

INTRODUÇÃO

FANGOTERAPIA

A artrite reumatóide e a osteoartrite são doenças articulares crônicas degenerativas que apresentam sintomas comuns causados pelas alterações estruturais e funcionais das articulações: o principal é a dor (Altman e Dean, 1989; Bellamy e Breadley, 1996).

O tratamento eficaz da dor depende de uma avaliação cuidadosa e da aplicação de técnicas adequadas para o seu controle. A conduta a ser tomada para proporcionar alívio se baseia em duas abordagens. Primeiro, a atenção para com o conforto geral e o bem-estar do paciente: remoção da causa da dor, uso de repouso e/ou de exercícios e alívio de tensão emocional decorrente da ansiedade sobre os aspectos físicos e sociais da doença (Ferreira, 2001); em segundo, uso de medidas específicas para aliviar a dor, que incluem aplicação de calor, o uso de imobilização para evitar movimentos e o uso de substâncias específicas, entre as quais os analgésicos (Lohmander, 2000; Sharma, 2002). Apesar das drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINH) serem efetivas para o alívio da dor e melhora das limitações funcionais, elas não curam a artrite e usadas cronicamente podem causar sérios efeitos colaterais (Gabriel et al., 1991).

A eficácia das drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (DMARD) no tratamento da artrite reumatóide está, geralmente, associada a

sua habilidade de diminuir o influxo de neutrófilos para as articulações inflamadas (Kraan et al., 2000). Assim, estratégias para limitar a migração e/ou a ativação de neutrófilos têm recebido atenção como potenciais alternativos para o tratamento de artrites. Entretanto, tal como os AINH os DMARD apresentam efeitos colaterais com o uso a longo prazo.

Embora não totalmente aprovada pelos meios acadêmicos, uma modalidade de balneologia, a fangoterapia, vem sendo utilizada como método de tratamento coadjuvante para artrite reumatóide e osteoartrite.

Aplicações da fangoterapia

Nas duas últimas décadas a prática da fangoterapia (aplicação terapêutica de argila ou lama) como tratamento de doenças reumáticas tem tido grande adesão. Países como a Alemanha, Cuba, Rússia, Israel e Itália possuem centros de tratamento altamente equipados nos quais se aplica a fangoterapia para tratamento de inúmeras enfermidades: dores musculares (Grossi et al., 1993), lombalgia (Constant et al., 1998) e na reidratação da pele (Carabelli et al., 1998). Entretanto, sua maior aplicação se faz como adjuvante na terapia de doenças reumáticas. Quando associada as talassoterapia ou hidroterapia e combinada com terapias convencionais, a fangoterapia tem sido relatada como tendo um efeito favorável sobre a sintomatologia da artrite (Bellometti et al., 1997a, 1998, 2000; Galzigna et al., 1998; Elkayam et al., 1991; Sukenik et al., 1990, 1992, 1999).

Os efeitos benéficos das lamas das Termas de Abano e de Montegrotto situadas ao norte da Itália, na região de Pádua têm sido estudados em pacientes com osteoartrite diagnosticada por Raio-X e não usuários de drogas antiinflamatórias. A imersão do corpo em lama termal a 42°C por 20 minutos, seguida de banho em água termal a 38°C também por 20 minutos durante 12 dias tem mostrado uma significativa redução dos níveis séricos de importantes mediadores pró-inflamatórios como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Bellometti et al., 1997b), prostaglandina E₂ (PGE₂) e leucotrieno B₄ (LTB₄) (Bellometti e Galzigna, 1998) e aumento de substâncias antioxidantes no soro (transferritina e ceruplasmina), com conseqüente diminuição de peroxidação mediada por radicais livres (Bellometti et al., 1996). Adicionalmente, em pacientes com artrite reumatóide tem-se descrito a diminuição dos níveis séricos de óxido nítrico e da enzima mieloperoxidase (Bellometti et al., 2000, 2005).

Em pacientes com fibromialgia, a aplicação da lama de Ábano em associação com drogas antidepressivas estimulou o aumento das quantidades séricas de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), cortisol e β -endorfina, seguido pela redução da dor, depressão e melhora nas funções físicas e na qualidade de vida (Bellometti et al., 1999). Aumento transitório, mas significativo de concentrações de β -endorfina e ACTH em plasma de pessoas saudáveis foi correlacionado à uma resposta da glândula pituitária ao estresse térmico aplicado (Giusti et al., 1990). Com bases em seus estudos Bellometti e colaboradores têm atribuído os efeitos da lama das

termas de Abano e Montegrotto à sua alta capacidade de reter calor e de transferi-lo para o corpo, portanto dependente da temperatura aplicada.

Em Israel, a principal área de resorts de saúde está localizada ao oeste das margens do Mar Morto e é reconhecida por suas fontes de lamas termais ricas em enxofre e outros minerais (Halevy e Sukenik, 1998). A avaliação de índices clínicos em estudos randomizados, controlados e duplo-cego sobre a eficácia da aplicação de compressas da lama do Mar Morto aquecida a 42°C por 20 minutos durante 15 dias em pacientes com artrite reumatóide demonstrou uma melhora dos índices de rigidez matinal, força do aperto de mão, atividade diária e autopercepção da severidade da doença. Salienta-se que esses efeitos foram verificados em pacientes tratados apenas com lama ou lama associada ao banho sulfuroso, e comparados com o grupo de pacientes submetidos apenas ao banho sulfuroso (Sukenik et al., 1990). Neste estudo os autores também verificaram que os benefícios se mantiveram por até 3 meses após o tratamento. A partir de tais resultados os autores levantaram a hipótese de que, embora o maior tempo de exposição ao calor pudesse ser o responsável pelos efeitos da lama, a associação da lama ao banho sulfuroso potencializou a transferência e a ação de elementos traços presentes na mesma. Para testar tal hipótese, os mesmos pesquisadores realizaram outro estudo em que os pacientes com artrite reumatóide foram divididos em dois grupos – Grupo I = aplicação de compressas de lama a 40°C/20 minutos/15 dias; Grupo II = lama lavada com menos quantidade de minerais, mas de mesma aparência e consistência, sob as mesmas condições de tratamento que o grupo I

(Sukenik et al., 1992). Neste estudo, apenas os pacientes tratados com lama íntegra apresentaram melhora significativa dos índices de força de aperto de mão, atividade diária, percepção da severidade da doença, número de articulações ativas e do índice de Richie. Esses dados são corroborados pelos estudos de Flusser et al. (2002) e Codish et al. (2005), em que a aplicação da lama natural em relação a sua contrapartida lavada reduziu significativamente, por até um mês, o edema, o número de articulações afetadas e a severidade da dor.

Com o uso cada vez maior desse tipo de terapia, tem crescido a necessidade de estudos científicos para esclarecer quais são os mecanismos bioquímicos e fisiológicos responsáveis pelas ações dessas lamas, como forma de garantir uma confiança e segurança aos seus usuários.

Características de um pelóide

As lamas vulcânicas ou termais, também chamadas de fango, são produzidas pela mistura primária ou secundária de um componente sólido (geralmente um geomaterial argiloso), com uma água mineral seguido de maceração sem intervenção humana, formando pastas de viscosidade variável, concentradas em minerais, os quais apresentam quantidade superior à das águas termais. Quando a água subterrânea sobe para a superfície, impulsionada pelo calor, traz consigo todos os minerais do centro

da terra e os deposita na superfície, onde se acumulam e se misturam com a argila, formando o fango.

Após um período de maturação, a mistura dá origem a uma lama terapêutica (pelóide) usada nos spas e que podem variar um pouco na composição de elementos traços, de acordo com a água mineral que compõe a mistura.

Atualmente, a razão argila/água, o grau de maturação e a manuseabilidade do pelóide são padronizados e específicos para cada spa. Por exemplo, o processo de maturação em spas italianos envolve a interação argila/água e processos biológicos e bioquímicos que permitem o crescimento de microorganismos e de algas específicas (ver referências Veniale et al., 2004). A princípio, a argila virgem é misturada à água mineral em tanques abertos, totalizando um volume de 8 a 10m³ e coberta com uma camada fina de água na superfície. A pasta então é mexida periodicamente durante o período de maturação, que pode variar de 6 meses a 2 anos de acordo com a clínica. Após este período as lamas podem ser aquecidas entre 60°C e 120°C (esterilização) e antes da aplicação reaquecidas entre 40°C e 45°C.

Os diferentes tratamentos de maturação realizados com diferentes águas minerais e diferentes procedimentos podem influenciar as características do pelóide, tais como granulometria, parâmetros de consistência e parâmetros físico-químicos, que poderiam alterar algumas qualidades da lama consideradas importantes para os efeitos da peloterapia, por exemplo, alto índice de plasticidade, baixa capacidade de resfriamento,

bom contato com a pele e fácil aquecimento (Cara et al., 2000). Estes parâmetros seriam fundamentais para a melhor transferência de calor e de minerais para o corpo através da pele (Sukenik et al., 1992; Poensin et al., 2003; Veniale et al., 2004).

Galzigna et al. (1996) atribuem o principal efeito bioquímico da maturação da lama utilizada nas termas de Abano ao enriquecimento da mesma com um sulfoglilipídeo e de clorofila *a* produzidos por diatomáceas (Bacillariophyceae), simultaneamente ao aumento do pH e da concentração de oxigênio, após 60 dias, indicando uma ativa fotossíntese. Segundo os mesmos autores, um sulfoglicolipídeo, de peso molecular aproximado de 870 foi extraído de cerca de 5 micromoles/Kg desta lama maturada através de reação colorimétrica baseada em marcador catiônico.

Lama negra de Peruíbe

A cidade de Peruíbe, localizada no litoral sul do Estado de São Paulo, possui uma jazida de argila crenológica, conhecida como lama negra, encontrada às margens do rio Preto. Os efeitos terapêuticos desta lama datam desde a época em que os índios, em noites de lua cheia, realizavam um ritual no qual cobriam seus corpos com a argila viscosa e negra e rogavam ao deus Tupã por proteção divina contra diversas doenças e resistência a fadiga e às intempéries. A lenda se perpetuou na Vila Peruíbe com as comunidades caiçaras. Em meados de 1970, houve um princípio de criação das termas, mas a idéia foi abandonada em 1972, após a morte do

médico alemão Dr. Frederich Paech, responsável pelos estudos iniciais, cujo acervo científico foi perdido.

Atendendo solicitação da Prefeitura Municipal da Estância Balneária de Peruíbe, conforme proposta DIGEO/LPTR nº 29.755 de 01.08.2003, o Laboratório de Petrologia e Tecnologia de Rochas, do Agrupamento de Engenharia de Rochas, da Divisão de Geologia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo efetuou avaliação mineralógica, com auxílio de informações microbiológicas fornecidas pelo laboratório de microbiologia industrial deste Instituto, informações químicas fornecidas pelo laboratório de análises químicas inorgânicas deste Instituto e por empresa terceirizada e informações sobre irritabilidade em coelhos fornecida por empresa terceirizada, cujas características estão listadas no Anexo I (Quitete, 2005). A jazida possui 83 mil toneladas numa profundidade de 75m distribuídas em 5 hectares, o que leva a cidade à maior jazida natural do mundo, transformando o município em um ponto de destaque, considerando-se o potencial turístico, importante para seu desenvolvimento econômico.

Em 1998, a Prefeitura Municipal da cidade buscou estudos mais avançados para a comercialização e aplicações da lama negra. Os relatos da coordenação da saúde coletiva do município são bastante otimistas: “as propriedades medicinais da lama negra são surpreendentes; por exemplo, doenças reumáticas, como artroses e reumatismo ciático têm sido tratadas com o uso adequado da lama, além de ser utilizada também em doenças cutâneas, alergias e eczemas crônicos” (Gouvêa, P.F.M. 2001, comunicado a jornal).

