel importante na AR (Naik et al., 1999; Greene et al., 2000). É expressa na sinóvia, favorecendo a artrite por mecanismos que incluem recrutamento de neutrófilos, via TNF- α e LTB₄ (leucotrienos), e ativação de macrófagos (Gracie et al., 1999; Canetti et al., 2003). Assim, a função da IL-18 na artrite clínica e experimental está bem documentada (Gracie et al., 1999; Joosten et al., 2000; Plater-Zyberk et al., 2001; Wei et al., 2001). Verri et al. (2007) sugeriram que a IL-18 está relacionada com a hipernocicepção articular na inflamação induzida por antígeno e com o aumento da produção de IFN- γ , ET-1 (endotelina) e prostaglandina E2. No processo inflamatório não articular, esta interleucina contribui com o edema e migração neutrofílica induzida pela carragenina (Leung et al., 2001).

Vários estudos têm mostrado o envolvimento de outras quimiocinas, como IL-8 (interleucina-8), MIP-1 α (Macrophage inflammatory protein 1- α), MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) e ENA-78 (Epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide 78), e seus receptores, na artrite. As quimiocinas são produzidas pelas células da sinóvia e cartilagem e estimulam a migração leucocitária e a proliferação e produção de metaloproteinases por fibroblastos (Szekanecz et al., 2003; de Kock et al., 2004).

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

A bradicinina é outro mediador importante na artrite reumatóide (Couture et al., 2001) e na resposta inflamatória articular, tanto via ativação de receptores B1, quanto receptores B2 (Guzzo et al., 2000).

A bradicinina é um mediador inflamatório encontrado no fluido sinovial e parece estimular diretamente nociceptores de terminais nervosos sensoriais participando do processo de geração de dor (Wood e Docherty, 1997; Schaible et al., 2002). De fato, Yamashita et al. (1995) relataram que receptores nociceptivos intraarticulares são estimulados pela administração de bradicinina.

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

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

Dentre os mediadores pró-inflamatórios envolvidos na patogênese da inflamação articular, cabe ressaltar ainda a participação dos eicosanóides (Laufer, 2003; Kojima et al., 2005). Osteoblastos obtidos de indivíduos com OA produzem quantidades variáveis de prostaglandinas e leucotrieno B₄ (LTB₄) (Laufer, 2003) e ambos os eicosanóides são detectados no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (Kojima et al., 2005). As prostaglandinas e o LTB₄ regulam a síntese de citocinas pró-inflamatórias e de colágeno e o seu envolvimento nos mecanismos de artrite tem sido demonstrado em modelos experimentais de inflamação articular (Rocha et al., 1997; Bombini et al., 2004; Kojima et al., 2004). Em sinóvia obtida de pacientes com osteoartrite, foi observado, após o tratamento farmacológico com inibidores de ciclooxigenases, desvio do metabolismo do ácido araquidônico para a via das lipoxigenases, estando estes metabólitos envolvidos no aumento na produção de IL-1 (Marcouiller et al., 2005) e metaloproteinases (Martel-Pelletier e Pelletier, 1987).

O principal precursor dos eicosanóides é o ácido araquidônico, o qual é clivado dos fosfolípidios de membrana, pelas FLA₂ citoplasmáticas (tipo IV) ou secretadas (tipo II e V) (Chapman et al., 2000). A FLA₂ citosólica (cFLA₂) possui função crítica na patogênese da artrite. Hegen et al. (2003) observaram que animais

deficientes desta FLA₂ apresentam redução da inflamação e da formação de pannus ósseo em modelo experimental de artrite induzida por colágeno. Ainda, estudos de reabsorção óssea induzida por LPS indicam que a cFLA₂ tem papel importante para esta reabsorção (Miyaura, 2003). Este efeito parece ser mediado pela PGE₂ (Masuda e Okamoto, 2005).

