

**ELISÂNGELA BRESSAN**

**COMPARAÇÃO DO EFEITO DE FÁRMACOS ANTIARTRÍTICOS E ANTICORPOS  
ANTI-CITOCINAS NA ARTRITE REATIVA AO LPS EM RATOS**

**Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi**

**FLORIANÓPOLIS – SC**

**2005**



***“DEUS NOS PERMITE UM POUCO DE TREVAS PARA  
QUE DESCUBRAMOS A BELEZA DA LUZ”***

**Murilo Matos**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi, pelo incentivo, confiança, ensinamentos e pela inestimável amizade;

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, pelos ensinamentos;

Aos funcionários e amigos da Coordenadoria Especial de Farmacologia, em especial ao Pedro, pela paciência e dedicação;

Ao Prof. Dr. Fernando Queiróz Cunha, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo fornecimento de drogas;

À Profa. Dra. Maria Cláudia Santos Silva, pela atenção e pelos ensinamentos;

Aos colegas de laboratório, Lúcia, Maria, Sara, Daniel e Eduardo pela amizade e companheirismo;

À minha família, pelo incentivo, confiança e amor dedicados todos os dias de minha vida;

À minha irmã Rosangela, em especial, por compartilhar comigo cada dia desta caminhada;

Ao Antonio, pelo carinho e compreensão;

A todos os amigos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro;

À DEUS, por ter guiado meus passos ao longo desta caminhada.

## RESUMO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito de anticorpos anti-citocinas pró e antiinflamatórias na nocicepção e edema articulares e na migração de células para o fluido sinovial, no modelo de artrite induzida por LPS em ratos, e compará-las a alguns fármacos antiartríticos, potencialmente moduladores da atividade de citocinas. Ratos Wistar machos, pesando entre 250 e 300g, receberam LPS (0,03; 1,0 ou 30 ng; i.art.) 3 dias após uma sensibilização com carragenina (300 µg; i.art.). A incapacitação foi avaliada pelo tempo de elevação da pata (TEP; s) durante marcha de 1 min; o edema, pela variação do diâmetro articular (DA; cm) e, a migração celular, pela contagem total (CT; cel/mm<sup>3</sup>) e diferencial de leucócitos (mononucleares e polimorfonucleares, MON; PMN; cel/mm<sup>3</sup>) do fluido sinovial coletado 6 h após. A indometacina (0,5 ou 2,5 mg/kg) e o diclofenaco (0,5; 2,5 ou 5,0 mg/kg) inibiram significativamente a incapacitação e o edema articular tanto no pré quanto no pós-tratamento. O diclofenaco inibiu a migração de MON. Nenhuma das duas drogas inibiu a migração de PMN. A dexametasona (0,4 ou 4,0 mg/kg) inibiu a incapacitação, o edema articular e a migração de MON, mas não inibiu a migração de PMN. A sulfasalazina (30 ou 100 mg/kg) inibiu somente o edema articular sem alterar a incapacitação e a migração celular. O leflunomide (20, 40 ou 80 mg/kg) inibiu de maneira dose-dependente o edema articular, mas somente a maior dose inibiu a incapacitação articular. O leflunomide também inibiu a migração de MON. A diacereína (50 ou 200 mg/kg) inibiu significativamente apenas o edema articular. A pentoxifilina (20 ou 40 mg/kg) inibiu o edema e a migração de PMN, mas não alterou a incapacitação articular e a migração de MON. Anticorpos anti-TNF $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$  inibiram significativamente o edema articular e a migração de MON. Anticorpos anti-TNF $\alpha$  inibiram a incapacitação e a migração de PMN. Houve uma tendência de inibição da migração de PMN pelos anticorpos anti-IL-1 $\beta$ . Anticorpos anti-CINC-1 reduziram a incapacitação, o edema articular e a migração de MON e PMN. Anticorpos anti-IL-10, anti-IL-13 e anti-IL-4 aumentaram a incapacitação e o edema articular induzido por uma dose relativamente baixa de LPS (0,03 ng). No entanto, anticorpos anti-IL-10 e anti-IL-13 aumentaram a incapacitação mas reduziram o edema articular induzido por uma dose alta de LPS (1,0 ng). Além disso, a injeção intraarticular da citocina IL-13, antes do LPS (0,03 ng), inibiu a incapacitação, embora tenha aumentado o edema articular sem alterar a migração celular. Este estudo nos permite concluir que: (a) no modelo de artrite induzida pelo LPS, as

citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CINC-1 estão envolvidas no desenvolvimento da nocicepção, edema articular e migração celular; (b) IL-10, IL-13 e IL-4 também são produzidas localmente e apresentam efeito inibitório. Contudo, IL-10 e IL-13 também apresentam efeito pró-edematogênico neste modelo; (c) os resultados obtidos com antiinflamatórios não esteroidais e com dexametasona sugerem que o modelo de artrite induzida pelo LPS é confiável para avaliar a ação de outras drogas sobre a nocicepção, edema articular e migração celular; (d) as drogas modificadoras de doença (DMARDs), que podem modular a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , não apresentaram efeito tão potente quanto os respectivos anticorpos anti-citocinas sugerindo que, pelo menos neste modelo *in vivo*, esse mecanismo de ação pode não ser atingido. Leflunomide, foi o único DMARD testado que apresentou efetividade similar aos anticorpos anti-TNF $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$  em todos os parâmetros avaliados (nocicepção, edema articular e migração celular de MON).

Palavras-chave: Incapacitação articular. Artrite reativa. Citocinas.

## ABSTRACT

The aim of this study was to assess the effect of pro- and anti-inflammatory cytokines at nociception, articular edema and cell migration into synovial fluid, in a model of LPS-induced arthritis, and compare with anti-arthritic drugs that can modulate the synthesis and release of these cytokines. Male Wistar rats (250 – 300 g) received LPS (0.03, 1.0 or 30 ng; i.art.) into right knee-joint 3 days after a carrageenan (300 µg) sensitizing stimulus. Inflammatory-induced incapacitation was measured hourly by the paw elevation time (TEP; s) in 1-min period of observation, and edema was evaluated by the articular diameter increase (DA; cm) taken just after each incapacitation measurement. After the 6-h period of incapacitation and edema evaluation, the animals were euthanized and a synovial fluid lavage was collected from articular capsule for total and differential (mononuclear and polymorphonuclear cells; MON; PMN; cel/mm<sup>3</sup>) leukocyte count. Indomethacin (0.5 ou 2.5 mg/kg) and diclofenac (0.5, 2.5 ou 5.0 mg/kg) inhibited incapacitation and articular edema either in pre- or post-treatment protocols. Diclofenac inhibited MON migration, but neither inhibited PMN. Dexametasone (0.4 ou 4.0 mg/kg) inhibited incapacitation, articular edema and MON migration, but not PMN migration. Sulfasalazine (30 ou 100 mg/kg) inhibited only articular edema and did not modify incapacitation and cell migration. Leflunomide (20, 40 ou 80 mg/kg) dose-dependently inhibited articular edema, but only the higher dose inhibited incapacitation. Leflunomide also inhibited MON migration. Diacerein (50 ou 200 mg/kg) inhibited only articular edema. Pentoxifylline (20 ou 40 mg/kg) inhibited the articular edema and PMN migration, but not incapacitation. Antibodies anti-TNF $\alpha$  and anti-IL-1 $\beta$  inhibited edema and MON migration. Anti-TNF $\alpha$  also inhibited incapacitation and PMN migration. Anti-IL-1 $\beta$  tended to inhibit PMN migration. Antibodies anti-CINC-1 inhibited incapacitation, edema and MON and PMN migration. Antibodies anti-IL-10, anti-IL-13 and anti-IL-4 increased incapacitation and articular edema induced by a low dose of LPS (0.03 ng). However, anti-IL-10 and anti-IL-13 increased the incapacitation but decreased articular edema induced by a higher dose of LPS (1.0 ng). In addition, knee-joint injection of IL-13 before LPS (0.03 ng) inhibited incapacitation, although enhanced articular edema without it modifying cell migration. In conclusion, (a) in a model of LPS-induced arthritis, the pro-inflammatory cytokines TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CINC-1 seem to be locally involved in the development of nociception, articular edema and cell migration; (b) IL-10, IL-13 and