Dois métodos de tratamento são realizados com a esta lama: o método cubano/israelita e o método italiano. O primeiro indicado para pacientes residentes na cidade, consiste na aplicação da lama, por 30 minutos, durante cinco dias por três semanas. Após este período, os pacientes ficam três semanas sem a aplicação e retornam caso seja necessário. O segundo método, indicado para turistas, consiste numa aplicação de 30 minutos por 12 dias consecutivos, seguidos de três semanas sem aplicação. Em ambos os casos, os ciclos se repetem até que os pacientes tenham alta médica.

Estudos sobre a caracterização e ações da lama negra de Peruíbe constituem interesse de saúde pública, uma vez que a fangoterapia pode ser uma alternativa terapêutica de boa aceitação e eficiente para o tratamento de processos reumatológicos disponível a maior parte da população.

Efeito placebo

Embora existam ainda poucas evidências científicas, da eficácia terapêutica da fangoterapia, é importante salientar que o trabalho de Sukenik et al. (1990) aponta para uma melhora de alguns índices clínicos objetivos e subjetivos em pacientes com artrite reumatóide, não tratados com a lama, que constituíam o grupo controle nesse estudo. Os autores afirmaram que esse resultado não era totalmente inesperado, uma vez que o protocolo foi realizado em spas e que nestas condições a alteração do estilo de vida poderia ser responsável pela melhora observada.

Em um estudo desenhado para avaliar a eficácia das várias modalidades de spa terapia em pacientes com lombalgia crônica em conjunto ao tratamento usual com drogas Constant et al. (1998) verificaram que o grupo que se submeteu a banho em água mineral corrente (36°C/10min) seguida de aplicação local de lama termal (45°C/15min) e de massagem (sob fluxo de água a 36°C/20min) apresentou melhora em relação ao grupo controle (sem tratamento) quanto à avaliação dos índices de qualidade de vida e de saúde e não observaram diferenças para os escores de saúde mental e de depressão.

Outra questão interessante em relação aos resultados descritos sobre a fangoterapia é o fato dos protocolos de aplicação de lama termal serem sempre seguidos de banho termal ou de massagem. Essa prática não permite avaliar se os efeitos benéficos descritos são devido a um ou outro componente de terapia. O tempo de tratamento (cerca de 40 minutos) seis vezes por semana pode ser uma boa oportunidade para relaxar. Na literatura disponível, não há nenhum trabalho com grupo placebo, o que nos impede de aquilatar com precisão as contribuições da fangoterapia *per se*.

Em geral, a balneologia e a termoterapia causam um estresse térmico de curto tempo, que é manifestado pelo aumento da secreção de noradrenalina, adrenalina, cortisol e hormônio de crescimento (Kukkonen-Harjula e Kauppinen, 1988), bem como de β -endorfina (Jezova et al., 1985). Este estresse físico pode exercer um efeito analgésico baseado em diferentes mecanismos: o efeito antiinflamatório do cortisol, e a influência

positiva das catecolaminas no metabolismo das prostaglandinas (Kukkonen-Harjula e Kauppinen, 1988).

Assim, independentemente do mecanismo de ação, das várias modalidades de terapias alternativas usadas nos spas, a experiência de relaxamento, da redução da tensão emocional e do estresse diários elevam o humor, diminuem o tônus muscular e, possivelmente, a dor ou a percepção da dor que estes pacientes apresentam ao chegar para se submeterem a esses tratamentos alternativos (Cherkin, 1998; Strauss-Blassche et al., 2002).

MODELOS EXPERIMENTAIS

A dificuldade de realização de alguns estudos em pacientes por razões técnicas ou éticas levou à necessidade do desenvolvimento de modelos experimentais de artrites que apresentem semelhanças com essas doenças.

No caso das artrites inflamatórias, tais similaridades implicam em pontos comuns na seqüência de eventos que levam à inflamação e destruição articulares, com algumas características clínicas, morfológicas e bioquímicas da artrite reumatóide e da osteoartrite.

Uma vez que, nesses modelos experimentais se pode traçar alguns paralelos com as alterações clínicas e histológicas observadas nas doenças, é possível se realizar manipulações experimentais para teste de novos medicamentos e/ou procedimentos, com melhor controle das variáveis envolvidas no tratamento, com exclusão total do efeito placebo. A

mensuração da lesão na cartilagem articular é considerada um dos parâmetros necessários para o modelo ser fidedigno, uma vez que traduz as diversas alterações teciduais que ocorrem na evolução do processo artrítico.

Em nosso estudo a utilização de diferentes modelos experimentais vem minimizar as questões relacionadas ao possível efeito placebo de lamas terapêuticas, possibilita o acompanhamento da evolução da doença e torna possível o estudo histológico das alterações da sinóvia e da cartilagem, uma vez que amostras humanas são de difícil obtenção.

Para o desenvolvimento deste trabalho foram escolhidos três modelos experimentais com reprodutibilidade e possibilidade da aplicação da lama negra por diferentes períodos de tempo e diferentes estágios de desenvolvimento de artrite e osteoartrite, com o intuito de se fazer o estudo respeitando os protocolos usados no Lamário de Peruíbe.

Partindo da premissa que a artrite reumatóide é uma doença autoimune, Dumonde e Glynn, em 1961 descreveram um modelo experimental que consiste na indução da artrite, por injeção intra-articular de um antígeno protéico em animal previamente imunizado (AIA). A partir de então, muitas modificações têm sido feitas no modelo, da padronização dos métodos de indução e de avaliação da artrite às seqüências das alterações citológicas e histológicas, o que tem tornado a AIA em coelhos adequada para vários estudos em diferentes fases da artrite, já que essas fases são comparáveis às fases aguda e crônica da doença (Goldtust et al., 1978; Gall e Gall, 1980; Howson et al., 1986; Sánchez-Pernaute et al., 2003). O modelo de AIA tem sido bastante empregado no estudo de drogas antiinflamatórias,

também em nosso meio (Novaes et al., 1996; Palácios et al., 1999, Lotito et al., 2004).

Nas primeiras 24 horas após o estímulo de uma única injeção intra-articular do antígeno protéico, coelhos sensibilizados apresentam uma resposta inflamatória aguda caracterizada por uma reação de Arthus na articulação. Esta reação se desenvolve em vasculites intensas, hipertrofias das células da membrana sinovial (Brum-Fernandes et al., 1987), erosões com deposições de imunocomplexos na superfície da articulação (Cooke e Jasin, 1972; van Beusekom et al., 1982), ativação do sistema de complemento e acúmulo de leucócitos polimorfonucleares como principal célula infiltrante no exsudato do fluido sinovial e tecidos periarticulares (Brum-Fernandes et al., 1987; Goldtust et al., 1978).

O estágio crônico iniciado após 30 dias, permanece por até cerca de 11 meses, com características histológicas semelhantes às observadas no tecido sinovial reumatóide (Gall e Gall, 1980; Sánchez-Pernaute et al., 1997), marcado pela hiperplasia e infiltração de linfócitos, macrófagos e plasmócitos (Goldtust et al., 1978; Gall e Gall, 1980; Brum-Fernandes et al., 1987). A cartilagem das articulações inflamadas apresenta várias alterações: lacunas vazias, degeneração de condrócitos e condrócitos com vacuolização e núcleos picnóticos (Gall e Gall, 1980).

Em outro modelo descrito por Gegout et al. (1995), a artrite é desencadeada por injeção intra-articular de zymosan em ratos. O zymosan é um polissacarídeo derivado da parede do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, que quando inoculado intra-articularmente induz uma resposta inflamatória

com uma persistente proliferação sinovial e degradação da cartilagem, de aspecto semelhante aos achados histológicos da doença reumatóide (Ramos et al., 2001). Essas manifestações articulares são, aparentemente, dependentes de PGE₂ (van de Loo et al., 1995) e IL-1 (Gegout et al., 1995).

O processo agudo que dura os três primeiros dias é caracterizado por aumento da permeabilidade vascular seguida por migração de células polimorfonucleares para o líquido sinovial já nas primeiras 6 horas (Rocha et al., 2003). A partir do sétimo dia após a indução, o lavado sinovial é caracterizado por influxo de células mononucleares o que caracteriza a fase subaguda. A seguir, ocorre uma persistente proliferação de células da íntima sinovial e infiltração de linfócitos e macrófagos, progredindo com acentuada angiogênese e fibrose ao 14º dia (Bezerra et al., 2004), além da formação de pannus (Rocha et al., 2003).

Em análise histológica, Ramos et al. (2001) observaram que sete dias após a indução, já ocorre lesão na cartilagem, principalmente na junção com o osso subcondral adjacente; no 21º dia ocorre desprendimento superficial da capa cartilaginosa, culminando ao 28º dia com formação de fendas extensas e fragmentação estrutural. Estes aspectos histológicos mostraram correlação com os ensaios histoquímicos realizados no mesmo estudo, nos quais os autores observaram significativa perda de ácido hialurônico e de glicosaminoglicanos evidenciada pela perda da afinidade tintorial da matriz cartilaginosa em coloração pelo método de azul de Alcian e densitometria, respectivamente.

O modelo experimental de osteoartrite baseia-se na instalação da forma secundária, induzida por uma desestabilização articular induzida por meniscectomia parcial do joelho direito de coelhos. Neste modelo, o terço anterior do mesmo é exposto e a metade anterior do menisco lateral é removida por secção do ligamento periférico, a qual leva a uma desestabilização articular descrita inicialmente por Moskowitz et al. (1973) e largamente utilizado em nosso meio (Velosa et al., 1999; Velosa, 2001). Está bem caracterizada a participação dos colágenos IX e XI na remodelação da matriz cartilaginosa durante a progressão da osteoartrite a 3, 14 e 22 semanas após o procedimento cirúrgico. As alterações histológicas começaram a ser observadas nas cartilagens obtidas dos joelhos operados a partir da terceira semana e são caracterizadas por desorganização celular, perda de condrócitos e modificação na rede colagenosa evidenciada pela coloração por Tricômio de Masson. Após 14 semanas essas alterações são mais pronunciadas, com alterações nas regiões mais profundas da cartilagem e com formação de grupos celulares nas regiões sem condrócitos, evoluindo para descontinuidade da superfície articular, fissuras, hiper celularidade difusa e formação de “clusters” após 22 semanas (Velosa, 2001). Recentemente, Lavigne et al. (2005) reportaram que após 12 semanas de desestabilização da articulação a atividade de metaloproteinases e a concentração de óxido nítrico aumentaram significativamente no osso subcondral, enquanto que a concentração de PGE₂ aumentou tanto no osso como na trabécula óssea, quando

comparados com articulações normais de coelhos, indicando uma intensa remodelagem tanto do osso subcondral quanto da trabécula.

Embora seja possível obter alterações mais graves em curto período de tempo, através de uma maior desestabilização por lesão de ligamentos colaterais e cruzados (Moskowitz et al., 1973), a escolha pela indução de uma osteoartrite mais branda se deve à maior aproximação das alterações iniciais ou silenciosas da doença humana (Velosa, 2001).

OBJETIVOS

Avaliar a eficácia antiinflamatória da lama negra de Peruíbe em modelos experimentais de artrite:

- Avaliar parâmetros da resposta inflamatória articular tais como: o influxo celular e alterações na membrana sinovial em modelos experimentais de artrite que mimetizam diferentes fases da artrite reumatóide humana
- Avaliar os efeitos da lama sobre o processo de degeneração cartilaginosa que ocorrem nos modelos experimentais de artrite induzida por zymosan em ratos e de osteoartrite induzida por meniscectomia parcial em coelhos.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizados 30 ratos machos, da raça Wistar, pesando entre 200-250g para de artrite induzida por zymosan (AIZ). Os animais foram mantidos, com alimentação e *água ad libitum* durante a fase de experimentação, em grupos de 3 a 5 animais por gaiola. Nos ensaios de AIA e de OA foram utilizados 22 e 13, respectivamente, coelhos da raça New Zealand, com peso variando entre 2,0 e 2,5Kg, sendo os animais mantidos em gaiolas individuais.