Está bem estabelecido que o fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide contém alta atividade de sFLA₂ e esta atividade tem sido correlacionada com a severidade da doença (Kramer et al., 1989; Pruzanski et al., 1995). Por meio de ensaios bioquímicos e estudos de clonagem molecular, esta atividade têm sido atribuída à sFLA₂ do grupo IIA. Em tecidos de pacientes com artrite reumatóide, verificou-se que a sFLA₂-IIA é detectada em várias células, como as células sinoviais, condrócitos e fibroblastos (Jamal et al., 1998; Masuda e Okamoto, 2005). Adicionalmente foi observado que a expressão destas enzimas está aumentada em macrófagos sinoviais da artrite reumatóide e em fibroblastos de sinóvias de indivíduos não artríticos (Jamal et al., 1998). A sFLA₂-IIA humana causa inflamação aguda quando administrada em articulações de coelhos (Bomalaski et al., 1991) entretanto, sFLA₂-IIA de camundongos transgênicos não induz desenvolvimento de artrite. Em 2005, Masuda e colaboradores observaram também a expressão de outras fosfolipases secretadas, em tecidos de AR humana, evidenciando a presença de sFLA₂ do grupo IID em folículos linfáticos e no endotélio capilar, do grupo IIE na musculatura lisa vascular e do grupo V, nos fibroblastos intersticiais.

A presença de níveis elevados de FLA₂s, particularmente secretadas, no fluido sinovial, sugere que estas fosfolipases tenham papel importante na artrite. Contudo, os mecanismos envolvidos na ação destas enzimas na gênese das alterações fisiopatológicas e na liberação de mediadores químicos envolvidos na artrite não estão ainda totalmente caracterizados.

Os dados em conjunto sugerem que os mediadores inflamatórios têm importante papel na fisiopatologia dos fenômenos da artrite. Os tratamentos existentes para o controle desta patologia não são ideais ou totalmente eficazes. Assim, é importante a padronização de novos modelos de artrite para a compreensão da fisiopatologia e do controle desta inflamação. Uma vez que as FLA₂ secretadas estão presentes em abundância no fluido sinovial de pacientes com inflamação articular e baseados nos estudos de que a miotoxina II (fosfolipase A₂ secretada do grupo IIA) isolada do veneno da *Bothrops asper*, tem importante papel na gênese de inflamação e dor, a utilização desta FLA₂ como ferramenta para indução de inflamação articular pode contribuir para o melhor entendimento do papel das sFLA₂ neste processo, bem como para ampliar a caracterização da mediação química e da ativação das células nestes processos inflamatórios.

*

* *

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

Os objetivos específicos são avaliar:

- a resposta inflamatória causada pela injeção intraarticular (i.a.) da FLA₂ por meio da determinação das alterações de permeabilidade vascular e da migração leucocitária;
- as alterações histopatológicas e morfométricas da articulação fêmur-tíbio-patelar e tíbio-tarsal de animais injetados com a miotoxina,
 - a resposta nociceptiva induzida pela toxina;
- os mecanismos (mediadores químicos) envolvidos na dor induzidos pela injeção intraarticular de FLA₂.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados indicam que:

- A fosfolipase A₂ secretada, variante Lys-49 (Miotoxina II obtida do veneno de *B. asper*) induz inflamação articular, caracterizada pelo aumento de permeabilidade vascular, infiltrado celular e hiperalgesia.
- A presença de infiltrado polimorfonuclear tem papel importante para a gênese da hiperalgesia.
- A hiperalgesia induzida pela FLA₂ é um processo multimediado, envolvendo a participação de bradicinina, endotelina e citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF α e CINC-1) e prostanóides.
- FLA₂ endógenas são relevantes para a manifestação do fenômeno nociceptivo.
- Estes dados em conjunto, indicam que esta fosfolipase A₂ pode ser uma ferramenta científica importante para o entendimento de alguns dos mecanismos envolvidos na inflamação articular e da contribuição das fosfolipases para este processo.