IL-4 are also locally produced, and had an inhibitory effect. However, IL-10 and IL-13 may also present a pro-edematogenic role in this model; (c) the results observed with nonsteroidal and glucocorticoid anti-inflammatory drugs suggest that LPS-induced arthritis model is reliable to assess the effect of others drugs on nociception, articular edema and cell migration; (d) disease-modifying drugs (DMARDs), which can modulate the synthesis and release of the pro-inflammatory cytokines TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , did not present an effect as potent as the respective anti-cytokines, suggesting that, at least in this *in vivo* model, this mechanism of action may not be achieved. Leflunomide, was the only DMARD tested that had similar effectiveness with anti-TNF $\alpha$  and anti-IL-1 $\beta$  in all parameters (nociception, articular edema and cell migration).

Key words: Articular incapacitation. Reactive arthritis. Cytokines.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Curva dose-resposta do LPS. Efeito da administração intraarticular de LPS na incapacitação e diâmetro articulares e na migração celular .....	25
<b>Figura 2</b> – Migração celular 3 dias após a sensibilização com carragenina .....	25
<b>Figura 3</b> - Efeito da administração de LPS em articulação naïve na incapacitação e diâmetro articulares e na migração celular .....	26
<b>Figura 4</b> - Efeito do pré-tratamento com indometacina na incapacitação e diâmetro articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	28
<b>Figura 5</b> - Efeito do pós-tratamento com indometacina na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	29
<b>Figura 6</b> - Efeito do pré-tratamento com diclofenaco de sódio na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	31
<b>Figura 7</b> - Efeito do pós-tratamento com diclofenaco de sódio na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	32
<b>Figura 8</b> - Efeito do pré-tratamento com dexametasona na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	34
<b>Figura 9</b> - Efeito do pré-tratamento com sulfasalazina na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	36
<b>Figura 10</b> - Efeito do pré-tratamento com leflunomide na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	38
<b>Figura 11</b> - Efeito do pré-tratamento com leflunomide na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	39
<b>Figura 12</b> - Efeito do pré-tratamento com diacereína na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	41
<b>Figura 13</b> - Efeito do pré-tratamento com pentoxifilina na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	43
<b>Figura 14</b> - Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-TNF $\alpha$ ou anti-IL-1 $\beta$ na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	45
<b>Figura 15</b> - Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-TNF $\alpha$ ou anti-IL-1 $\beta$ na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	46

<b>Figura 16</b> - Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-CINC-1 na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	48
<b>Figura 17</b> - Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-CINC-1 na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	49
<b>Figura 18</b> - Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-IL-10 e anti-IL-13 na incapacitação e edema articulares induzidos pelo LPS .....	51
<b>Figura 19</b> - Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-IL-10 e anti-IL-13 na incapacitação e edema articulares induzidos pelo LPS .....	52
<b>Figura 20</b> - Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-IL-4 na incapacitação e edema articulares induzidos pelo LPS .....	53
<b>Figura 21</b> - Efeito do pré-tratamento com IL-13 na incapacitação e edema articulares induzidos pelo LPS .....	55
<b>Figura 22</b> - Efeito do pré-tratamento com IL-13 na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	56

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> – Drogas utilizadas no presente estudo com as respectivas doses, tempo de tratamento, veículo, vias de administração e volume injetado .....	20
--	----

## LISTA DE ABREVIACÕES

AINE - Antiinflamatório não-esteroidal  
CINC-1 - Fator quimiotático de neutrófilos induzido por citocina  
cm - Centímetros  
DMARD - Droga modificadora de doença  
E.P.M. - Erro padrão da média  
g - Gramas  
i.art. - Intraarticular  
i.p. - Intraperitoneal  
IL-10 - Interleucina - 10  
IL-13 - Interleucina - 13  
IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 - beta  
IL-4 - Interleucina - 4  
INF - Interferon - gama  
LPS - Lipopolissacarídeo  
mg/kg - Miligramas por quilograma  
ml - Mililitros  
mm<sup>3</sup> - Milímetro cúbico  
MON - Mononucleares  
ng - Nanograma  
PMN - Polimorfonucleares  
ReA - Artrite Reativa  
s - Segundos  
SpA - Espondiloartropatias  
TNF $\alpha$  - Fator de necrose tumoral - alfa  
UI - Unidades internacionais  
v.o. - Via oral  
 $\mu$ g - Micrograma  
 $\mu$ l - Microlitro

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iii
<b>RESUMO</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....	xi
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 PATOLOGIAS ARTICULARES .....	01
1.2 PRINCIPAIS ARTROPATIAS .....	02
1.3 ARTRITE REATIVA .....	03
1.3.1 Características gerais da artrite reativa .....	03
1.3.2 Associação da artrite reativa com o HLA-B27 .....	04
1.3.3 Presença de componentes bacterianos na articulação de pacientes com artrite reativa .....	05
1.4 CITOCINAS NA ARTRITE .....	06
1.5 A DOR NA ARTRITE .....	09
1.6 TRATAMENTO DA ARTRITE .....	10
1.7 O MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR LPS .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	17
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	18
3.1 ANIMAIS .....	18
3.2 DROGAS .....	18
3.3 INJEÇÃO INTRAARTICULAR DE DROGAS .....	21