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e receberam água e ração *ad libitum*, no Biotério climatizado da Disciplina de Reumatologia. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal de COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentos com Animais).

MODELOS EXPERIMENTAIS

Artrite induzida por antígeno (AIA) em coelhos

Como descrito previamente (Palácios et al., 1999) 5,0mg/ml de soroalbumina bovina metilada (mBSA, Sigma Chemical Co., ST Louis, USA), dissolvidos em 1,0ml de salina estéril e emulsificados em igual volume de

adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co., St Louis, USA), foram inoculados subcutâneamente na região glútea (0,5ml) e no dorso (1,0ml) de coelhos brancos da raça New Zealand.

Após 15 dias da imunização primária, os animais receberam um reforço intradérmico de mBSA a uma concentração de 1mg/ml de salina em 5 sítios. A reação de Arthus produzida foi acompanhada por um período de 24 a 48 horas e novos reforços foram feitos com intervalos de uma semana. Todos os animais responderam positivamente até o terceiro reforço. Sete dias após o último reforço intradérmico os coelhos foram anestesiados com 5,0mg/Kg de xilazina e 50mg/Kg de quetamina para receberem na articulação esquerda 1,0mg/ml de solução de mBSA em salina e na articulação contralateral igual volume de salina estéril apirogênica. Os animais foram divididos randomicamente em três grupos de tratamento e após 7 dias foram sacrificados com “overdose” de quetamina. As articulações foram lavadas com 2,0ml de salina contendo EDTA e o exsudato sinovial foi coletado e mantido em banho de gelo. As membranas sinoviais foram cirurgicamente retiradas.

Artrite induzida por zymosan (AIZ) em ratos

Ratos Wistar anestesiados com 0,4ml da mistura de 1,0mg/kg de peso de xilazina e 0,75mg/kg de quetamina foram submetidos a injeção intra-articular de 1,0mg de zymosan (Sigma–Chemical Company, St Louis) dissolvidos em 50µl de solução salina estéril apirogênica no joelho esquerdo.

O joelho direito recebeu igual volume de salina para controle intra-animal (Ramos et al., 2001). Os animais foram divididos em três grupos para o esquema terapêutico. O sacrifício foi realizado em câmara de CO₂ ao 21º dia após a indução. As articulações foram lavadas com 0,4 ml de salina contendo EDTA e o exsudato sinovial foi coletado e mantido em banho de gelo. As articulações artríticas foram cirurgicamente retiradas em bloco para processamento histológico.

Osteoartrite induzida por meniscectomia parcial

A meniscectomia parcial do joelho direito de coelhos foi realizada em condições estéreis, sob anestesia com 5,0mg/Kg de xilazina e 50mg/Kg de quetamina. O procedimento cirúrgico foi realizado através de uma incisão parapatelar lateral no joelho, seguida da retração do tecido subcutâneo, na qual a cápsula articular foi exposta e um quarto anterior do menisco lateral foi removido, mantendo a integridade dos ligamentos. Os joelhos esquerdos não sofreram intervenção cirúrgica e constituíram controle intra-animal. Após a remoção cirúrgica de parte do menisco foram feitas suturas e os animais foram devolvidos às suas gaiolas e mantidos com água contendo 15 gotas de dipirona/1l, por 24 horas.

Ao término de 14 semanas de experimento os coelhos foram sacrificados com overdose de quetamina, e o líquido e a membrana sinovial coletados. As articulações foram então expostas e lâminas da cartilagem dos côndilos e platôs foram extraídas.

PLANO DE TRATAMENTO

Em todos os experimentos os animais foram randomicamente subdivididos em três grupos:

- Grupo controle = animais que não foram submetidos a nenhum tratamento e foram mantidos em suas gaiolas até o final do experimento;
- Grupo água = animais que foram submetidos ao tratamento com água normal aquecida a 40°C por 30 minutos.
- Grupo lama = animais que foram submetidos ao tratamento com a lama negra de Peruíbe aquecida a 40°C por 30 minutos.

Os coelhos, após serem anestesiados, receberam o tratamento de água e lama por meio de compressas em cada um dos joelhos, os quais foram imediatamente envolvidos em sacos plásticos e embrulhados em cobertor. Após os 30 minutos de aplicação, as patas foram lavadas com água aquecida à mesma temperatura, enxutas e os animais retornaram às suas gaiolas. Os coelhos que pertenciam ao protocolo de AIA receberam os tratamentos de água e lama diariamente por um período de 7 dias. Aqueles pertencentes ao protocolo de osteoartrite receberam os tratamentos duas vezes por semana, durante 14 semanas.

Os ratos foram colocados em gaiolas plásticas, contendo 300ml de água ou lama. Esta quantidade foi suficiente para cobrir as patas dos animais. Transcorrido o período de tratamento, os animais foram banhados

com água aquecida à mesma temperatura e então devolvidos às suas gaiolas. Tal procedimento foi realizado diariamente, por um período de 21 dias (exceto sábados e domingos).

ALIMENTAÇÃO DA LAMA

O fango maturado foi obtido do mangue pela PRODEP (Progresso e Desenvolvimento de Peruíbe S.A), mantido em tanques fechados no Lamário de Peruíbe para que não ocorresse a evaporação e encubado com 10 a 15cm de água marinha fresca renovada a cada 30 dias. A importância da água marinha coletada da praia da cidade de Peruíbe próxima ao morro e em alto mar deve-se ao fato de ser ela rica em sulfito, que será reduzido ao composto sulfídrico, quando em contato com o ar. Este composto sulfídrico garante o caráter sulfúrico da lama.

A cada mês foram trazidos do Lamário de Peruíbe 2,5 litros de lama, para serem utilizados nos experimentos. Estas amostras de lama negra foram mantidas em potes fechados cobertas com uma lâmina de água marinha (de 10-15cm) também coletada na cidade e que foi renovada toda semana.

COLETA DO EXSUDATO INFLAMATÓRIO

Após o sacrifício, as articulações foram lavadas com salina estéril contendo 1,0mg/ml de EDTA (0,4ml para os ratos e 2,0ml para os coelhos).

O material foi aspirado e colocado em tubos mantidos em banho de gelo. Alíquotas dos lavados sinoviais foram diluídas 1/10 em salina e utilizadas para contagem total de células em câmara de Neubauer. O restante do material foi centrifugado a 1500 rpm/ 15 min., a 4°C. O botão celular, obtido da centrifugação, foi ressuspensão em quantidade mínima de soro fetal bovino e empregado para a contagem diferencial de células, em esfregaços corados por Leishman.

ANÁLISE MORFOLÓGICA

Membrana sinovial

As membranas sinoviais das articulações operadas/desafiadas e contralaterais obtidas de coelhos e ratos foram fixadas em solução de formaldeído a 10%, embebidas em parafina e os cortes de 4µm corados com hematoxilina e eosina foram utilizados para a avaliação semiquantitativa de leucócitos infiltrantes, proliferação vascular e hiperplasia em um escore de (0-3) realizado por três experientes patologistas, em estudo duplo-cego. A ausência de qualquer uma dessas alterações na sinóvia correspondeu ao grau 0 e o grau 3 correspondeu às mais severas alterações. A contagem de células (sinoviócitos e condrócitos) foi feita em aumento de 400X, usando um retículo de 50 linhas e 100 pontos de contagem. Foram contadas células em dez a quinze campos microscópicos e a quantidade de células que incidiam nos pontos de contagem foi expressa em porcentagem (Pinto et al., 2003).

Cartilagem articular

As articulações dos ratos retiradas em bloco, foram fixadas em folmaldeído a 10%, descalcificadas com 6,5% de EDTA durante 3 semanas, embebidas em parafina e seccionadas em cortes de 4 μ m.

Amostras de cartilagem dos côndilos e platôs das articulações dos coelhos submetidos ao protocolo de osteoartrite, após fixação e inclusão, sofreram o mesmo tratamento e colorações que as articulações dos ratos.

Foram realizadas análises morfométricas em lâminas coradas com hematoxilina e eosina com auxílio do retículo. O número total de células foi em células/ μ m². A formação de pannus e erosões da cartilagem articular foram graduados numa escala de severidade de 0 a 3 e avaliadas por três observadores diferentes. A estrutura, a celularidade, o conteúdo de proteoglicanos e quantidade de colágeno foram avaliados pela graduação de Mankin (Mankin et al., 1971). Para a observação de proteoglicanos as lâminas foram coradas com azul de Alcian 1,0% pH 2,5. A coloração por Tricrômio de Masson foi utilizada para estudo da fibrose cartilaginosa. O conteúdo de colágeno foi analisado pela coloração de picro-Sirius, com auxílio de microscópio com luz polarizada. O índice de colágeno da matriz é expresso em porcentagem de área de cartilagem que continha material corado pelo picro-Sirius.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. Para comparar as diferenças entre as médias, foi utilizado ANOVA seguido pelo teste Student Newman Keuls. O nível de significância escolhido foi 0,05.

RESULTADOS

MODELOS EXPERIMENTAIS DE ARTRITE

A fim de investigar a contribuição da eficácia antiinflamatória da terapia utilizando a lama negra de Peruíbe, foram avaliados os parâmetros de influxo de leucócitos para a cavidade articular e membrana sinovial, bem como possíveis alterações na estrutura da cartilagem em três modelos experimentais de artrite, representando diferentes estágios da doença.

A Figura 1 apresenta os resultados das contagens total e diferencial de leucócitos presentes no líquido sinovial obtido de articulações artríticas de coelhos após 7 dias de desafio intra-articular com 1,0 mg of mBSA. Os dados apontam com clareza a ineficácia do tratamento com a lama sobre o influxo leucocitário neste modelo experimental de artrite aguda, quando comparado com os dados obtidos de líquido sinovial de articulações de animais não tratados ou tratados com compressas de água quente. A migração tanto de células polimorfonucleares (PMN) quanto de células mononucleares (MN) para a área inflamada não foi alterada pelo tratamento.

A Figura 2 mostra as contagens total e diferencial de leucócitos no líquido sinovial de articulações de ratos desafiadas com 1,0mg of zymosan, após 15 dias de tratamento. O predominante influxo de células MN para a cavidade articular indica a presença de uma resposta inflamatória crônica.