REFERÊNCIAS*

- Ahrens D, Koch AE, Pope RM, et al. Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kd gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1996;39:1576-87.
- Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol.* 1999;162:494-502.
- Allen A, Gammon CM, Ousley AH, et al. Bradykinin stimulates arachidonic acid release through the sequential actions of an sn-1 diacylglycerol lipase and a monoacylglycerol lipase. *J Neurochem.* 1992;58:1130-39.
- Arend WP. The pathophysiology and treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1997;40:595-97.
- Arni RK, Ward RJ, Gutierrez JM, Tulinsky A. Crystal structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. *Acta Crystallogr.* 1995; D51:311-17.
- Baker EA, Stephenson TJ, Reed MW, Brown NJ. Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. *Mol Pathol.* 2002;55:300-304.
- Barbosa P, Martins AM, Alves RS, et al. The role of indomethacin and tezosentan on renal effects induced by *Bothrops moojeni* Lys49 myotoxin I. *Toxicon.* 2006;47:831-37.
- Bensouyad A, Hollander AP, Dularay B, et al. Concentrations of glycosaminoglycans in synovial fluids and their relation with immunological and inflammatory mediators in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum.* 1990;49:301-7.
- Bernheim HA. Is prostaglandin E2 involved in the pathogenesis of fever? Effects of interleukin-1 on the release of prostaglandins. *Yale J Biol Med.* 1986;59:151-58.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Canduri F, Mancuso LC, Soares AM, et al. Crystallization of piratoxin I, a myotoxic Lys49-phospholipase A2 homologue isolated from the venom of *Bothrops pirajai*. *Toxicon*. 1998;36:547-51.
- Canetti CA, Leung BP, Culshaw S, et al. IL-18 enhances collagen-induced arthritis by recruiting neutrophils via TNF-alpha and leukotriene B4. *J Immunol*. 2003;171:1009-1015.
- Chacur M, Longo I, Picolo G, et al. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. *Toxicon*. 2003;41:667-78.
- Chacur M, Gutiérrez JM, Milligan ED, et al. Snake venom phospholipase A2s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. *Pain* 2004;108:180-91.
- Chapman WC., Debelak JP, Blackwell TS, et al. Hepatic cryoablation-induced acute lung injury: pulmonary hemodynamic and permeability effects in a sheep model. *Arch Surg*. 2000;135:667-72.
- Chaves F, Barboza M, Gutiérrez JM. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon*. 1995;33:31-39.
- Chaves F, Leon G, Alvarado VH, Gutiérrez JM. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*. 1998;36:1861-69.
- Chaves F, Teixeira CF, Gutierrez JM. Role of nitric oxide in the local and systemic pathophysiological effects induced by *Bothrops asper* snake venom in mice. *Inflamm. Res*. 2006;55:245-53.
- Cintra-Francischinelli M, Caccin P, Chiavegato A, et al. Bothrops snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:14140-5.

- Conte FP, Barja-Fidalgo C, Verri WA Jr, et al. Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB₄, TNF- α , and CXCL-1. *J Leukoc Biol.* 2008;84:652-60.
- Couture R, Harrison M, Viana RM, Clutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2001;429:161-76.
- Crofford LJ, Wilder RL, Ristimaki AP, et al. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest.* 1994;93:1095-1101.
- Cruwys SC, Garrett NE, Perkins MN, et al. The role of bradykinin B1 receptors in the maintenance of intra-articular plasma extravasation in chronic antigen-induced arthritis. *Br J Pharmacol.* 1994;113:940-944.
- Cunha TM, Verri WA Jr, Schivo IR, et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J Leukoc Biol.* 2008;83:824-832.
- Daher JB, Souza GE, D'Orleans - Juste P, Rae GA. Endothelin ETB receptors inhibit articular nociception and priming induced by carrageenan in the rat knee-joint. *Eur J Pharmacol.* 2004;496:77-85.
- Dayer JM, Beutler B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med.* 1985;162:2163-2168.
- de Castro RC, Landucci EC, Toyama MH, et al. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A₂ into the rat pleural cavity. *Toxicon.* 2000;38:1773-1785.
- de Kock CP, Burnashev N, Lodder JC, et al. NMDA receptors induce somatodendritic secretion in hypothalamic neurones of lactating female rats. *J Physiol.* 2004;561:53-64.
- Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J Biol Chem.* 1994;269:13057-13060.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Forster S, Ilderton E, Norris JF, et al. Characterization and activity of phospholipase A2 in normal human epidermis and in lesion-free epidermis of patients with psoriasis or eczema. *Br J Dermatol.* 1985;112:135-147.
- Fossiez F, Djossou O, Chomarat P., et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med.* 1996;183:2593-2603.
- Gambero A, Landucci EC, Toyama MH, et al. Human neutrophil migration in vitro induced by secretory phospholipases A2: a role for cell surface glycosaminoglycans. *Biochem Pharmacol.* 2002;63:65-72.
- Gammon C, Allen AC, Morell P. Bradykinin stimulates phosphoinositide hydrolysis and mobilization of arachidonic acid in dorsal root ganglion neurons. *J Neurochem.* 1989; 53:95-101.
- Goldbach-Mansky R, Lee JM, Hoxworth JM, et al. Active synovial matrix metalloproteinase-2 is associated with radiographic erosions in patients with early synovitis. *Arthritis Res.* 2000;2:145-153.
- Goldblum SE, Yoneda K, Cohen DA, McClain CJ. Provocation of pulmonary vascular endothelial injury in rabbits by human recombinant interleukin-1 beta. *Infect Immun.*, 1988; 56:2255-2263,1988.
- Goldring MB. Anticytokine therapy for osteoarthritis. *Expert Opin Biol Ther.* 2001;1:817-829.
- Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, et al. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1999;104:1393-1401.
- Greene CM, Meachery G, Taggart CC, et al. Role of IL-18 in CD4+ T lymphocyte activation in sarcoidosis. *J Immunol,* 2000;165:4718-4724.
- Guerrero AT, Verri WAJr, Cunha TM, et al. Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006;84:244-251.