3.4	PROCOLOS EXPERIMENTAIS .....	21
3.4.1	INDUÇÃO DA ARTRITE REATIVA AO LPS .....	21
3.4.2	AVALIAÇÃO DA INCAPACITAÇÃO ARTICULAR .....	21
3.4.3	AVALIAÇÃO DO EDEMA ARTICULAR .....	22
3.4.4	LEUCOGRAMA DO FLUIDO SINOVIAL .....	22
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	23
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
4.1	Artrite reativa induzida de maneira dose-dependente pelo LPS .....	24
4.2	Avaliação da ação de fármacos antiinflamatórios na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	27
4.2.1	Efeito do pré e pós-tratamento com indometacina na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	27
4.2.2	Efeito do pré e pós-tratamento com diclofenaco na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	30
4.2.3	Efeito do pré-tratamento com dexametasona na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	33
4.2.4	Efeito do pré-tratamento com sulfasalazina na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	35
4.3	Avaliação da ação de fármacos modificadores de doença (DMARDs) na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	37
4.3.1	Efeito do pré-tratamento com leflunomide na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	37
4.3.2	Efeito do pré-tratamento com diacereína na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	40
4.3.3	Efeito do pré-tratamento com pentoxifilina na incapacitação e edema	

articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	42
4.4 Avaliação da participação das citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e CINC-1 na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	44
4.4.1 Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-TNF $\alpha$ ou anti-IL-1 $\beta$ na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	44
4.4.2 Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-CINC-1 na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	47
4.5 Avaliação da participação das citocinas antiinflamatórias IL-10, IL-13 e IL-4 na incapacitação e edema articulares induzidos pelo LPS .....	50
4.5.1 Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-IL-10 ou anti-IL-13 na incapacitação e edema articulares induzidos pelo LPS .....	50
4.5.2 Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-IL-4 na incapacitação e edema articulares induzidos pelo LPS .....	53
4.5.3 Efeito do pré-tratamento com IL-13 na incapacitação e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS .....	54
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>74</b>
<b>APÊNDICE I</b> – Artigos científicos publicados durante o mestrado .....	<b>95</b>
<b>APÊNDICE II</b> – Fotos das células presentes no fluido sinovial .....	<b>96</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PATOLOGIAS ARTICULARES

As patologias articulares englobam um grande número de doenças que têm em comum o comprometimento do sistema musculoesquelético, ou seja, ossos, cartilagem, estruturas peri-articulares (localizadas próximas às articulações, tendões, ligamentos e fâscias) e/ou de músculos. Destacam-se por serem altamente prevalentes, afetando 3 a 8 % da população mundial. Representam a terceira causa entre todas as consultas médicas, provocando maior incapacitação que as doenças cardíacas e o câncer. Pelo menos um quarto dos adultos sofrem de algum problema relacionado às estruturas musculoesqueléticas. Esta realidade provoca importante impacto médico, social e econômico, decorrente da significativa freqüência na população, do afastamento do trabalho e do gasto das entidades públicas e privadas (Sociedade Brasileira de Reumatologia, 2005).

Segundo relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), as condições reumáticas ou musculoesqueléticas compreendem mais de 150 doenças e síndromes que são freqüentemente progressivas e associadas com dor. Elas podem, de maneira geral, ser classificadas como doenças articulares ou artropatias, incapacidade física, desordens espinhais e condições resultantes de traumas. Condições musculoesqueléticas são as causas mais importantes da morbidade e incapacidade, ocasionando enormes gastos com a saúde e perda do trabalho. Dentre as condições com maior impacto na sociedade incluem-se a artrite reumatóide, as osteoartrites, as espondiloartropatias (espondilite anquilosante, artrite reativa, etc.), a osteoporose, as desordens espinhais e o trauma severo de membros (Relatório da OMS: O impacto das doenças musculoesqueléticas no início do novo milênio, 2003).

## 1.2 PRINCIPAIS ARTROPATIAS

Dentre as várias artropatias, a artrite reumatóide (*reumatoid arthritis, RA*) é a artrite inflamatória mais comum (prevalência mundial estimada em 0,8 %) (Braun e Sieper, 2002) e a maior causa de invalidez. Estudos paleontológicos mostram clara evidência da existência desta artrite já nas primeiras tribos nativas da América do



Norte, milhares de anos atrás. Atualmente, a prevalência da artrite reumatóide nestas mesmas regiões permanece extraordinariamente alta, com mais de 5 % dos indivíduos afetados em alguns grupos. Por outro lado, a artrite reumatóide parece não ter aparecido na Europa até o século XVII. As primeiras evidências da artrite reumatóide apareceram na arte Européia no início do século XVII. Sydenham publicou o primeiro relato de artrite reativa em 1676. Embora uma série de casos intermitentes fossem subseqüentemente descritos, a doença não foi completamente reconhecida até ela ser definida por Garrod, em 1859. Ele nomeou artrite 'reumatóide' para diferenciar de outras duas formas bem conhecidas de artrite na época, a febre reumática e a gota. Por volta do início do século XX, a artrite reumatóide foi conceituada separadamente das osteoartrites como 'artrite deformante'. Em 1957, Charles Short descreveu a artrite reumatóide, de maneira clara e definitiva, classificando-a como uma entidade clínica definida e distinta das espondiloartropatias soronegativas, da doença induzida por cristais, das osteoartrites, do lupus eritematoso sistêmico e de muitas outras condições (Firestein, 2003). Estudos em restos de esqueletos oriundos da antigüidade na Europa e norte da África também mostraram, nestes indivíduos, a existência de várias formas de artrite, incluindo as osteoartrites, a espondilite anquilosante (uma espondiloartropatia) e a gota (Rothschild et al., 1988).

Além da artrite reumatóide, outras artropatias, com características bem diferenciadas, também foram relatadas no fim do século XVII. Dentre elas, a artrite reativa (*reactive arthritis, ReA*), uma artropatia reativa, secundária a processos infecciosos bacterianos ou viróticos, que ocorriam freqüentemente no trato genitourinário, gastrointestinal ou faríngeo. Os primeiros relatos da associação de artrite com episódios de desinteria ou diarréias ocorreram por volta dos anos de 1600. Em 1818, Benjamin Brodie descreveu pela primeira vez a associação entre os sintomas de uretrite, artrite e conjuntivite, típicos de artrite reativa. No século XX, vários registros similares aos de Benjamin Brodie, foram publicados quase simultaneamente na Alemanha e França (Hill Gaston e Lillicrap, 2003; Colmegna et al., 2004). A clássica descrição da artrite reativa foi apresentada por Hans Reiter em 1916 e o termo doença de Reiter tem sido freqüentemente utilizado até hoje. Para acentuar o papel da reação imunológica na patogênese da artrite reativa, Ahvonen e colaboradores (1969) propuseram o termo artrite reativa, que é o mais utilizado atualmente.