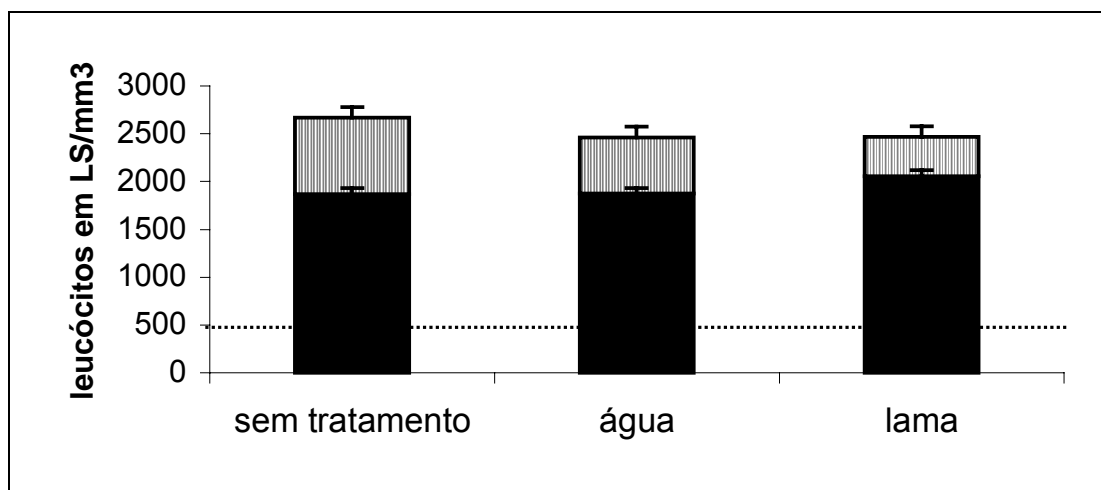


Fig. 1. Contagens total e diferencial de leucócitos realizadas no lavado articular de coelhos com AIA. Grupo de animais não tratados (n=6), grupo de animais tratados com água quente (n=8) grupo de animais tratados com lama quente (n=8). PMN = polimorfonuclear ■, MN = mononuclear ▨. Articulações contralaterais (.....). Resultados expressos como média \pm e.p.m.

O tratamento consistiu de imersões diárias das patas em água ou em lama quentes durante 15 dias. Nossos resultados mostram claramente que o tratamento com a lama foi eficaz em reduzir significativamente a migração de leucócitos para a área inflamada, quando comparados aos dados obtidos das contagens em líquido sinovial de articulações não tratadas (PMN, $p = 0,008$ e MN, $p = 0,03$) e tratadas com água quente (PMN, $p = 0,03$ e MN, $p = 0,007$). Esta observação praticamente exclui o fato da alta temperatura que é aplicada ser responsável pelo efeito da lama na melhoria dos parâmetros inflamatórios.

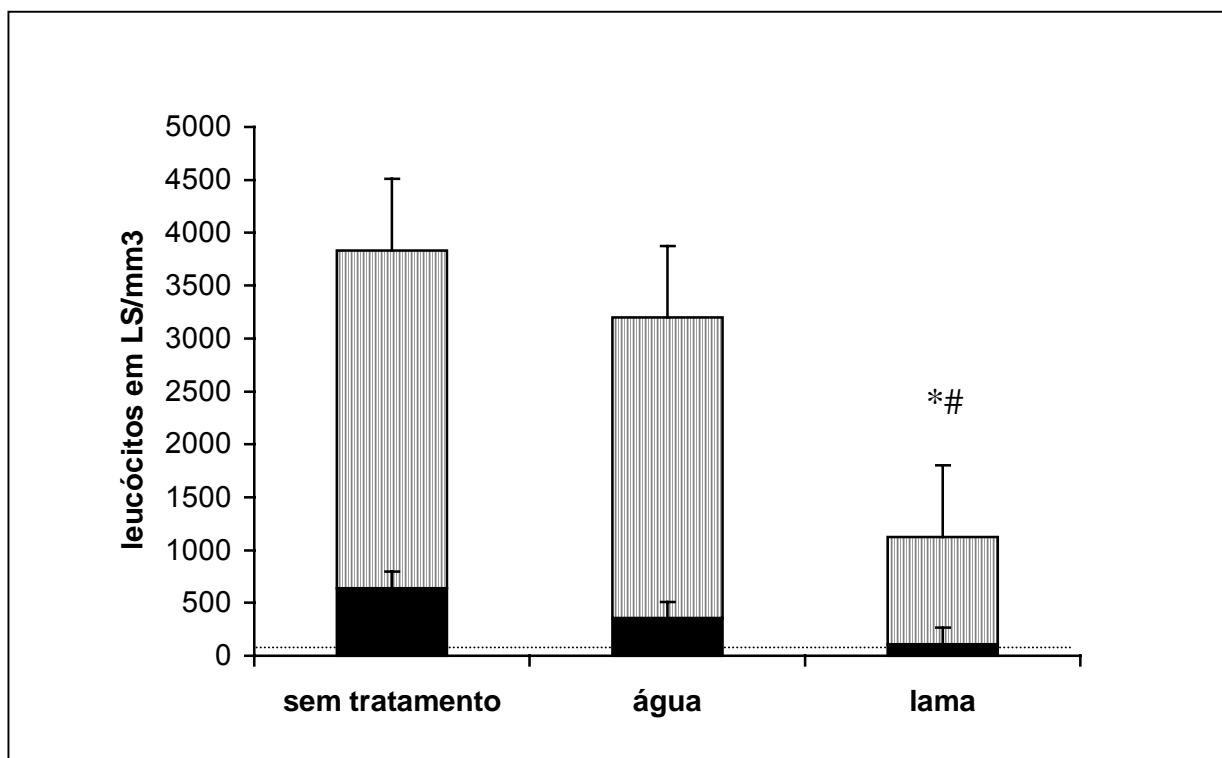


Fig. 2. Contagens total e diferencial de leucócitos realizadas em lavado articular de ratos com AIZ. Grupo de animais não tratados (n=10), grupo de animais tratados com água quente (n=10) e grupo de animais tratados com lama quente (n=10). PMN = polimorphonuclear ■, MN = mononuclear ▨, Articulações contralaterais (.....). Resultados expressos como média \pm e.p.m. * = $p < 0,05$ vs. controle ; # = $p < 0,05$ vs. água quente.

A análise histológica de membranas sinoviais coletadas de ratos com AIZ está sumarizada na Tabela I e Figura 3. As membranas obtidas de animais artríticos não tratados apresentaram espessamento da camada íntima devido à proliferação de sinoviócitos e a camada sub-íntima se apresentou marcadamente infiltrada por células linfomononucleares (Figura 3-A e B). Não foi verificada qualquer diferença de alterações entre as membranas sinoviais extraídas de animais do grupo controle e daquelas extraídas de animais submetidos ao tratamento com água quente (Figura 3-

C e D). Um exemplo do efeito do tratamento com a lama sobre a membrana sinovial obtida de ratos está ilustrado na Figure 3–E e F, onde a superfície da membrana apresenta uma única camada celular de sinoviócitos. Apesar da área sub-íntima apresentar uma infiltração de monócitos persistente, a melhora da infiltração celular está bem documentada na Tabela I por meio da contagem celular realizada com auxílio de um retículo em microscópio de luz (grupo lama $p = 0,0001$ vs controle e $p = 0,02$ vs água). Uma hipocelularidade foi também verificada pela graduação realizada por patologistas ($p = 0,0003$ vs controle; $p = 0,005$ vs água). Adicionalmente, outros importantes parâmetros foram significativamente atenuados pelo tratamento com a lama: hiperplasia ($p = 0,006$ vs controle e $p = 0,003$ vs água) e proliferação vascular ($p = 0,003$ vs controle e $p = 0,01$ vs água).

Tabela I – Avaliação histológica de membranas sinoviais de ratos com AIZ no 21º dia

Parâmetros histológicos	Animais		
	Controle (não tratado) (n=10)	Tratados com água quente (n=10)	Tratados com lama quente (n=10)
Hiperplasia	2,8 ± 0,08	2,6 ± 0,18	1,73 ± 0,23 [#]
Número de vasos	2,4 ± 0,23	2,3 ± 0,24	1,73 ± 0,22 [#]
Infiltração celular	2,8 ± 0,11	2,55 ± 0,17	1,82 ± 0,18 [#]
Contagem de células	25,21 x 10 ⁻² ± 1,52	21,06 x 10 ⁻² ± 2,67	13,8 x 10 ⁻² ± 2,13 [#]

O escore expressa hiperplasia, proliferação vascular e células infiltrantes em uma graduação de 0 a 3. Contagem de células é expressa em % (número de pontos que sobrepõem as células divididos pelo número total de pontos que sobrepõem o tecido). Os resultados são expressos como médias ± e.p.m. *p < 0,05 vs. controle; # p < 0,05 vs. água quente

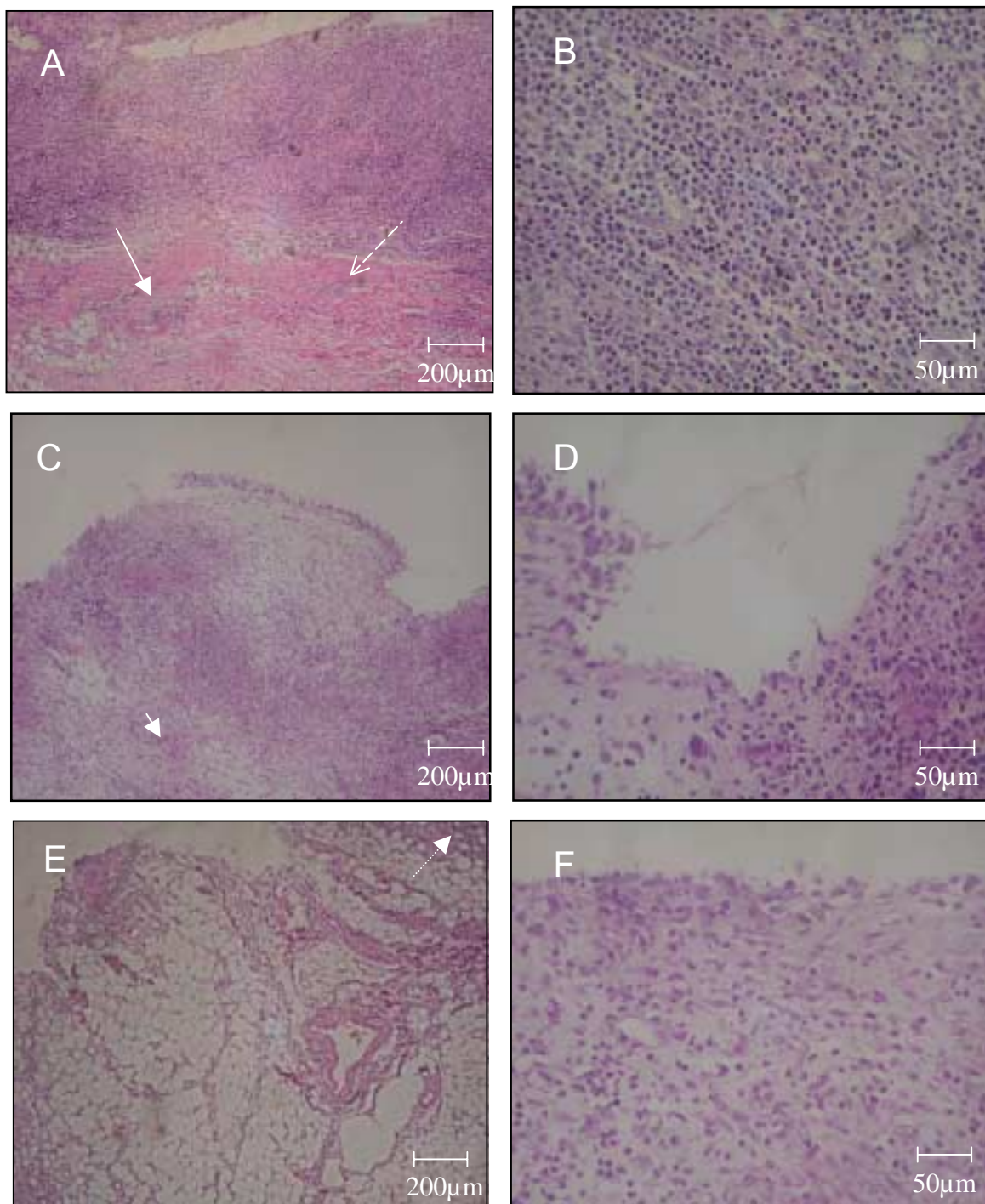


Fig. 3. Histopatologia de tecido sinovial de articulação de ratos desafiados com 1mg/0,5µl de zymosan coradas com H&E. O tecido foi removido 21 dias após o desafio intra-articular (15 dias de tratamento). (A) Sinovite de ratos não tratados ao aumento de 100X e (B) 400X, mostrando persistente infiltração mononuclear; (C) membrana sinovial obtida de animal tratado com água, mostrando hiperplasia sinovial e intensa infiltração celular a 100X e em (D) a 400X; (E) Membrana sinovial de ratos tratados com lama a 100X e em (F) a 400X. —▶ aponta vasos sangüíneos; ----▶ aponta fibrose.

