

**Simone Cristina Yamasaki**

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

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador:  
Prof. Dr. Paulo Flávio Silveira

**São Paulo  
2010**

## RESUMO

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

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

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

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

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ARTRITE REUMATOIDE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 1.2 ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO TIPO II (CIA)

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

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

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



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

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

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

### **1.3 TRATAMENTO CONVENCIONAL DA AR**

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **1.4 TERAPIA COM VENENO DE ABELHA (BV)**

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

O BV contém diversas substâncias como adolapina, peptídeo degranulador de mastócitos, melitina, apamina e fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (JANG et al., 2005; LEE et al., 2001; PARK et al., 2004; STUHLMEIER, 2007). A dor local e a inflamação causadas por picadas de abelhas têm sido atribuídas a melitina e a PLA<sub>2</sub>. Porém, segundo Saini, Peterson e Chopra (1997), nos casos em que a melitina do BV é descrita como inflamatória e nociceptiva, provavelmente há contaminação com a PLA<sub>2</sub>.

A PLA<sub>2</sub> é uma enzima superexpressa em diversas doenças inflamatórias e degrada fosfolípidios de membrana e libera ácido araquidônico (substrato essencial para a formação de eicosanoides pró-inflamatórios), podendo levar a perda tecidual e de integridade e função do órgão atingido (LEE et al., 2001).

A melitina é o principal componente do BV (50% do peso seco), sendo conhecida por inibir *in vitro* a atividade enzimática da PLA<sub>2</sub> do BV, bem como do líquido sinovial de pacientes com AR (SAINI; PETERSON; CHOPRA, 1997), porque forma o complexo melitina-PLA<sub>2</sub> (LEE et al., 2001). A inibição da PLA<sub>2</sub> por este peptídeo é o mecanismo correntemente proposto para explicar os efeitos do BV (JANG et al., 2005; LEE et al., 2001; SAINI; PETERSON; CHOPRA, 1997). Além de bloquear a liberação de ácido araquidônico pela PLA<sub>2</sub>, a melitina também bloqueia a produção de superóxido por neutrófilos e produz resistência à lise, mediada por complemento, em células leucêmicas humanas (LEE et al., 2001). A melitina induz apoptose de fibroblastos sinoviais por diminuir a expressão de BCL<sub>2</sub> (proteína antiapoptótica) e aumentar a expressão de BAX e CASP3 (proteínas pró-apoptóticas), diminuindo a proliferação de fibroblastos sinoviais em pacientes com AR (HONG et al., 2005). A atividade anti-inflamatória do BV e da melitina também vem sendo relacionada com a inibição de óxido nítrico (NO) e IL-6 (KWON et al., 2002).

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

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

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

### 1.5 ATIVIDADES PEPTIDÁSICAS

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

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

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

A APB (EC 3.4.11.6) é uma enzima citosólica. Sua atividade tem sido descrita em membrana celular de células T leucêmicas e normais. No entanto, não há descrição de domínios transmembrânicos na sua estrutura e uma hipótese é que interaja com um receptor de membrana (FOULON; CADEL; COHEN, 1999). A APB também exibe atividade de leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) hidrolase (EC 3.3.2.6), importante enzima da via do ácido araquidônico que hidrolisa o LTA<sub>4</sub>, transformando-o em leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>). Por isso, a APB é considerada como enzima bifuncional (FOULON; CADEL; COHEN, 1999; PENNING et al., 2002). O LTB<sub>4</sub> é um potente mediador pró-inflamatório sintetizado por células imunes, como eosinófilos, neutrófilos e macrófagos, o qual estimula a produção de várias citocinas (PENNING et al., 2002), age como um potente quimiotático para polimorfonucleares (HAEGGSTRÖM, 2000) e promove degranulação, aumento da liberação de enzimas lisossômicas e produção de superóxidos por neutrófilos (FORD-HUTCHINSON, 1990; SAMUELSSON et al., 1987). A atividade de APB foi detectada em fração solúvel de macrófagos, estando aumentada em macrófagos elicitados (OLIVO; TEIXEIRA; SILVEIRA, 2005). Assim como a APN, a atividade APB está presente no proteossoma, podendo estar relacionada com o processamento antigênico para apresentação de antígenos pelo MHC I (HATTORI e TSUJIMOTO, 2004) e é capaz de transformar a Ang III em Ang IV (RUIZ-ORTEGA; ESTEBAN; EGIDO, 2007).

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

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

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

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

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



## 6 CONCLUSÕES

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

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

## REFERÊNCIAS\*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

---

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PHAM, V. L. et al. Aminopeptidase B, a glucagon-processing enzyme: site directed mutagenesis of the Zn<sup>2+</sup>-binding motif and molecular modelling. **B. M. C. Biochem.**, v. 8, p. 21-41, 2007.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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