## 1.3 ARTRITE REATIVA

### 1.3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ARTRITE REATIVA

A artrite reativa tem distribuição mundial e prevalência estimada de 30 a 40 casos em cada 100.000 adultos e, embora seja freqüentemente considerada benigna e auto-limitante, tem-se comprovado causar considerável morbidade e, às vezes, apresentar mau prognóstico (Appel et al., 2004; Toivanen e Toivanen, 2004). Atualmente, a artrite reativa está melhor caracterizada e é definida como um episódio artrítico tipicamente agudo, periférico, asséptico e que se desenvolve 1 a 4 semanas após uma infecção primária distante da articulação, localizada preferencialmente no trato gastrointestinal, por diferentes espécies de bactérias Gram negativas (*Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* ou *Campylobacter*) ou no trato genitourinário por *Chlamydia trachomatis* (Khan, 2002; Appel et al., 2004). O fato de a artrite reativa se desenvolver após a deflagração de enterites, por diversas enterobactérias, ou após uretrite, mostra que não existe uma especificidade óbvia para o fator desencadeador desta doença (Breban et al., 2000). Devido a algumas características como o acometimento assimétrico das articulações, a possibilidade de envolvimento da coluna vertebral e enteses e, a associação com o HLA-B27, a artrite reativa é classificada como uma *espondiloartropatia* (*spondyloarthropathies*, *SpA*) (Palazzi et al., 2002). Entre as espondiloartropatias, a artrite reativa representa uma condição rara que abrange aproximadamente 2 % do total destas doenças (Breban et al., 2004).

As espondiloartropatias constituem um grupo de doenças reumáticas crônicas caracterizadas por entesite estéril e oligoartrite nas extremidades baixas, principalmente no joelho e no tornozelo (Burgos-Vargas, 2002; Hill Gaston e Lillicrap, 2003), que acometem aproximadamente 0,3 % da população mundial (Breban et al., 2004). Além do envolvimento do esqueleto, manifestações extraarticulares são freqüentemente observadas e incluem inflamação ocular (conjuntivite, uveíte ou irite aguda), entesite, dactilite, lesões mucocutâneas, uretrite e, em raras ocasiões, cardite (Khan, 2002). Desta forma, as espondiloartropatias, em especial a artrite reativa, não estão limitadas apenas às articulações, mas afetam o indivíduo como um todo, causando várias lesões (Toivanen e Toivanen, 2004). Além disso, alguns estudos têm mostrado que as espondiloartropatias podem ser mais prevalentes do que tem-se estimado, tendo assim, um claro impacto sócio-econômico (Braun e

Sieper, 2002).

O curso clínico da artrite reativa caracteriza-se pela ocorrência de um ou dois episódios agudos da doença após a ocorrência da infecção bacteriana entérica ou uretral. Estas manifestações iniciais podem ser amenas ou moderadas e durarem de 4 a 5 meses sendo que, após este período, a artrite reativa ativa pode entrar em completa remissão. Porém, em dois terços dos pacientes que desenvolvem artrite reativa, ocorre a persistência dos sintomas musculoesqueléticos por mais de um ano. Frequentemente, ocorrem episódios recorrentes de entesite (inflamação das enteses) e artrite estendendo-se para a coluna vertebral e articulação sacroilíaca. Em outros casos, pode haver a persistência da inflamação, com severas conseqüências já no seu estágio inicial. Aproximadamente 15 a 30 % dos pacientes desenvolvem artrite crônica e recorrente que é caracterizada pelo aumento do número de enteses e articulações afetadas e pela presença de sinais e sintomas da inflamação (p. ex., dor e edema articular), o que leva à perda da função e moderadas a severas limitações para andar e levantar-se (Burgos-Vargas, 2002; Khan, 2002; Appel et al., 2004). Além da dor, outros fatores também alteram a vida dos indivíduos que desenvolvem este tipo de doença como o enrijecimento articular, a fadiga, os prejuízos no sono, a preocupação com a aparência, o medo do futuro e os efeitos colaterais dos medicamentos (Braun e Sieper, 2002).

### **1.3.2 ASSOCIAÇÃO DA ARTRITE REATIVA COM O HLA-B27**

A artrite reativa, assim como todas as espondiloartropatias não estão associadas com o fator reumatóide, mas mostram grande associação com um alelo do complexo de histocompatibilidade maior classe-I, o antígeno leucocitário humano (HLA)-B27, único fator genético predisponente formalmente identificado (Amor et al., 1974). Contudo, esta associação varia marcadamente entre as diferentes formas de espondiloartropatias e entre os grupos étnicos (Khan, 2002). Esquimós do Alaska e da Sibéria apresentam uma freqüência de HLA-B27 na população de 25 a 40 %, o que coincide com uma maior prevalência da doença (Boyer et al., 1999). Por outro lado, as espondiloartropatias são raras entre as pessoas japonesas cuja incidência de HLA-B27 é muito baixa (< 1 %) (Hukuda et al., 2001). Estudos epidemiológicos mostram que 50 a 80 % dos indivíduos que desenvolvem artrite reativa são HLA-B27 positivos. Porém, em outras espondiloartropatias como a espondilite anquilosante,

esta associação chega a 95 %. Indivíduos que desenvolvem artrite reativa e são HLA-B27 positivo apresentam sintomas articulares mais severos e prolongados (Ekman et al., 2000) indicando, deste modo, que o maior efeito do HLA-B27 pode ser o de aumentar o vigor da resposta inflamatória nociva que afeta principalmente as articulações e enteses (Breban et al., 2004). Ratos transgênicos para o HLA-B27 desenvolvem espontaneamente uma doença inflamatória multisistêmica que se assemelha com as espondiloartropatias humanas, é dependente da presença de uma flora bacteriana normal e é mediada por células do sistema imune. A presença de células apresentadoras de antígeno (APCs) e células T CD4<sup>+</sup>, ambas expressando altos níveis de HLA-B27, também parece ser um fator crítico para o desenvolvimento desta patologia. Estudos tem mostrado que esta doença pode resultar de uma falha de tolerância relacionada, em parte, ao alto nível de expressão do HLA-B27 em APCs e de uma resposta contra as bactérias do intestino (Breban et al., 2004). Além dos fatores genéticos, fatores relacionados ao ambiente, como classe social baixa e ausência de refrigerador nas residências, também parecem estar associados ao desenvolvimento das espondiloartropatias (Claudepierre et al., 1995).

### **1.3.3 PRESENÇA DE COMPONENTES BACTERIANOS NA ARTICULAÇÃO DE PACIENTES COM ARTRITE REATIVA**

Outro aspecto central da patogênese da artrite reativa é que, embora seja definida como uma inflamação articular estéril (Khan, 2002; Toivanen e Toivanen, 2004) ou não infecciosa por natureza (Breban et al., 2004), componentes bacterianos como antígenos (Keat et al., 1987; Granfors et al., 1989; Chen et al., 2003), DNA ou RNA e, até mesmo a própria bactéria não replicante (Hammer et al., 1990; Bas et al., 1995; Gérard et al., 1998), têm sido detectados nos tecidos articulares incluindo o fluido sinovial e células do sangue circulante de pacientes com artrite reativa, o que sugere que a persistência da bactéria pode estar promovendo uma resposta imune local na articulação afetada. O fato de um grande número de espécies diferentes de bactérias poderem induzir artrite, fornece evidências de que a antigenicidade, por si só, não determina a indução da artrite. É possível que a chegada de material antigênico na articulação, vivo ou morto, seja, então, o fator de maior relevância para o desenvolvimento de artrite reativa (Sieper et al., 2000;

Colmegna et al., 2004). Este material antigênico pode chegar aos linfonodos regionais ou ser transportado por macrófagos para dentro da articulação ou para outros sítios da inflamação onde a sua persistência estaria dirigindo uma resposta imune local que pode ser longa e duradoura (Khan, 2002; Colmegna et al., 2004).