- Gutierrez JM, Gene JA, Rojas G, Cerdas L, Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*. 1985;23:887–893.
- Gutierrez JM, Lomonte B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*. 1995;33:1405–1424.
- Gutiérrez JM, Lomonte B, Chaves F, Moreno E, Cerdas L. Pharmacological activities of a toxic phospholipase A isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comp Biochem Physiol C*. 1986;84:159-164.
- Guzzo ML, Farsky SH, De Nucci G, et al. Role of kinins and nitric oxide on the rabbit arthritis induced by *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*. 2000;38:1535-1546.
- Harris EDJ. *Snake Toxins*. New York: Pergamon Press; 1991.
- Harris EDJ. Pathophysiology and implications for therapy. Rheumatoid arthritis. 1990;322:1277–1289.
- Harris EDJ. Rheumatoid arthritis the clinical spectrum. *Textbook of Rheumatology*. 1993;1:833-873.
- Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, et al. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 1998;41:1266-74.
- Haupt JL, Frisbie DD, McIlwraith CW, et al. Dual transduction of insulin-like growth factor-I and interleukin-1 receptor antagonist protein controls cartilage degradation in an osteoarthritic culture model. *J Orthop Res*. 2005;23:118-126.
- Hecquet C, Biyashev D, Tan F, Erdos EG. Positive cooperativity between the thrombin and bradykinin B2 receptors enhances arachidonic acid release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290:H948-958.
- Hegen M, Sun L, Uozumi N, et al. Cytosolic phospholipase A2alpha-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J Exp Med*. 2003;197:1297-1302.

- Hirai Y, Migita K, Honda S, et al.. Effects of nitric oxide on matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells. *Life Sci.* 2001;68:913-920.
- Ho IC, Arm JP, Bingham CO^{3rd}, et al. A novel group of phospholipase A2s preferentially expressed in type 2 helper T cells. *J Biol Chem.* 2001;276:18321-326.
- Holland DR, Clancy LL, Muchmore SW, et al. The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A2 from the venom of the cottonmouth snake at 2.0-Å resolution. *J Biol Chem.* 1990;265:17649-656.
- Hori R, Nomura H, Iwakawa S, Okumura K. Characterization of epidermal growth factor receptors on plasma membranes isolated from rat gastric mucosa. *Pharm Res.* 1990;7:665-669.
- Hurtig IM, Raak RI, Kendall SA, et al. Quantitative sensory testing in fibromyalgia patients and in healthy subjects: identification of subgroups. *Clin J Pain.* 2001;17:316-22.
- Itoh T, Matsuda H, Tanioka M, et al. The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J Immunol.* 2002;169:2643-47.
- Jamal OS, Conaghan PG, Cunningham AM, et al. Increased expression of human type IIa secretory phospholipase A2 antigen in arthritic synovium. *Ann Rheum Dis.* 1998;57:550-558.
- Jones CE, Chan K. Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;26:748-753.
- Joosten LA, van de Loo FA, Lubberts E, et al. An IFN-gamma-independent proinflammatory role of IL-18 in murine streptococcal cell wall arthritis. *J Immunol.* 2000;165:6553-58.
- Kanaka R, Schaible HG, Schimidt RF. Activation of fine articular afferent units by bradykinin. *Brain Res.* 1985;327:81-90.
- Khatib AM, Lomri A, Moldovan F, et al. Constitutive and inducible expression of endothelin-1 in primary rat articular chondrocyte culture. *Cytokine.* 1997;9:556-562.