As alterações observadas nas articulações de ratos artríticos e tratados com água incluem erosão difusa, com necrose da cartilagem articular. Frequentemente, um tecido invasivo, similar ao pannus pôde ser visto na superfície das cartilagens afetadas (Figura 4–A,B,D e E). Em alguns casos, o processo inflamatório estendeu-se através da cartilagem e epífise óssea em direção à medula óssea adjacente. Nas articulações obtidas dos animais submetidos ao tratamento com lama (Figura 4–C e F) ocorreu manutenção do espaço articular e a integridade da cartilagem. A Tabela II sumariza as observações da estrutura e da coloração encontradas nas articulações obtidas dos três grupos de animais, por meio da graduação de Mankin. Nenhuma diferença significativa foi observada nos parâmetros de morfologia e contagem celular entre os grupos controle e água. O aumento moderado do número de condrócitos ($p = 0,04$ vs água e $p = 0,02$ vs controle), do escore para a conservação da estrutura ($p = 0,04$ vs água e $p = 0,03$ vs controle) e a conservação da rede da coloração de colágeno constatada pela coloração com Tricrômio de Massom ($p = 0,04$ - Figura 4-C), e pela coloração com picro-Sirius ($p = 0,04$ vs água e $p = 0,03$ vs controle - Figura 4–F) foram observados em animais tratados com lama quando comparados aos grupos água e controle, indicando que o tratamento com a lama previniu ou retardou o processo de degeneração da cartilagem. Nem o tratamento com a lama (Figura 4-I) nem com água quente (Figura 4–H) alteraram a coloração para proteoglicanos, quando comparados com o grupo controle (Figura 4-G).

Tabela II – Avaliação histológica de articulações de ratos com artrite induzida por Zymozan no 21º dia

Parâmetros histológicos	Animais		
	Controle (não tratado) (n=4)	Tratado com água quente (n=5)	Tratado com lama quente (n=4)
Contagem de células	5,1 ± 0,48	5,6 ± 0,34	7,3 ± 0,69 [#]
Estrutura	4,92 ± 0,43	5,27 ± 0,24	3,5 ± 0,73 [#]
Celularidade	1,67 ± 0,30	2,07 ± 0,22	1,42 ± 0,34
Coloração/Azul de Alcian	2,75 ± 0,28	2,89 ± 0,16	2,5 ± 0,51
Coloração/Tricrômio de Massom	2,17 ± 0,096	2,67 ± 0,23 [*]	2,08 ± 0,16 [#]
Coloração/picro-Sirius	10,8x10 ⁻² ± 2,3x10 ⁻²	11,6x10 ⁻² ± 2,1x10 ⁻²	22,2x10 ⁻² ± 4,4x10 ⁻² ^{#*}
Tidimark	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0

Graduação de Mankin em articulações de ratos com AIZ. Contagem de células expressa em % (número de pontos que sobrepõem as células dividido pelo número total de pontos que sobrepõem o tecido). Coloração com picro-Sirius expressa como % de área. Resultados expressos como média ± e.p.m. *p < 0,05 vs. animais não tratados; # p < 0,05 vs. animais tratados com água quente.

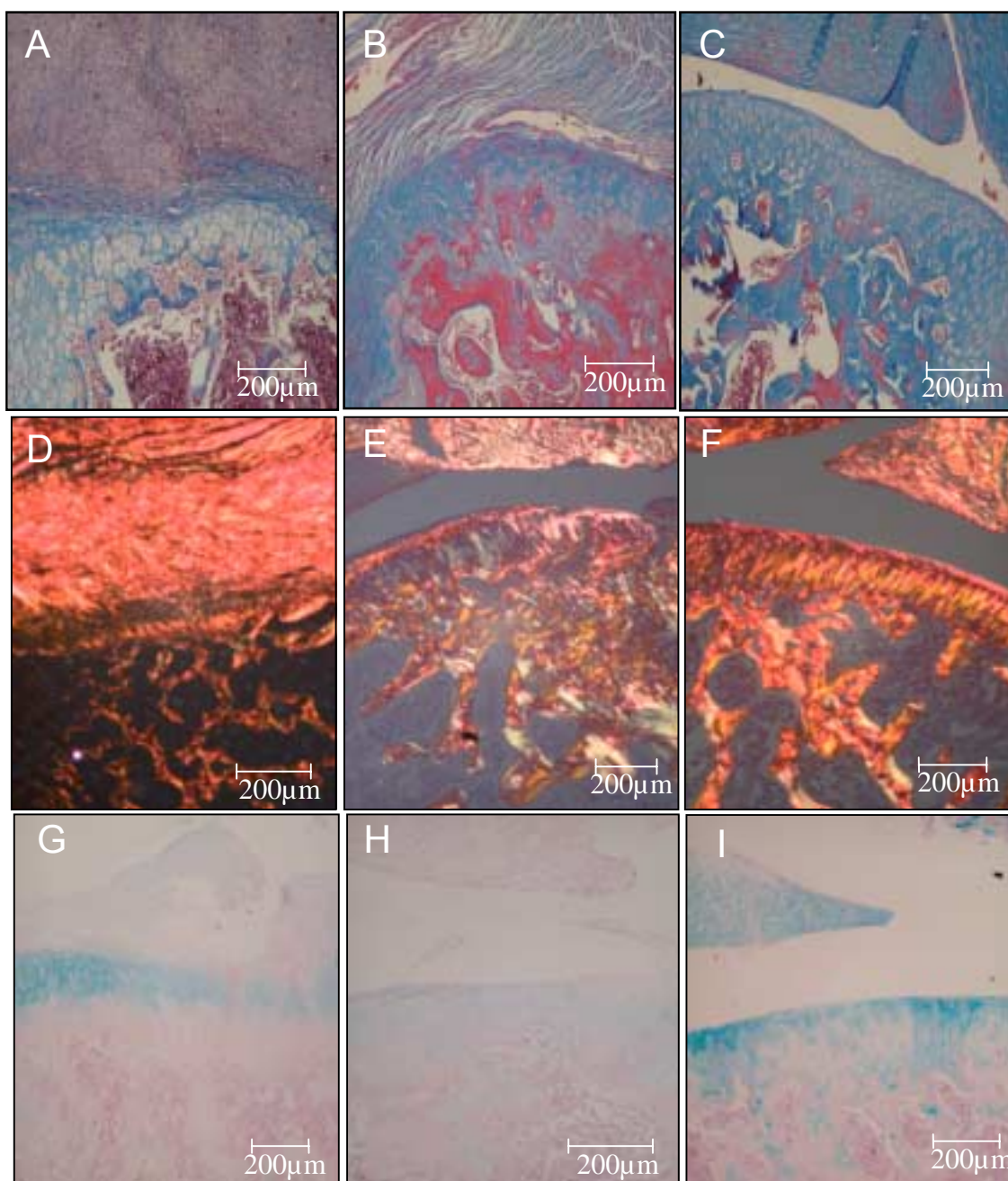


Fig. 4. Articulações de ratos com AIZ. A coloração com Tricrômio de Massom indica erosão da cartilagem com desenvolvimento de fibrose, pannus e dano no osso subcondral em articulação de grupo de animais não tratados (A) e de animais tratados com água quente (B), comparada à articulação de animais de grupo tratado com lama quente (C). Conteúdo de colágeno em articulações de animais não tratados (D), tratados com água (E) e tratados com lama negra de Peruíbe (F) visualizada por coloração com picro-Sirius. A coloração com azul de Alcian demonstra perda de proteoglicanos em cartilagens de grupo controle (G), tratado com água (H) e tratado com lama (I). Aumento original de 100X.

MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE

As alterações das cartilagens de coelhos com OA não foram alteradas pelo tratamento com água quente. Índices morfométricos, bem como as graduações de colorações para colágeno e proteoglicanos não foram diferentes dos verificados no grupo controle sem nenhum tratamento (Tabela III). As alterações histológicas nas cartilagens de coelhos com OA incluem baixa contagem de células, áreas desprovidas de condrócitos (Figura 5-A). As cartilagens de animais tratados com lama apresentaram um maior número de condrócitos ($p = 0,02$ vs água e controle), melhor conservação da estrutura ($p = 0,02$ vs água e $p = 0,01$ vs controle) e organização celular com hiper celularidade ($p = 0,008$ vs controle) (Figura 5-C). Alterações da matriz para proteoglicanos (Figura 5-H) e para colágeno (Figura 5-B) ocorreram desde a superfície até a zona mais profunda da cartilagem, indicando que o tratamento com água quente não impediu a degradação de proteínas da matriz de cartilagens obtidas de animais submetidos a este tratamento e que puderam ser confirmadas pela graduação de Mankin (Tabela III). Não foi possível avaliar as ulcerações no osso subjacente e a violação da tidemark. Apesar de alguns cortes de cartilagens osteoartríticas terem apresentado moderado aumento de afinidade tintorial para proteoglicanos, após o tratamento com a lama negra de Peruíbe (Figura 5-I), a graduação de Mankin no grupo tratado com lama não apresentou diferença estatística, quando foi comparada com os outros dois grupos (água e sem tratamento). Inversamente, o tratamento parece proteger significativamente a degradação

de colágeno, como se pôde constatar pela graduação da coloração com Tricrômio de Masson ($p = 0,0003$ - Figura 5-C) e por uma maior polarização da coloração por picro-Sirius ($p = 0,012$ vs água e $p = 0,02$ vs controle - Figura 5-F).

Tabela III –Avaliação histológica de cartilagens de coelhos com OA de 14 semanas

Parâmetros histológicos	Animais		
	não tratados	tratados com água quente (n=5)	tratados com lama (n=6)
Contagem de células	$1,9 \times 10^{-3} \pm 2,8 \times 10^{-4b}$	$2,4 \times 10^{-3} \pm 2,8 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-3} \pm 3,0 \times 10^{-4\#\ast}$
Estrutura	$2,80 \pm 0,11^b$	$3,36 \pm 0,54$	$1,65 \pm 0,36^{\#\ast}$
Celularidade	$2,14 \pm 0,29^b$	$1,28 \pm 0,16^{\ast}$	$1,14 \pm 0,13^{\ast}$
Coloração com Azul de Alcian	$3,87 \pm 0,19^a$	$1,92 \pm 0,18$	$1,75 \pm 0,15$
Coloração com Tricrômio de Massom	$1,21 \pm 0,40^a$	$2,1 \pm 0,17^{\ast}$	$0,88 \pm 0,15^{\#}$
Coloração com picro-Sirius	$5,5 \pm 2,04^a$	$11,78 \pm 2,87$	$26,24 \pm 4,48^{\#\ast}$

Graduação de Mankin em cartilagens de coelhos com OA. Contagem de células expressa como células/ μm^2 de área de tecido. Coloração com picro-Sirius expressa como % de área. Resultados expressos como média \pm e.p.m. $\ast p < 0,05$ vs animais não tratados; $\# p < 0,05$ vs. animais tratados com água; a= controle (n=2); b= controle (n=4).