O lipopolissacarídeo (LPS), um dos componentes de maior toxicidade presentes na parede da célula bacteriana, também tem sido detectado, através de análises sorológicas, em fagócitos mononucleares e polimorfonucleares infectados, bem como em células do fluido sinovial de articulações afetadas por artrite reativa (Granfors et al., 1989; Granfors et al., 1990). O LPS bacteriano pode estar desempenhando um papel importante na patogênese, bem como, nos episódios recorrentes da artrite reativa, dada a significativa patogenicidade que ele confere à bactéria e a sua modulação do sistema imune (ativação policlonal de células linfóides, ativação de macrófagos, mitogenicidade e adjuvanticidade). A administração de LPS intraarticular, em animais de laboratório, representa um poderoso estimulador de macrófagos, levando à síntese e à liberação de citocinas pró-inflamatórias (p. ex., TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) o que resulta em um processo artrítico agudo de duração relativamente curta (Stimpson et al., 1987). O LPS também estimula a liberação de IL-8 (citocina quimiotática) de condrócitos articulares o que poderia resultar em inflamação mediada por neutrófilos e destruição da cartilagem articular (Lotz et al., 1992). A forma homóloga da IL-8 em ratos, a CINC-1 tem sido estudada em modelos animais de artrite (Bombini et al., 2004).

Desta forma, estes achados de que a persistência de componentes bacterianos na articulação pode estar provocando uma resposta imune local na articulação afetada, tem provocado questionamentos acerca das falhas do sistema imunológico em eliminar os microorganismos e tem sugerido a participação das citocinas, mediadores inflamatórios cruciais para uma resposta imune efetiva, neste processo (Appel et al., 2004).

#### **1.4 CITOCINAS NA ARTRITE**

As citocinas têm atraído interesse particular por estarem envolvidas na regulação da resposta imune e inflamatória. A atividade de muitos destes mediadores reflete, de perto, o processo que está ocorrendo nas doenças inflamatórias crônicas (Feldmann et al., 2004). Embora, as células do sistema imune

sejam consideradas como sua fonte primária, diversas citocinas também podem ser produzidas por outros tipos celulares como fibroblastos, células endoteliais ou até células epiteliais. Assim, na sinóvia inflamada, monócitos bem como sinoviócitos tipo A (macrófagos) e tipo B (fibroblastos) tem sido apontados como produtores de grandes quantidades de citocinas, particularmente, as pró-inflamatórias (TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ). Ao contrário, o papel das células T (linfócitos T helper CD4<sup>+</sup>; Th0, Th1 e Th2) e suas citocinas na patofisiologia de diferentes artropatias, ainda não é bem claro (Steiner et al., 1999). Além disso, o padrão de secreção de citocinas pode ser distinto nas diferentes artropatias. Na sinóvia e fluido sinovial de pacientes com doenças de origem autoimune, como a artrite reumatóide, observa-se um padrão de citocinas, predominantemente Th1, com expressão de altos níveis de interferon-gama (INF- $\gamma$ ). Por outro lado, nas espondiloartropatias, como a artrite reativa, ocorre a expressão de citocinas, tanto Th1 (INF- $\gamma$ ) quanto Th2, com altos níveis de IL-4 (Steiner et al., 1999; Yin et al., 1999; Appel et al., 2004). Acredita-se que as citocinas Th1 estejam envolvidas com a eliminação das bactérias associadas à artrite reativa e como tem-se observado um predomínio de citocinas Th2, estas poderiam estar contribuindo para a persistência da bactéria, bem como, dos peptídeos bacterianos na articulação (Yin et al., 1997). Porém, é importante salientar que, embora o padrão de citocinas varie entre as diferentes artropatias, a terapia anti-citocina parece ter sucesso no controle dos sintomas na maioria destas doenças (van den Berg, 2000; Braun et al., 2002; Feldmann et al., 2004).

O TNF $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são consideradas as principais citocinas pró-inflamatórias presentes na inflamação articular crônica e, a detecção de altos níveis destes mediadores, geralmente está associado com sérios danos estruturais na cartilagem e no osso (van den Berg, 2000). As propriedades pró-inflamatórias e destrutivas do TNF $\alpha$  e da IL-1 $\beta$  foram primeiramente demonstrados em estudos *in vitro* e, o seu potencial artritogênico foi confirmado pela indução de artrite em roedores. Nestes casos, a artrite pode ser induzida pela injeção de citocinas recombinantes na articulação do joelho. TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  induzem uma sinovite transitórias com infiltração de leucócitos na sinóvia, predominantemente mononuclear para o TNF $\alpha$  e PMN para a IL-1 $\beta$  (Henderson e Pettipher, 1989; van de Loo e van den Berg, 1990). Esta observação foi confirmada pela ocorrência de artrite crônica e erosiva em ratos transgênicos que apresentam uma superexpressão de TNF $\alpha$  (Keffer et al., 1991). Curiosamente, a IL-1 $\beta$  é mais potente que o TNF $\alpha$  em induzir destruição da cartilagem, *in vivo* (Van de Loo e Van den Berg, 1990). O TNF $\alpha$  sozinho não é nem

artritogênico e nem destrutivo e parece exercer seu potencial artritogênico através da indução da IL-1 $\beta$  (van den Berg, 2000) evidenciando, assim, um possível sinergismo entre estas duas citocinas ou que a maior ou menor produção de IL-1 $\beta$  é precedida pela produção de TNF $\alpha$  (Henderson e Pettipher, 1989). Elevados níveis de TNF $\alpha$  têm sido encontrados na artrite reumatóide (Feldmann et al., 2004), espondilite anquilosante (Braun et al., 1995), artrite psoriática (Partsch et al., 1997) e artrite reativa (Butrimiene et al., 2004). Embora existam diferenças patogênicas entre a artrite reumatóide e as espondiloartropatias, o TNF $\alpha$  apresenta papel primordial em ambos os tipos de artrite inflamatória (Braun et al., 2002). Observações em modelos animais e em estudos clínicos têm contribuído de maneira significativa para a identificação do TNF $\alpha$  e da IL-1 $\beta$  como potenciais alvos terapêuticos (van den Berg, 2000).