- Kojima F, Kato S, Kawai S. Prostaglandin E synthase in the pathophysiology of arthritis. *Fundam Clin Pharmacol.* 2005;19:255-261.
- Kojima F, Naraba H, Miyamoto S, et al. Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004;6:R355-365.
- Kramer RM, Hession C, Johansen B, et al. Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2. *J Biol Chem.* 1989;264:5768-5775.
- Kudo I, Murakami M. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandines Other Lip Med.* 2002;58:68-69.
- Kuwata H, Fujimoto C, Yoda E, et al. A novel role of group VIB calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2 γ) in the inducible expression of group IIA secretory PLA2 in rat fibroblastic cells. *J. Biol Chem.* 2007;282:20124-20132.
- Lambeau G, Gelb M. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annual Review of Biochemistry* 2008;77:495-520.
- Landucci EC, Castro RC, Pereira MF, et al. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A2 homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur J Pharmacol.* 1998;343:257-263.
- Landucci EC, Castro RC, Toyama M, et al. Inflammatory oedema induced by the lys-49 phospholipase A(2) homologue piratoxin-i in the rat and rabbit. Effect of polyanions and p-bromophenacyl bromide. *Biochem Pharmacol.* 2000;59:1289-1294.
- Laufer S. Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.*2003;15:623-627
- Lebrão M, Yao D. O Projeto SABE no Município de São Paulo: uma abordagem inicial. *OPAS/MS.* 2003;15-32

- Lee C, Shieh DC, Tzeng CY, et al. Bradykinin-induced IL-6 expression through bradykinin B2 receptor, phospholipase C, protein kinase Cdelta and NF-kappaB pathway in human synovial fibroblasts. *Molecular immunology*. 2008;45:3693-3702.
- Lee J, Schmid-Schonbein GW. Biomechanics of skeletal muscle capillaries: hemodynamic resistance, endothelial distensibility, and pseudopod formation. *Ann Biomed Eng*.1995;23:226–246.
- Leistad L, Feuerherm AJ, Ostense M, et al. Presence of secretory group IIa e V phospholipase A2 and cytosolic group IV phospholipase A2 in chondrocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chem and Lab Med*. 2004;42:602-610.
- Lemaire R, Huet G, Zerimech F, et al. Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells. *Br J Rheumatol*. 1997;36:735-743.
- Leung BP, Culshaw S, Gracie JA, et al. A role for IL-18 in neutrophil activation. *J Immunol*. 2001;167:2879-2886.
- Ley K, Bullard DC, Arbonés ML, et al. Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med*. 1995;181:669-675.
- Libbrandt A, Penninger JM. RANKL/RANK as key factors for osteoclast development and bone loss in arthropathies. *Adv Exp Med Biol*. 2009;649:100-113.
- Lomonte B, Gutierrez JM. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*. 1989;27:725-733.
- Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LÅ. Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A2 of *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*. 1994;32:1359–1369.
- Lucas KK, Svensson CI, Hua XY, et al. Spinal phospholipase A2 in inflammatory hyperalgesia: role of group IVA cPLA2. *Br J Pharmacol*. 2005;144:940-952.
- Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann Rheum Dis*. 1993;52: 32-234.