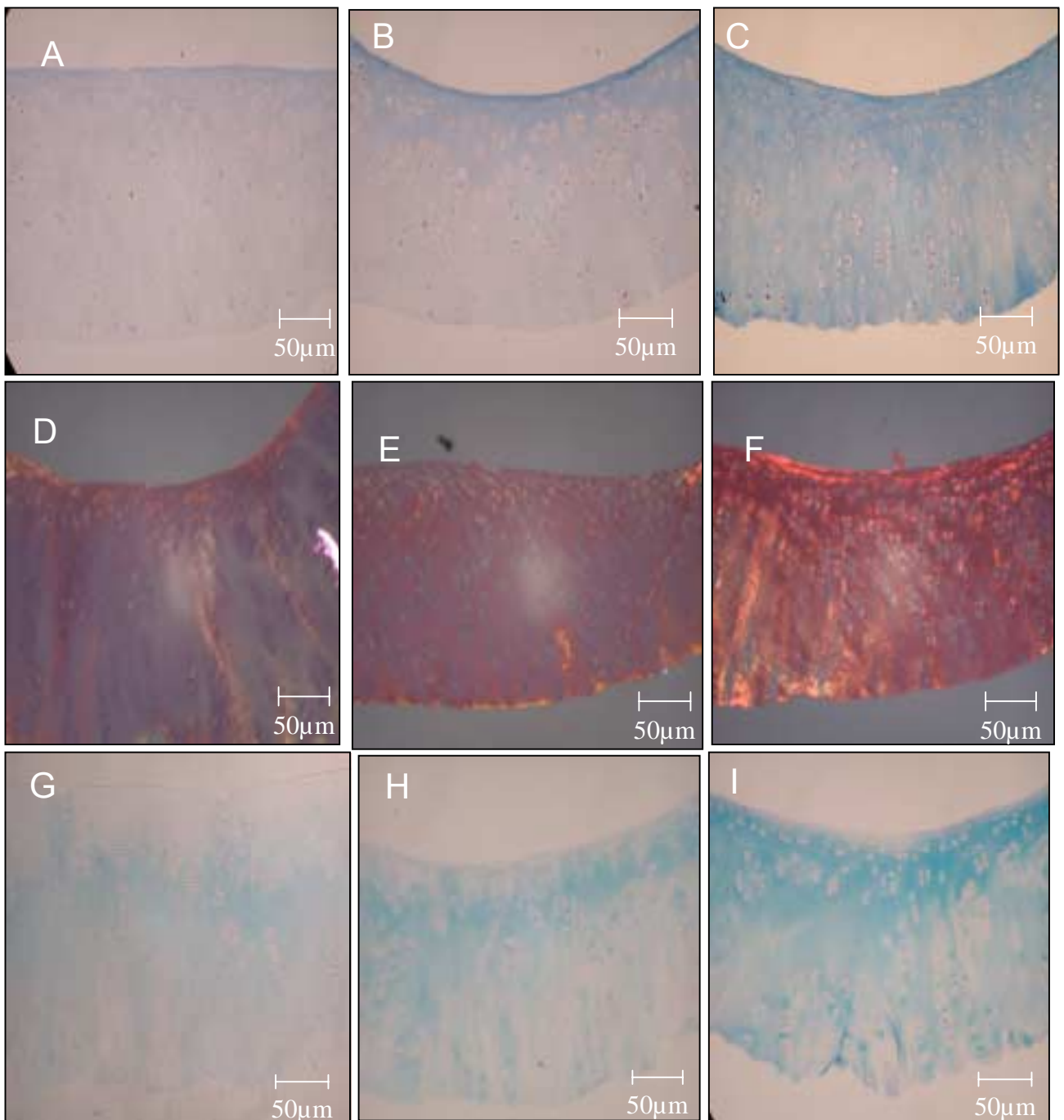


Fig 5. Cartilagem articular de coelhos com osteoartrose. Coloração com Tricrômio de Massom indica alterações da rede colagenosa em lâmina obtida de animais não tratados (A) e tratados com água quente (B), comparando com o grupo tratado com lama aquecida (C). (D-F) mostra coloração com picro-Sirius, indicando alterações em amostra de cartilagem controle (D) e tratada com água (E) e comparada com amostra tratada com lama (F). Cartilagem de animal controle (G), de grupo tratado com água (H) e de grupo tratado com lama (I) corada com azul de Alcian. Aumento original de 400X.

DISCUSSÃO

Patologias crônicas como a AR ou a OA estão associadas à diminuição da qualidade de vida. Nestes casos não existe uma estratégia terapêutica que seja eficiente com todos os pacientes e de forma permanente, o que pode levar estes pacientes a procurar terapias não convencionais, por exemplo, a fango ou peloterapia.

Uma das hipóteses levantadas sobre o mecanismo de ação dessa modalidade terapêutica sobre a remissão da dor e na melhora da atividade física que pacientes de processos reumáticos apresentam é de que o calor transferido ao corpo possa modular a resposta inflamatória, uma vez que a lama só exerce efeitos antiinflamatórios e analgésicos sobre as artrites quando aplicada a uma temperatura superior a 40°C.

Ao se realizar os protocolos de aplicação local da lama negra de Peruíbe nos joelhos de coelhos pôde-se verificar que decorridos os 30 minutos de tratamento, a lama ficou seca, indicando uma absorção do líquido, mas que retinha parte do calor.

Entretanto, os resultados obtidos no protocolo experimental de AIA do presente estudo sugerem que o tratamento com lama quente não apresenta uma dependência da temperatura aplicada. A aplicação tópica de lama e água quente durante 7 dias consecutivos foi ineficaz em promover a inibição ou a redução do influxo celular para a cavidade das articulações de coelhos submetidos a esse modelo experimental de artrite. O tempo de aplicação poderia ser responsável por esse resultado, uma vez que nos spas este

tempo é de no mínimo de 12 dias. Outra possibilidade seria a de que a terapia não agisse benéficamente em uma resposta inflamatória aguda ou subcrônica. Assim, realizamos o estudo em um outro modelo experimental que permitisse um tempo maior de aplicação da lama, sem que houvesse um risco de perda de animais por ação anestésica. O modelo de artrite crônica escolhido foi o de artrite induzida por zymosan por apresentar infiltrado sinovial de leucócitos predominantemente mononucleares e uma progressiva sinovite com deformidade articular após 21 dias de desafio intra-articular. Nesse modelo foi possível verificar que ao final de 15 dias de tratamento (correspondendo aos 21 dias de evolução da doença) o tratamento com a lama, mas não o tratamento com a água quente, reduziu significativamente o influxo tanto de células poli quanto mononucleares, demonstrando que a lama negra de Peruíbe reduziu a resposta inflamatória, e que, provavelmente, esta ação é dependente do tempo de aplicação e não da temperatura.

A evidência experimental, aqui apresentada, de que o calor não interfere com os efeitos benéficos da aplicação da lama quente se contrapõe às argumentações de Giusti et al. (1990), Cozzi et al. (1995) e Bellometti e Galzigna (1999) de que o calor aplicado promoveria analgesia através de uma ativação neuroendócrina, causando um aumento das concentrações séricas de peptídeos opióides, tais como endorfinas e encefalinas.

Independentemente do mecanismo de ação que a fangoterapia possa exercer, seus efeitos têm sido relacionados a uma modulação de mediadores químicos inflamatórios. Recentemente, Cozzi et al. (2004)

estudaram os efeitos da lama das termas de Montegrotto em modelo experimental de artrite induzida por adjuvante em ratos, durante a fase crônica da inflamação, comparando-os a ação da indometacina. Os autores descrevem que a aplicação de lama quente, durante 12 dias, reduziu significativamente o volume das patas e as concentrações séricas de TNF- α e IL-1 β . Similar redução de TNF- α (Bellometti et al., 1997b) e de IL-1 β . (Chechectin et al., 1995) foi observada em pacientes artríticos submetidos a imersão do corpo em lama das termas de Abano-Montegrotto a 42°C/20 minutos seguida por banho a 38°C/20 minutos, durante 12 dias. Basili et al. (2001) especularam que a fangoterapia poderia impedir os efeitos relacionados ao estresse térmico na função endotelial e plaquetária: amostras de plasma obtidas de voluntários saudáveis submetidos ao mesmo protocolo citado acima apresentaram uma redução de IL-6, que foi correlacionada com a diminuição do infiltrado neutrofílico. Juntos estes estudos sugerem que a produção de TNF- α possa ser modulada pela fangoterapia.

Evidências de que o TNF- α é uma citocina produzida precocemente na resposta inflamatória e que, juntamente com IL-1, seja responsável pelo início e manutenção desta resposta foram obtidas em modelos com bloqueio de sua ação em artrite induzida por colágeno (Wooley et al., 1993; Williams et al., 1992). Sua liberação induz diversos eventos: produção de IL-8 que recruta os neutrófilos para o local e promove a liberação de noradrenalina por terminações nervosas simpáticas da região lesada; síntese de IL-1 e IL-6 por células residentes que induzem a atividade da enzima COX-2,

umentando a síntese de prostaglandinas e estimulam os linfócitos a produzir ITF- γ , IL-2 e IL-4, com conseqüente proliferação dessas células e aumento de produção de anticorpos; síntese de metaloproteinases destruidoras da matriz extracelular (MMP-1, colagenase e MMP-3, estromelisina), em ação conjunta com IL-1; reabsorção óssea e produção de GM-CSF; angiogênese (Rang et al., 1991; Pereira, 2004). Assim, a redução deste mediador inflamatório pode estar associada com a redução sérica de LTB₄ e PGE₂, que ocorre simultaneamente com o alívio da dor em pacientes submetidos ao tratamento com lama. IL-1, IL-8 e LTB₄ são potentes quimioatraentes para leucócitos, conseqüentemente, a redução de suas concentrações no sítio inflamatório pode ser responsável pela diminuição do influxo celular detectado neste estudo.

A redução de TNF- α , IL-1 e IL-6 pode também estar relacionada à diminuição das concentrações séricas de PGE₂ verificada em pacientes com OA (Bellometti e Galzigna, 1999) e, por conseqüência, à diminuição da dor e ardor manifestados pelos mesmos, após a aplicação de lama terapêutica. A PGE₂ é um composto altamente ativo derivado do metabolismo do ácido araquidônico, via enzima ciclooxigenase (COX), com ação sobre a musculatura lisa, nos sistemas vascular, gástrico e reprodutivo. Este mediador químico relaciona-se com a dor por sensibilizar fibras nociceptoras que liberam a substância P (Rang et al., 1991).

Outra atividade da PGE₂ é alterar a função dos condrócitos e a integridade da matriz extracelular, resultantes da diminuição da síntese de

proteoglicanos e aumento de metaloproteinases (Brum Fernandes et al., 1996).

Alterações destrutivas presentes nas cartilagens e sinóvias foram observadas em ratos com AIZ. As membranas sinoviais dos animais não tratados e tratados com água mostraram evidente hiperplasia dos sinoviócitos, infiltração celular na sub-íntima com predominância de monócitos e intensa neovascularização. A superfície das sinóvias obtidas das articulações tratadas com lama apresentaram uma única camada de células, apesar de moderada proliferação vascular e infiltração subsinovial evidenciadas pela graduação de Mankin. Uma persistente sinovite pode refletir na degradação da cartilagem articular, pela inibição de síntese de proteoglicanos e colágeno, principalmente durante a fase aguda da artrite (Vassalli et al., 1992). Neste estágio, verifica-se que os neutrófilos infiltrantes na cavidade articular liberam enzimas líticas e óxido nítrico, ambos com potente ação na cartilagem (Rocha et al., 2003, Bezerra et al., 2004); também os sinoviócitos ativados secretam TNF- α , IL-1 e PGE₂. (Nagase, 1997, Benito et al., 2005). Nos ratos não tratados e tratados com água o dano cartilaginoso foi caracterizado por fendas na matriz, perda de condrócitos, colágeno e proteoglicanos. Com exceção do conteúdo deste último, a aplicação de lama estimulou a hipercelularidade e a síntese de colágeno. Estes resultados somados aos do influxo celular podem estar de acordo com os recentes estudos de Bellometti et al. (2000) que relataram que as concentrações séricas de óxido nítrico e da enzima mieloperoxidase, ambos liberados por neutrófilos, diminuíram significativamente após o

tratamento de pacientes com a lama italiana, enquanto que a concentração da enzima glutationa-peroxidase aumentou. A não correlação entre esta enzima e NO e mieloperoxidase, levou os autores a especularem que o tratamento com lama age por mecanismos diferentes. Tal sugestão pode ser corroborada pela hipótese de que a aplicação de lama terapêutica possa exercer um efeito inibidor em diferentes metaloproteinases, como apontam as evidências do presente estudo.