Descoberta a mais de dez anos, a CINC (*cytokine-induced neutrophil chemottractant*) (Watanabe et al., 1989), uma citocina de rato homóloga à IL-8 humana, tem atraído interesse pelo seu envolvimento na migração celular, um evento crítico no desenvolvimento de processos inflamatórios. A CINC é expressa por células inflamatórias, como macrófagos, nos sítios de inflamação (Shibata, 2002) e tem mostrado importante papel no acúmulo de neutrófilos em lesões inflamatórias induzidas por LPS (Iida et al., 1992; Shibata et al., 1996; Takano e Nakagawa, 2001), carragenina (Nakagawa et al., 1992) e componentes bacterianos como a estreptolisina-O ativa de *Streptococcus pyogenes* (Mitsui et al., 2002), em ratos. A administração intradérmica de CINC induz rápido e transitório acúmulo de neutrófilos, sem migração de monócitos e linfócitos ou formação de edema, o que sugere que CINC seja um agente quimiotático específico de neutrófilos podendo ser diferenciado da IL-8, que é um agente quimiotático de linfócitos e neutrófilos (Watanabe et al., 1991; Shibata et al., 1995). Poucos estudos têm sido realizados para elucidar o papel da CINC nas artropatias. Existem relatos do aumento dos níveis de CINC na medula óssea de ratos durante o desenvolvimento de artrite por adjuvante. A supressão do aumento da expressão desta citocina acontece, em paralelo, com a redução do edema articular o que sugere que este evento pode ser mediado, pelo menos em parte, pela redução da expressão ou liberação de CINC (Tanahashi et al., 1998).

As citocinas reconhecidas como antiinflamatórias (p. ex., IL-10, IL-13 e IL-4) também merecem atenção quanto ao seu envolvimento na patogênese das doenças artríticas. A IL-13, uma citocina imunorregulatória secretada predominantemente por

células T helper 2 (Th2), está envolvida em diversos processos biológicos, incluindo a regulação da função de células B e monócitos (McKenzie et al., 1993), a modulação da resistência a nematóides gastrointestinais e a organismos intracelulares como a *Leishmania major*. No pulmão, a IL-13 é o mediador central da asma alérgica regulando a inflamação eosinofílica, a secreção de muco e a hiperresponsividade das vias aéreas (Wynn, 2003). IL-13 também tem sido encontrada no soro e no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide e artrite psoriática (Spadaro et al., 2002). Nestes casos, a IL-13 promove inibição da produção de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , pelas células mononucleares do fluido sinovial (Isomaki et al., 1996). Em modelos experimentais de artrite induzida por adjuvante, o aumento nos níveis de IL-13 melhora significativamente o curso da doença (Woods et al., 2002). Desta forma, esta citocina apresenta ações bem distintas nas diferentes patologias.

IL-10, IL-13 e IL-4 inibem ou reduzem a produção de vários mediadores pró-inflamatórios, incluindo TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e PGE<sub>2</sub>, pelo tecido sinovial (Woods et al., 2000; Morita et al., 2001) e por células mononucleares do fluido sinovial (Isomaki et al., 1996; Woods et al., 2000) de pacientes com artrite reumatóide, bem como, protegem estas células da apoptose (Relić et al., 2001). Também apresentam atividade analgésica em diferentes modelos experimentais (Vale et al., 2003). A eficácia da administração, *in vivo*, de IL-4 tem sido mostrada em modelos animais de artrite. O tratamento sustentado com IL-4 e/ou IL-10 suprime a fase crônica da artrite induzida por parede celular de *Streptococcus*, em ratos (Lubberts et al., 1998). Desta forma, estas citocinas, reconhecidas pelas suas propriedades antiinflamatórias, parecem apresentar potencial terapêutico no tratamento da artrite.

## 1.5 A DOR NA ARTRITE

A dor é um dos sintomas que mais comprometem a qualidade de vida de indivíduos que desenvolvem artrite. A quantificação da dor, na artrite, pode contribuir para elucidar os mecanismos desta patologia e avaliar os efeitos da medicação antiartrítica. Desta forma, uma variedade de métodos, que permitem explorar a dor artrítica, tem sido desenvolvidos empregando modelos animais (Min et al., 2001). Um exemplo, é o modelo de incapacitação articular, em ratos, desenvolvido por Tonussi e Ferreira (1992), em que a quantificação da dor artrítica é independente do



observador e sensível a todas as classes de analgésicos.

A dor na artrite é caracterizada por hiperalgesia e dor espontânea. A hiperalgesia ocorre quando a articulação está sendo submetida à execução de movimento ou quando é aplicada uma pressão suave na articulação. Este aumento da sensibilidade à dor, resulta de uma sensibilização do sistema nociceptivo, e está relacionada com a produção de mediadores inflamatórios como a bradicinina, as prostaglandinas, os neuropeptídeos e as citocinas, os quais ativam receptores nas fibras nervosas correspondentes. Além disso, a expressão de receptores, como os da bradicinina e das neurocininas, está aumentada. Durante a inflamação, também ocorre o desenvolvimento de hiperexcitabilidade dos neurônios da medula espinal que é produzida por vários sistemas transmissores/receptores que constituem e modulam a ativação sináptica dos neurônios (Schaible et al., 2002). Além da sensibilização que leva a hiperalgesia, uma produção elevada de bradicinina, também pode ocasionar dor espontânea na artrite (Tonussi e Ferreira, 1997).

## **1.6 TRATAMENTO DA ARTRITE**

Tradicionalmente, fármacos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) e as drogas anti-reumáticas modificadoras de doença (DMARDs), têm sido as opções terapêuticas mais utilizadas no tratamento das artropatias (Braun et al., 2002; Braun e Sieper, 2002; Anandarajah e Ritchlin, 2004). Os AINEs, a primeira linha de terapia utilizada para tratar processos artríticos, exercem seus efeitos antiinflamatórios e analgésicos, principalmente, via inibição da ciclooxigenase, porém, apresentam severos efeitos adversos que limitam o seu uso clínico a longo prazo. Além disso, estes fármacos não reduzem os danos articulares e não impedem a evolução natural da doença (Tamura et al., 2002), o que pode tornar o tratamento inviável.

A terapia com fármacos glicocorticóides também é utilizada para o tratamento de diferentes artropatias, principalmente quando ocorre pouca responsividade dos pacientes artríticos aos AINEs e quando não há um acometimento múltiplo das articulações (Palazzi et al., 2004). Injeções intraarticulares de dexametasona, por exemplo, promovem alívio dos principais sintomas da artrite reativa (Svenungsson, 1995; Barth e Segal, 1999), artrite reumatóide (Lashina et al., 2000) e osteoartrite (Stein et al., 1999), no entanto, a absorção sistêmica não permite o uso prolongado deste tipo de medicamento.