- Magrioto V, Kokotos G. Phospholipase A2 inhibitors as potential therapeutic agents for the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opin. Ther. Patents*. 2010;20:1-18.
- Manzo A, Bombardieri M, Humby F, Pitzalis C. Secondary and ectopic lymphoid tissue responses in rheumatoid arthritis: from inflammation to autoimmunity and tissue damage/remodeling. *J. Mol. Recognit*. 2009;22:530–537.
- Marcouiller P, Pelletier JP, Guévremont, M, et al. Leukotriene and prostaglandin synthesis pathways in osteoarthritic synovial membranes: regulating factors for interleukin 1beta synthesis. *J Rheumatol*. 2005;32:704-712.
- Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Neutral proteases in human osteoarthritic synovium: quantification and characterization. *J Rheumatol*. 1987;14:38-40.
- Masuda Y, Okamoto K. Management and treatment of headache in the pain clinic. *Nippon Rinsho*. 2005;63:1802-1807.
- Mayadas T, Johnson RC, Rayburn H, et al. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell*. 1993;74:541-554.
- McDougall JJ. Arthritis and pain. Neurogenic origin of joint pain. *Arthritis Res Ther*. 2006;8:220.
- McDougall JJ, Zhang C, Cellars L, et al. Triggering of proteinase-activated receptor 4 leads to joint pain and inflammation in mice. *Arthritis Rheum*. 2009;60:728-37.
- McInnes IB, al-Mughales J, Field M, et al. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat Med*. 1996;2:175-82.
- Mello SB, Guzzo ML, Lisboa LF, Farsky SH. Pharmacological characterisation of arthritis induced by *Bothrops jararaca* venom in rabbits: a positive cross talk between bradykinin, nitric oxide and prostaglandin E2. *Mediators Inflamm*. 2002;11:13-16.
- Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM. et al. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*. 1996;97:761-768.

- Miyaura C. Bone metabolism in aromatase-knockout mice. *Clin Calcium*. 2003;13:1446-48.
- Miyazawa K, Mori A, Okudaira H. IL-6 synthesis by rheumatoid synoviocytes is autonomously upregulated at the transcriptional level. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103:S437-444.
- Mora R, Maldonado A, Valverde B, Gutierrez JM. Calcium plays a key role in the effects induced by a snake venom Lys49 phospholipase A2 homologue on a lymphoblastoid cell line. *Toxicon*. 2006;47:75-86.
- Moreira V, Gutiérrez JM, Soares AM, et al. Secretory phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* and from *Crotalus durissus terrificus* snake venoms induce distinct mechanisms for biosynthesis of prostaglandins E(2) and D(2) and expression of cyclooxygenases. *Toxicon*. 2008;52:428–439.
- Moser R, Schleiffenbaum B, Groscurth P, Fehr J. Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. *J Clin Invest*. 1989;83:444-455.
- Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B. Synovial tissue macrophage population and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1996;39:115-124.
- Murakami M, Kudo I. Diversity and regulatory functions of mammalian secretory phospholipase A2s. *Adv Immunol*. 2001;77:163-194.
- Murrell G A, Jang D, Williams RJ. Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;206:15-21.
- Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem*. 1997;378:151-160.
- Nahir AM, Hoffman A, Lorber M, Keiser HR. Presence of immunoreactive endothelin in synovial fluid: analysis of 22 cases. *J Rheumatol*. 1991;18:678-680.