Vários estudos têm demonstrado que as metaloproteinases estão implicadas na destruição da cartilagem articular nos processos artríticos, bem como o controle de sua atividade é dependente do balanço da concentração local de seus inibidores (Klimiuk et al., 2002). Sabe-se também, que os proteoglicanos são alvos das gelatinases secretadas por sinoviócitos e condrócitos em resposta a IL-1, TNF- α (Nagase, 1997) e PGE₂ (Brum Fernandes et al., 1996). Portanto, o fato da aplicação da lama negra de Peruíbe não melhorar o conteúdo deste componente da matriz cartilaginosa, mas sim de colágeno (como verificado pela graduação de Mankin em cortes corados com azul de Alcian e picro-Sirius ou Tricrômio de Massom, respectivamente) sustenta essa afirmação.

Resultados histológicos similares foram observados nas cartilagens de coelhos com OA. Após 14 semanas da menistectomia, as cartilagens de coelhos não tratados e tratados com compressas de água apresentaram completa desorganização celular, significativa perda de condrócitos e de coloração para componentes da matriz. Nas cartilagens das articulações

tratadas com a lama negra de Peruíbe pôde-se observar uma preservação do número de células, da organização estrutural e da rede colagenosa.

O aumento da coloração de colágeno observada em ambas cartilagens, AR e OA, de animais tratados com a lama brasileira pode possivelmente representar uma tentativa de reparo tecidual. Essas observações histológicas estão de acordo com os relatos de Bellometti et al (1997a) que descreveram um aumento de IGF-1 (fator de crescimento tipo insulina) concomitante ao decréscimo de TNF- α . Esse age como um inibidor extracelular de metaloproteinases e estimulador da síntese de proteoglicanos. Além disso, Bellometti et al. (2002) têm demonstrado que a fangoterapia combinada com exercícios físicos adequados aumenta os parâmetros de metabolismo anabólico do osso e decresce a reabsorção óssea e a dor por meio da regulação das principais citocinas pró-inflamatórias. Recentemente o mesmo grupo de pesquisadores (Bellometti et al., 2005) investigou a eficácia da fangoterapia na redução da degradação da cartilagem articular por influência nas concentrações séricas de MMP e TIMP. Um resultado interessante deste estudo foi que a concentração de MMP-3 (enzima de importante papel na degradação da cartilagem) diminuiu significativamente no soro de pacientes com OA submetidos ao tratamento, em comparação ao grupo controle. Em contraste, as MM-8 e MMP-9 apresentaram concentrações maiores e nenhuma correlação com TIMP foi evidenciada. Os autores discutiram a possível explicação de que estas proteínas são necessárias para a degradação e remoção da rede colagenosa já comprometida, atuando como mecanismo de reparo tecidual e

que essa modalidade terapêutica contribui para a integridade da matriz cartilaginosa.

Embora não seja o foco do atual estudo, não se pode deixar de comentar que outra hipótese de ação da fangoterapia tem sido levantada: de que haja absorção de elementos traços através da pele durante a aplicação da lama ou a imersão do corpo todo. Sukenik et al. (1992) verificaram que as concentrações de elementos traços, tais como boro, bário, ferro, zinco e estrôncio são absorvidos, uma vez que suas concentrações aumentaram de forma significativa, no soro de pacientes com artrite após a aplicação da lama do Mar Morto, enquanto que as concentrações de cálcio, cobre, alumínio e níquel não. Com base nestes dados, os autores discutem em seu artigo a possível relação que existe entre a diminuição de Zn com o tempo de duração da AR e a absorção deste mineral como responsável pela melhoras clínicas relatadas. A aplicação da lama terapêutica em temperatura elevada pode facilitar a absorção de elementos traços, uma vez o calor superficial causa alterações circulatórias cutâneas, aumentando a permeabilidade capilar e abertura de poros cutâneos.

Retomando-se a consideração de que na resposta inflamatória, tanto o endotélio como os neutrófilos liberam grandes quantidades de radicais livres e que estes podem danificar várias moléculas do organismo e que para minimizar estes danos é necessário um bom funcionamento dos sistemas de defesa antioxidativos, deve-se citar que Bellometti et al. (1996) relataram um aumento das defesas antioxidantes do soro (transferrina e ceruloplasmina), com conseqüente diminuição de peroxidação mediada por radicais livres. A

ceruloplasmina é considerada uma molécula seqüestradora de radicais livres (Gutteridge, 1986), enquanto a concentração de transferrina é regulada pelo ferro (Dessler et al., 2005). Um outro fator potencialmente antioxidativo é o enxofre. Banhos sulfurosos são reconhecidos como método balneoterapêutico primário para desordens musculares e esqueléticas (Sukenic et al., 1990). Karagülle et al. (1996) demonstraram que banhos sulfurosos têm efeito antiinflamatório em artrite experimental em ratos. Ekmekcioglu et al. (2002) têm relatado que tais banhos podem reduzir o sistema de defesa antioxidativo glutaciona-peroxidase e superóxido dismutase no sangue e melhorar moderadamente o estatus lipídico de pacientes com OA e que o declínio dessas atividades enzimáticas pode ser causado por duas razões: como consequência do reduzido estresse oxidativo durante o banho levando à menor expressão das enzimas ou de um aumento da produção de radicais superóxido, esgotando a enzima seqüestradora. Carretero (2002) propõe que as propriedades curativas dos sedimentos argilosos da lama do Mar Morto são decorrentes de seu conteúdo de espécies sulfurosas e sua coloração escura ao sulfitos de ferro concentrados na argila, propriedades semelhantes à da lama negra de Peruíbe. Leibetseder et al. (2004) cita estudo que descreve relevante penetração de sulfito pela pele após banhos sulfurosos, embora não esclareça qual o mecanismo de ação deste após a penetração.

Embora, o presente estudo não elucide qual(is) o(s) mecanismo(s) de ação da fangoterapia, os resultados demonstram que a lama negra de Peruíbe possui um efeito benéfico sobre as artrites, diminuindo a resposta

inflamatória e, possivelmente, induzindo o reparo tecidual da cartilagem e influenciando o metabolismo dos condrócitos nas fases avançadas das artrites. Sua utilização pode constituir uma alternativa útil para o tratamento da dor e da inflamação como coadjuvante sinérgico ou seqüencial de terapias tradicionais, principalmente para pacientes que compreendem o grupo de risco às reações e interações que as drogas apresentam.

CONCLUSÕES

A lama negra de Peruíbe:

- ✓ Apresentou efeito antiinflamatório reduzindo o influxo de leucócitos para a cavidade articular e sinovite em modelo de artrite crônica em ratos.
- ✓ A terapia com lama reduziu a degeneração da cartilagem articular em modelo de AR em ratos e de OA em coelhos, provavelmente influenciando os condrócitos e seu metabolismo.
- ✓ Seus efeitos parecem ser dependentes do tempo de aplicação e não da temperatura que é aplicada.
- ✓ Pode ser utilizada como terapia complementar às terapias convencionais.

ANEXO I**COMPOSIÇÃO BÁSICA DA LAMA NEGRA DE PERUÍBE**
(Quitete, 2005)

Composição geológica	Composição Química	Bacteriologia
Argila-síltica, quartzo, halita, filossilicáticos (minerais com estrutura em folhas: feldspato e mica) e argilominerais (esmectita, caulinita, illita)	Silício, Sulfato, Zinco, Chumbo, Cromo, Níquel, Alumínio	Bactérias reductoras de sulfato

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altman RD, Dean DD. Introduction and overview. Pain in osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 1989;(2suppl)18:4-9.

Basili S, Martini F, Ferroni P, Grassi M, Scavalli AS, Strega P, Cusumano G, Musca A, Ritti GB. Effects of mud-pack treatment on plasma cytokine and soluble adhesion molecules levels in healthy volunteers. *Clin Chim Acta,* 2001;314:209-14.

Bellamy N, Bradley LA. Workshop on pain control, and patient outcomes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*1996;39(3):357-62.

Bellometti S, Cecchettin M, Galzigna L. Mud pack therapy in osteoarthrosis. Changes in serum levels of chondrocyte markers. *Clin. Chim. Acta.* 1997a;268:101-6.

Bellometti S, Cecchettin M, Lalli A, Galzigna L. Mud pack treatment increases serum antioxidant defenses in osteoarthrosic patients. *Biomed Pharmacother.* 1996;50(1):37.

Bellometti S, Galzigna L. Function of the hypothalamic adrenal axis in patients with fibromyalgia syndrome undergoing mud-pack treatment. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.,* 1999;19(1):27-33.

Bellometti S, Galzigna L. Serum levels of a prostaglandin and a leukotriene after thermal mud pack therapy. *J Investig Med.* 1998;46(4):140-5.

Bellometti S, Giannini S, Sartori L, Crepaldi G. Cytokine levels in osteoarthrosis patients undergoing mud bath therapy. *Int J Clin Pharmacol Res.* 1997b;17(4):149-53.

Bellometti S, Poletto M, Gregotti C, Richelmi P, Berte F. Mud bath therapy influences nitric oxide, myeloperoxidase and glutathione peroxidase serum levels in arthritic patients. *Int J Clin Pharmacol Res* 2000;20(3-4):69-80.

Bellometti S, Berte F, Richelmi P, Tassoni T, Galzigna L. Bone remodelling in osteoarthrosic subjects undergoing a physical exercise program. *Clin Chim Acta*. 2002;325(1-2):97-104.

Bellometti S, Richelmi P, Tassoni T, Berte F. Production of matrix metalloproteinases and their inhibitors in osteoarthritic patients undergoing mud bath therapy. *Int J Clin Pharmacol Res* 2005;25:77-94.

Benito MJ, Veale DJ, Fitzgerald O, van der Berger WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(9):1263-7.

Bezerra MM, Brain SD, Greenacre S, Jeronimo SM, de Melo LB, Keeble J, da Rocha FA. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. *Br J Pharmacol*. 2004;141(1):172-82.

Brum Fernandes AJ, Morisset S, Bkaily G, Patry C. Characterization of the PGE₂ receptor subtype in bovine chondrocytes in culture. *Br J Pharmacol* 1996;118:1597-604.

Brum-Fernandes AJ, Rodrigues, CJ, Cossermelli W. Artrite induzida por antígeno em coelhos: padronização dos métodos de indução e avaliação do processo inflamatório articular. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo*. 1987;42:164-72.

Cara S, Carcangia G, Padalino G, Palomba M, Tamanini M. The bentonites in pelotherapy: chemical mineralogical and technological properties of materials from Sardinia deposits (Italy). *Appl. Clay.Sci.*, 2000;16:117-24.

Carabelli A, de Bernardi di Valserra G, de Bernardi di Valserra M, Tripodi E, Bellotti E, Pozzi R, Campiglia C, Arcangeli P.- Effetti dell'uso di fango termale su cute normale, secca e seborroica. *Clin. Ter* 1998;149:271-5.