Os DMARDs são apontados como drogas modificadoras das alterações patobiológicas e patoanatômicas que ocorrem na cartilagem articular, principalmente pela inibição de metaloproteinases (Tamura et al., 2002). Além disso, muitos dos benefícios dos DMARDs estão associados, também, à inibição de citocinas pró-inflamatórias como o TNF $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ . Desta forma, estas drogas agem limitando os danos articulares, potencialmente irreversíveis, inibindo o curso natural da doença e reduzindo os principais sintomas inflamatórios articulares (Goldenberg, 1999). Alguns exemplos de DMARDs, utilizados para o tratamento da artrite, incluem a sulfasalazina, o metotrexato e o leflunomide.

A sulfasalazina, sintetizada em 1942 pelo Professor Nana Svartz (Box e Pullar, 1997) foi a primeira droga com comprovada eficácia para colite ulcerativa (Kang et al., 1999) e está entre os fármacos mais efetivos para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais e da artrite reumatóide. A sulfasalazina é uma combinação entre um antibiótico, a sulfapiridina, e um agente antiinflamatório, o ácido 5-aminosalicílico. Assim como os AINEs, também é um agente antiinflamatório e tem sido utilizada como segunda linha de tratamento da artrite reumatóide, freqüentemente combinada com o metotrexato, o DMARD mais prescrito para o tratamento deste tipo de patologia. A sulfasalazina exerce uma ampla variedade de atividades antibacterianas, antiinflamatórias e imunossupressivas afetando populações celulares alvo distintas como as células epiteliais, neutrófilos, linfócitos B e T, mastócitos, células NK (*natural killer*) e células endoteliais. Os efeitos imunossupressivos deste fármaco incluem a supressão da produção de citocinas, da quimiotaxia de células polimorfonucleares, da expressão de moléculas de adesão de leucócitos, da produção de anticorpos e do seqüestro de radicais livres (Kang et al., 1999; Haskó et al., 2001). A sulfasalazina também é um inibidor potente e específico da ativação do fator nuclear –  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Wahl et al., 1998), o qual está envolvido na ativação transcripcional de mediadores importantes na inflamação como o TNF $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ . Além disso, o TNF $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são indutores do NF- $\kappa$ B, formando, desta forma, um ciclo regulatório positivo que pode contribuir para a amplificação e manutenção do processo inflamatório envolvido em patologias como a artrite reumatóide e a artrite reativa (Jue et al., 1999).

O leflunomide, um DMARD recentemente adotado para tratamento de patologias artríticas, tem propriedades antiinflamatórias e que incluem a proteção da matriz de cartilagem dos efeitos degenerativos da IL-1 $\beta$  (Panico et al., 2003). O leflunomide é um derivado sintético do isoxasol e suas propriedades de droga

modificadora da doença foram demonstradas, pela primeira vez, nos anos de 1980, em modelos animais de artrite e doenças autoimunes. Somente em 1998, o leflunomide foi aprovado, nos Estados Unidos, para o tratamento da artrite reumatóide. O leflunomide é convertido, no organismo, em A771726, um metabólito ativo que é o responsável por sua atividade farmacológica (Goldenberg, 1999) e cuja meia vida é de aproximadamente 14 dias. O leflunomide é uma droga antireumática nova com propriedades particulares e apresenta efeitos colaterais mais amenos. O seu principal mecanismo de ação é a inibição da síntese 'de novo' do nucleotídeo pirimidina através do bloqueio reversível da enzima dihidroorotato dehidrogenase (DHODH), um passo limitante na síntese das pirimidinas e na progressão do ciclo celular em diferentes linhagens de células, principalmente nos linfócitos T ativados. Em altas doses, o A771726 também inibe enzimas tirosina quinases envolvidas na sinalização celular de linfócitos B e T, conferindo, assim propriedades imunorregulatórias ao leflunomide (Breedveld e Dayer, 2000). O leflunomide também apresenta propriedades antiinflamatórias que são atribuídas a sua possível habilidade de suprimir a expressão de moléculas pró-inflamatórias como o TNF $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , por monócitos/macrófagos do tecido sinovial de pacientes com artrite reumatóide, bem como a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1), da ciclooxigenase-2 (COX-2), da metaloproteinase-3 (MMP-3), do óxido nítrico (NO) e do fator nuclear -  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Cutolo et al., 2003; Elkayam et al., 2003). Embora o leflunomide iniba a expressão de substâncias relevantes na dor (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NO e COX-2) e tenha se mostrado eficaz em modelo animal de dor neuropática induzida por lesão medular (Winkelstein et al., 2001), não se cogita, com entusiasmo, o uso deste composto, exclusivamente, para o controle da dor devido aos seus efeitos imunomodulatórios. Porém, em patologias como a artrite reumatóide, o tratamento com leflunomide tem promovido, com sucesso, o alívio da dor (Watkins, 2003) que, associado aos seus efeitos imunomodulatórios, torna-se, neste caso, uma terapia atrativa e vantajosa.

A diacereína, uma droga pertencente à classe química das antraquinonas, tem sido utilizada, freqüentemente, para o tratamento de pacientes osteoartíticos promovendo significativa melhora dos sintomas clínicos (Nguyen et al., 1994; Felisaz et al., 1999; Tamura et al., 1999; Pelletier et al., 2000). Diferente dos antiinflamatórios não esteroidais comuns, a diacereína exerce suas ações através de mecanismos pouco entendidos, mas que provavelmente, não estão associados com a inibição da síntese de prostaglandinas (Pelletier et al., 1998). Em animais e

humanos, a diacereína é completamente metabolizada em reína, o seu metabólito ativo (Debord et al., 1994). A reína inibe a atividade da IL-1 $\beta$ , reduz a produção de colagenase na cartilagem articular, e inibe a produção de ânion superóxido, a quimiotaxia e a atividade fagocítica de neutrófilos; e a fagocitose e a migração de macrófagos (Curatolo e Bogduk, 2001). Sua efetividade é similar a dos AINEs, porém, o início da sua ação é mais lento (Curatolo e Bogduk, 2001). Estudos *in vitro* e em modelos animais sugerem que a diacereína pode ter um efeito modificador de doença. Isso é evidenciado, em parte, pelos seus efeitos inibitórios na expressão de enzimas degradadoras de cartilagem (metaloproteinases) e de citocinas como a IL-1 $\beta$  (Moore et al., 1998). Em alguns modelos animais, a diacereína apresenta efeitos anti-osteoartríticos e condroprotetores (Mazieres e Berda, 1993; Brandt et al., 1997; Hwa et al., 2001) e aumenta a síntese de hialorunato em células sinoviais (Schongen et al., 1988). A diacereína aumenta a expressão de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP-1) (Tamura et al., 2001) e de TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 em condrócitos articulares bovinos sugerindo que estes podem ser alguns dos mecanismos pelos quais esta droga afeta a síntese da matriz óssea articular (Felisaz et al., 1999).