- Naik SM, Cannon G, Burbach GJ. et al. Human keratinocytes constitutively express interleukin-18 and secrete biologically active interleukin-18 after treatment with pro-inflammatory mediators and dinitrochlorobenzene. *J Invest Dermatol.* 1999;113:766-772.
- Neugebauer V, Schaible HG, Schmidt RF. Sensitization of articular afferents to mechanical stimuli by bradykinin. *Pflugers Arch.* 1989;415:330-335.
- Nishimoto N. Anti-cytokine therapy for intractable hematologic diseases using monoclonal antibodies. *Nippon Naika Gakkai Zasshi.* 2004;93:390-396.
- Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2004;50:1761-1769.
- Nunez CE, Angulo Y, Lomonte B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A(2) from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. *Toxicon.* 2001;39:1587-1594.
- Oka T, Aou S, Hori T. Intracerebroventricular injection of interleukin-1 beta induces hyperalgesia in rats. *Brain Res.* 1993;624:61-68.
- Oliveira RB, Sampaio EP, Aarestrup F. et al. Cytokines and *Mycobacterium leprae* induce apoptosis in human Schwann cells. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64: 882-890.
- Olivo RA, Teixeira CF, Wallace JL, et al. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. *Toxicon.* 2007;49:670-677.
- Osaka A. Handbook of Experimental Pharmacology. ELCY. New York: Springer, 1989; 480-546. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms.
- Ownby CL, Selistre de Araujo HS, White SP, Fletcher JE. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. *Toxicon.* 1999;37:411-445.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Podesser BK, Sieik DA, Eberli FR. et al. ET(A)-receptor blockade prevents matrix metalloproteinase activation late postmyocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H984-991.
- Poole AR, Ionescu M, Swan A, Dieppe PA. Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage proteoglycan aggrecan. *J Clin Invest* . 1994;94:25-33.
- Pradelles P, GRassi J, Maclouf J. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. *Anal Chem*. 1985;57:1170-1173.
- Pruzanski W, Bogoch E, Katz A. et al. Induction of release of secretory nonpancreatic phospholipase A2 from human articular chondrocytes. *J Rheumatol*. 1995;22:2114-2119.
- Pruzanski W, Vadas P. Phospholipase A2-a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunol Today*, 1991;12:143-146.
- Puren AJ, Razeghi P, Fantuzzi G. et al.. Interleukin-18 (IFN γ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 β via TNF α production from non-CD14 $^{+}$ human blood mononuclear cells. *J Clin Invest*. 1998;101:711-21.
- Queiroz LS, Marques MJ, Santo-Neto H. Acute local nerve lesions induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*. 2002;40:1483–1148.
- Queiroz LS, Santo-Neto H, Rodrigues-Simioni L, Prado-Franceschi J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*. 1984;22:339–46.
- Rocha FA, Andrade LE, Russo M. et al. PAF modulates eicosanoids and TNF release in immune-complex arthritis in rats. *J Lipid Mediat Cell Signal*. 1997;16:1-10.
- Rosenberg A. *Natural Toxins*. Oxford: Pergamon Press; 1986.
- Roy-Beaudry M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, et al. Endothelin 1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13 induction. *Arthritis Rheum*. 2003;48:2855-64.

- Ruddy MJ, Shen F, Smith JB, et al. Interleukin-17 regulates expression of the CXC chemokine LIX/CXCL5 in osteoblasts: implications for inflammation and neutrophil recruitment. *J Leukoc Biol.* 2004;76:135-44.
- Ruddy MJ, Wong MJ, Liu XK, et al. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. *J Biol Chem.* 2004;279:2559-67.
- Rufini S, Cesaroni P, Desideri A, et al. Calcium ionindependent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. *Biochemistry.* 1992;31:12424–30.
- Sack U, Kinne RW, Marx T. et al. Interleukin-6 in synovial fluid is closely associated with chronic synovitis in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 1993;13:45-51.
- Sasaki K, Hattori T, Fujisawa T. et al. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. *J Biochem.* 1998;123:431-39.
- Saxne T, Heinegard D, Wollheim FA. Cartilage proteoglycans in synovial fluid and serum in patients with inflammatory joint disease. *Arthritis Rheum.* 1987;30:972-79.
- Schaeffer EL, Gattaz WF. Requirement of hippocampal phospholipase A2 activity for long-term memory retrieval in rats. *J Neural Transm.* 2007;114:379-85.
- Schaible HG, Ebersberger A, Von Banchet GS. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;966:343-54.
- Schaible HG, Grubb BD. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain.* 1993;55:5-54.
- Schaloske P. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1761:1246-1259.
- Schuricht U, Stopfel N, Huckel M. et al. Local expression of matrix metalloproteinases, cathepsins and their inhibitors during the development of murine antigen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7:174-88.

- Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1488:1-19.
- Snedecor G, Sokal RR, Rohlf FJ. *Statistical methods Biometry*. New York: Owa State University Press; 1946.
- Sokal R, Rohlf FJ. *Biometry*. New York: Pergamon Press; 1981.
- Soragni E, Bolchi A, Balestrini R, et al. A nutrient-regulated, dual localization phospholipase A(2) in the symbiotic fungus *Tuber borchii*. *EMBO J*. 2001;20:5079-90.
- Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR. et al. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol*. 1991;147:3915-20.
- Stone J, Doube A, Dudson D, Wallace J. Inadequate calcium, folic acid, vitamin E, zinc, and selenium intake in rheumatoid arthritis patients: results of a dietary survey. *Semin Arthritis Rheum*. 1997;27:180-85.
- Szekanecz Z, Kim J, Koch AE. Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. *Semin Immunol*. 2003;15:15-21.
- Tehranzadeh J, Booya F, Root J. Cartilage metabolism in osteoarthritis and the influence of viscosupplementation and steroid: a review. *Acta Radiol*. 2005;46:288-296.
- Teixeira CF, Zamunér SR, Zuliani JP. et al. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. *Muscle Nerve*. 2003;28:449-459.
- Thurkow EW, van der Heijden IM, Breedveld F.C. et al. Increased expression of IL-15 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared with patients with *Yersinia*-induced arthritis and osteoarthritis. *J Pathol*. 1997;181:444-450.

- Tsikakos D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;851:51-70.
- Valentin E, Singer AG, Ghomashchi F, et al. Cloning and recombinant expression of human group IIF-secreted phospholipase A(2). *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;279:223-28.
- van de Loo F, Bennink MB, Arntz OJ et al. Deficiency of NADPH oxidase components p47phox and gp91phox caused granulomatous synovitis and increased connective tissue destruction in experimental arthritis models. *The American journal of pathology.* 2003;163:1525-37.
- van Kujik AW, DeGroot J, Koeman RC, et al. Soluble biomarkers of cartilage and bone metabolism in early proof of concept trials in psoriatic arthritis: effects of adalimumab versus placebo. *PLoS One.* 2010;3:e12556.
- van Meurs J, van Lent P, Holthuysen A. et al. Active matrix metalloproteinases are present in cartilage during immune complex-mediated arthritis: a pivotal role for stromelysin-1 in cartilage destruction. *J Immunol.* 1999;163:5633-39.
- van Scharrenburg GJ, Puik WC, Egmond MR. et al.. Effects of substitution of the absolutely invariant glutamine-4 and phenylalanine-5 in bovine pancreatic phospholipase A2 on enzymatic activity and substrate binding properties. *Biochemistry.* 1982;21:1345-1352.
- Verri W.AJr, Cunha TM, Parada CA, et al. Antigen-induced inflammatory mechanical hypernociception in mice is mediated by IL-18. *Brain Behav Immun.* 2007;21:535-43.
- Vincenti MP, Brinckerhoff CB. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res.* 2002;4:157-64.
- Wang JP, Teng CM. Roles of PMN leucocytes, platelets and some mediators in rat hind-paw oedema induced by two phospholipase A2 enzymes from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *J Pharm Pharmacol.* 1992;44:300-305.

- Wei XQ, Leung BP, Arthur HM, et al. Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in mice lacking IL-18. *J Immunol.* 2001;166:517-521.
- World Health Organization. Department of Chronic Diseases and Health Promotion. Chronic Respiratory Diseases and Arthritis (CRA). Geneva: Switzerland; 2010.
- Witowski J, Ksiazek K, Jorres A. Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:567-579.
- Wood JN, Docherty R. Chemical activators of sensory neurons. *Annu Rev Physiol.* 1997;59:457-82.
- Yamashita, H, ten Dijke P, Huylebroek D, et al. Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol.* 1995;130:217-226.
- Yang Y, Leech M, Hutchinson P, et al. Antiinflammatory effect of lipocortin 1 in experimental arthritis. *Inflammation.* 1997;21:583-96.
- Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N. The role of cyclooxygenase-1 and -2 in the rat formalin test. *Anestg Analg.* 2002;94:962-67.
- Yanni G, Whelan A, Feighery C. et al. Synovial tissue macrophages and joint erosion in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1994;53:39-44.
- Yoshida H, Imafuku Y, Ohhara M. et al. Endothelin-1 production by human synoviocytes. *Ann Clin Biochem.* 1998;35:290-94.
- Zambelli VO, Sampaio SC, Sudo-Hayashi LS, et al. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. *Toxicon.* 2008;51:1357-67.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983;16:109-110.

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

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

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