Carretero, M.I Clay minerals and their beneficial effects upon human health. *Appl Clay Sci*,2002; 24:155-136.

Cecchettin M, Bellometti S, Lalli A, Galzigna L. Serum interleukin 1 changes in arthrosic patients after mud-pack treatment. *Phys Rheab Kur Med* 1995;5:92-3.

Cherkin D. Spa therapy: panacea or placebo? *Med Care* 1998;36(9):1303-5.

Codish S, Abu-Shakra M, Flusser D, Friger M, Sukenik S. Mud compress therapy for the hands of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 2005;25(1):49-54.

Constant F, Guillemin F, Collin JF, Boulangé M. Use of spa therapy to improve the quality of life of chronic low back pain patients. *Medical Care* 1998;36(9):1309-14.

Cooke D, Jasin H. The pathogenesis of chronic inflammation in experimental antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 1972;15(4):327-37.

Cozzi F, Carrara M, Sfriso P, Todesco S, Cima L. Anti-inflammatory effect of mud-bath applications on adjuvant arthritis in rats. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22:763-766.

Cozzi F, Lazzarim P, Todesco S, Cima L. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation in healthy subjects undergoing mud-bath applications. *Arthritis Rheum.* 1995;38:724-5.

Dessler K, Zydek M, Wandzik K, Kaup M, Fuchs H. Release of the soluble transferrin receptor is directly regulated by binding of its ligand ferritin. *J Biol Chem.* 2005; artigo in press, disponível online em dezembro de 2005 no <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>.

Dumonde DC, Glynn LE. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Brit J Exp Pathol.* 1961;43:373–382.

Ekmekcioglu C, Strauss-Blasche G, Holzer F, Marktl W. Effect of sulphur baths on antioxidative defense systems, peroxide concentrations and lipid levels in patients with degenerative osteoarthritis.. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd.* 2002 9(4):216-20.

Elkayam D, Wigler T, Tishler M, Rosemblum I, Caspi D, Segal R, Fishel B, Yaron M. Effect of spa therapy in Tiberias on patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 1991;18:1799-803.

Ferreira PEMS. Dor crônica: avaliação e tratamento psicológico. In: Andrade Filho ACC. Dor: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Roca, 2001, páginas: 43-52.

Flusser D, Abu-Shakra M., Friger M, Codish S, Sukenik S. Therapy with mud compress for knee osteoarthritis comparison of natural mud preparations with mineral-depleted mud. *J. Clin.Rheumatol.* 2002;8(4):197-203.

- Gabriel SE, Jaakkimainen L, Bombardier C. Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A meta-analysis. *Ann Intern Med.* 1991;115(10):787-96.
- Gall EP, Gall EA. Histopathogenesis of bovine serum albumin-induced arthritis in the rabbit. *J Rheumatol.* 1980;7:13-23.
- Galzigna L, Ceschi-Berrini C, Moschin E, Tolomio C. Thermal mud-pack as an anti-inflammatory treatment. *Biomed. Pharmacother.* 1998;52:408-9.
- Galzigna L, Moreto C, Lalli A. Physical and biochemical changes of thermal mud after maturation. *Biomed. Pharmacoter.*,1996;50:306-8.
- Gegout P, Gillet P, Terlain B, Netter P. Zymosan-induced arthritis in rats. II. Effects of anti-inflammatory drugs. *Life Sci.* 1995;56(20):389-94.
- Giusti P, Cima L, Tinello A, Cozzi F, Targa L, Lazzarin P, Todesco S. Stress hormones liberated by fangothrapy. ACTH and beta-endorphin levels under heat stress. *Fortschr Med.* 1990;108(32):601-3.
- Goldtust MB, Rich LC, Brown WR. Imme synovitis in rabbits. *Am J Pathol.*1978;91:329-44.
- Grossi F, Matroianni S, Conigliaro R, QuadraniV; Gatti R. – Effetti di trattamenti termali baleno-fangoterapici sulla patologia reumatica extra-articolare in rapporto ad attività sportiva. *Clin. Ter.* 1993;143:417-20.
- Gutteridge JM. Antioxidant properties of the proteins caeruloplasmin, albumin and transferrin. A study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochim Biophys Acta.* 1986;869(2):119-27.
- Halevy S, SukeniK S. Different modalities of spa therapy for skin diseaes at the Dead Sea area. *Arch. Dermatol.*, 1998;134:1416-20.

Howson P, Shepard , Mitchell, N. The antigen induced arthritis model: the relevance of the method of induction to its use as a model of human disease.

J Rheumatol. 1986;13:379-90.

Jezova D, Vigas M, Tatar P, Jucovicova J, Palat M. Rise in plasma beta-endorphin and ACTH in response to hyperthermia in sauna. *Horm Metab Res.* 1985;17(12):693-4.

Karagülle MZ, Tuttincii ZN, Aslan O, Basak E, Mutlu A Effects of thermal sulphur bath cure on adjuvant arthritic rats. *Phys Rheab Kur Med* 1996;6:53-

7.

Klimiuk PA, Sierakowski S, Latosiewicz R, Cywik B, Skowronski J, Chwiecko J. Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in different histological variants of rheumatoid synovitis.

Rheumatology 2002;41(1):78-87.

Kraan MC, de Koster BM, Elferink JG, Post WJ, Breedveld FC, Tak PP. Inhibition of neutrophil migration soon after initiation of treatment with leflunomide or methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: findings in a prospective, randomized, double-blind clinical trial in fifteen patients. *Arthritis Rheum.* 2000;43(7):1488-95.

Kukkonen-Harjula K, Kauppinen K. How the sauna affects the endocrine system. *Ann Clin Res.*1988;20:262-6.

Lavigne P, Benderdour M, Lajeunesse D, Reboul P, Shi Q, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Fernandes JC. Subchondral and trabecular bone metabolism regulation in canine experimental knee osteoarthritis.

Osteoarthritis Cartilage. 2005;13(4):310-7.

Leibetseder V, Straus-Blasche G, Holzer F, Marktl W, Ekmekcioglu C. Improving homocysteine levels through balneotherapy effects of sulphur baths. *Clin Chim Acta* 2004; 343:105-11.

Lohmander LS. What can we do about osteoarthritis? *Arthritis Res.*2000;2:95-100.

Lotito AP, Muscara MK, Kiss MH, Teixeira AS, Novaes GS, Laurindo IM, Silva CA, Mello, SBV. Nitric oxide-derived species in synovial fluid from patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol.* 2004;31(5):992-7.

Mankin HJ, Dorfman MD, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surgery* 1971;53:523-37.

Moskowitz R.W, Davis W, Sammarco J, Martins M, Backer J, Mayor M, Frankel V.H. Experimentally induce degenerative joint lesions following partial menisectomy in the rabbit. *Arthritis Rheum.* 1973;16(3):397-405.

Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997;378:151-60.

Novaes GS, Mello SBV, Laurindo IMM, Cossermelli W. Low-dose methotrexate decrease intraarticular prostaglandin and interleukin-1 levels in antigen-induced arthritis in rabbits. *J Rheumatol.*1996;23(12):2092-7.

Palácios FAZ, Novaes GS, Guzzo ML, Laurindo IMM, Mello SBV. Interrelationship of the kini system, nitric oxide and eicosanoids in the antigen-induced arthritis in rabbits. *Mediators Inflamm.* 1999;8(4-5):245-51.

Pereira FEL. Inflamações In: Brasileiro Filho G. Patologia Geral, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004 páginas: 131-72.

Pinto CA, Carvalho PE, Antonangelo L, Garippo A, Da Silva AG, Soares F, Younes R, Beyruti R, Takagaki K, Saldiva P, Vollmer RT, Capelozzi VL. Morphometric evaluation of tumor matrix metalloproteinase 9 predicts survival after surgical resection of adenocarcinoma of the lung. *Clin Cancer Res* 2003;9:3098-104.

Poensin D, Carpentier PH, Féchz O, Gasparini S. Effects of mud pack treatment on skin microcirculation. *Joint Bone Spine*, 2003;70:367-70.

Quitete R. Avaliação química, mineralógica e microbiológica da lama negra de Peruíbe, SP. Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Ramos AMO, Soares MLM, Rocha LRM, Jerônimo SMB, Rocha FAC, Patrício FRS. Artrite induzida por zymosan em ratos: estudo histopatológico, histoquímico e bioquímico dos glicoconjugados da cartilagem articular. *Rev Bras Reum.*2001;41(4):205-12.

Rang H., Bevan S, Dray A. Chemical activation of nociceptores peripheral neurons. *Brit.Med. Bull*, 1991;47:534-48.

Rocha FAC, Rocha JCS, Peixoto MEB, Jancar S, Cunha FQ, Ribeiro RA. Efeito de inibidores da sintase de óxido nítrico na dor inflamatória articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos. *Rev Bras Reum.*2003;43(4):206-17.

Sánchez-Pernaute O, López-Armada MJ, Calvo E, Diez-Ortego I, Largo R, Egido J, Herrero-Beaumont G. Fibrin generated in the synovial fluid activates intimal cells from their apical surface: a sequential morphological study in antigen-induced arthritis. *Rheumatology*. 2003;42(1):19-25.

Sánchez-Pernaute O, López-Armada MJ, Hernandez P, Palacios I, Navarro F, Martinez J, Egido J, Herrero-Beaumont G. Antifibroproliferative effect of tenidap in chronic antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 1997;40(12):2147-56.

Sharma L. Nonpharmacologic management of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2002;14(5):603-7.

Strauss-Blasche G, Ekmekcioglu C, Vacariu G, Melchart H, Fialka-Moser V, Marktl W. Contribution of individual spa therapies in the treatment of chronic pain. *Clin J Pain*. 2002;18(5):302-9.

Sukenik S, Buskila D, Neumann L, Kleiner-Baumgarten A, Zimlichman RS, Horowitz J. Sulphur bath and mud pack treatment for rheumatoid arthritis at the Dead Sea area. *Ann. Rheum. Dis*. 1990;49:99-102.

Sukenik S, Buskila D, Neumann L, Kleiner-Baumgarten A. Mud pack therapy in rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol*. 1992;11(2):243-7.

Surenik S, Flusser D, Codish S, Abu-Shakra M. Balneotherapy at the Dead Sea area for Knee osteoarthritis. *Isr. Med. Assoc. J*. 1999;1(2):83-5.

van Beusekom HJ, van de Putte LBA, van den Berg WB, van den Broek WJM. Antigen-induced arthritis: inflammation and antigen handling after two different doses of intra-articularly injected antigen. *Immunology*. 1982;45:193-98.

van de Loo FAJ, Joosten LAB, van Lent PLEM, Arntz OJ, van der Berg WB. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction: effect of in situ blocking in murine antigen and zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995;38(2):164-72.

Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunology* 1992;10:411-52.

Velosa APP, Teodoro WR, Witzel SS, Yoshinari NH. Quantificação do colágeno XI em cartilagem articular de coelhos com osteoartrose. *Rev. Bras. Reumatol.* 1999;39:137-142.

Velosa APP. Importância dos colágenos IX e XI na progressão da osteoartrose experimental em coelhos. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2001.

Veniale F, Barberis E, Carcangiu G, Morandi N, Setti M, Tamanini M, Tessie D. Formulation of muds for pelotherapy of maturation by different mineral waters. *Appl. Clay Sci*, 2004;25(3-4):135-48.

Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(20):9784-8.

Wooley PH, Whalen JD, Chapman DL, Berger AE, Richard KA, Aspar DG, Staite ND. The effect of an interleukin-1 receptor antagonist protein on type II collagen-induced arthritis and antigen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 1993 36(9):1305-14.