Muitos pacientes submetidos ao tratamento com DMARDs, não apresentam uma resposta satisfatória ou esta declina com o tempo. Além disso, a ocorrência de efeitos colaterais importantes contribui para a ineficácia e abandono deste tipo de tratamento. A busca de um melhor entendimento da patofisiologia das artropatias permitiu o desenvolvimento de novas terapias, ditas biológicas, como os agentes anti-TNF $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$ , os quais exercem suas ações via neutralização da atividade das respectivas citocinas. Ao contrário dos DMARDs, estes agentes tem início de ação rápido, apresentam poucos efeitos colaterais e promovem uma pronunciada redução da atividade da doença (Costello e Halverson, 2003; Sharma et al., 2004).

Dentre os agentes que inibem, de maneira inespecífica a liberação de TNF $\alpha$ , existe a pentoxifilina, uma alquilxantina, que tem sido utilizada, por mais de vinte anos, no tratamento de doenças vasculares periféricas (Pollice et al., 2001), além de ser testada, juntamente com a talidomida, para o tratamento da artrite reumatóide (Huizinga et al., 1996). Suas propriedades estão relacionadas com a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, em especial, o TNF $\alpha$ , por fagócitos estimulados com uma variedade de produtos microbianos (p. ex., endotoxina) (Mandell, 1995).

Embora as drogas que apresentam atividade moduladora de citocinas

importantes na artrite e, que inibem a progressão da doença tenham ganho certa credibilidade no tratamento destas patologias, a presença de efeitos adversos ou até a ineficácia ou perda da sua atividade antiartrítica é uma realidade. Desta forma, novas terapias tem sido adotadas para o tratamento da artrite. Trata-se de fármacos que inibem de maneira direta e específica citocinas extremamente envolvidas no processo inflamatório artrítico. Estes fármacos são os bloqueadores do TNF $\alpha$  ou drogas anti-TNF $\alpha$  e os principais representantes são o etanercept (receptor solúvel para TNF $\alpha$ ) (Moreland et al., 1999), o infliximab (anticorpo anti-TNF $\alpha$ ) (Maini et al., 1999) e o adalimumab (Weinblatt et al., 2003) (anticorpos monoclonais dirigidos especificamente contra TNF $\alpha$ ). Estes compostos tem sido coletivamente designados “agentes biológicos” para o tratamento da artrite reumatóide. Além disso, também existem diferentes estratégias para reduzir a atividade da IL-1 $\beta$ : antagonista de receptor de IL-1 (anakinra), anticorpos monoclonais anti-IL-1 $\beta$  (IL-1 Trap), anticorpos contra o receptor tipo-1 da IL-1 entre outros. Uma desvantagem do tratamento anti-IL-1 $\beta$  é que a duração dos efeitos é muito curta necessitando administração diária enquanto a terapia de neutralização do TNF $\alpha$  pelo uso de anticorpos monoclonais ou receptores solúveis dura vários dias ou semanas (Dinarello, 2004).

A CINC-1, uma citocina tipicamente quimiotática de neutrófilos (Nakagawa et al., 1998), também tem sido cogitada como um bom alvo terapêutico. O estudo desta citocina tem permitido que se estabeleça um paralelo entre seus efeitos em animais e os efeitos da IL-8 em humanos.

As citocinas antiinflamatórias, IL-10, IL-13 e IL-4, também estão envolvidas na patofisiologia da artrite desempenhando funções importantes como a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e reduzindo, desta forma, a severidade da doença. Isso sugere um possível potencial terapêutico destas citocinas na artrite (Yin et al., 1997; Morita et al., 2001; Puliti et al., 2002).

## **1.7 O MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR LPS**

O modelo experimental de artrite induzida por LPS foi desenvolvido em nosso laboratório e tem sido uma ferramenta útil para avaliar, em paralelo, a nocicepção e o edema articular, em ratos. Este modelo é composto por um teste algosimétrico, o teste de incapacitação articular (Tonussi e Ferreira, 1992) e pela medida do diâmetro da articulação tibio-femural do rato.

A incapacitação articular induzida por LPS é um método sensível aos fármacos analgésicos e antiinflamatórios clássicos, e tem permitido detectar a importância de outros fármacos e mediadores inflamatórios envolvidos neste processo (De-Melo et al., 1998 (a); De-Melo et al., 1998 (b); Bressan et al., 2003; Motta et al., 2003). A medida do diâmetro articular, realizada imediatamente após o teste de incapacitação articular, é uma ferramenta útil para quantificar o edema inflamatório articular, bem como a ação antiinflamatória de diversas drogas (Bressan et al., 2003). Desta forma, o presente modelo tem permitido a análise, em paralelo, da nocicepção e do edema articular, o que normalmente não é feito em outros estudos. Este modelo é importante para avaliar o efeito de drogas que acredita-se que tenham efeito antiinflamatório por afetar o edema mas podem não afetar, em paralelo, a nocicepção.

O lipopolissacarídeo (LPS), também conhecido como endotoxina, é um dos principais constituintes da membrana celular da maioria das bactérias Gram negativas e tem sido utilizado, ao longo dos anos, em diferentes modelos experimentais, entre outras funções, como um agente indutor de dor, febre e sepse. Os estudos realizados com o objetivo de elucidar os mecanismos patofisiológicos da artrite reativa, tem demonstrado, cada vez mais, a associação desta patologia com enterites causadas por bactérias Gram negativas e com a presença de elementos destas bactérias, como o LPS, nas articulações dos indivíduos acometidos (Granfors et al., 1989; Granfors et al., 1990). Estudos em nosso laboratório têm mostrado que quantidades relativamente pequenas de LPS são capazes de induzir um processo artrítico com dor, exsudação e migração de células. Desta forma, a escolha do LPS, no presente estudo, foi realizada inferindo a real importância que este agente pode ter na patofisiologia da artrite reativa. Além disso, existem relatos de que trauma (físico ou fisiológico) na forma de estresse ou infecção poderiam deixar a articulação mais sensível ao LPS (Alcalay et al., 1989; Fearon et al., 2001). Desta forma, a fim de mimetizar esta situação clínica, a indução da artrite reativa ao LPS é realizada após prévia sensibilização da articulação com carragenina. A carragenina é um mucopolissacarídeo extraído do musgo *Chondrus crispus*, que ao ser injetada na articulação induz incapacitação (Tonussi e Ferreira, 1992) e sensibilização articular (Santer et al., 1983). Nossos estudos têm mostrado que a sensibilização da articulação com carragenina apenas amplifica a resposta nociceptiva e edematogênica ao LPS sem alterar o padrão de resposta. O perfil de migração celular também não é alterado pela carragenina, visto que, LPS sozinho induz

migração celular muito similar à observada na presença da pré-sensibilização.

Normalmente, quando se estuda drogas antiinflamatórias ou a importância relativa dos vários mediadores inflamatórios, a nocicepção e o edema não são analisados em paralelo no mesmo modelo experimental. Assim, o objetivo deste novo modelo foi aproveitar o modelo em que se avalia a nocicepção e o edema em paralelo, para analisar também, a migração celular.

## 2 OBJETIVOS

- Avaliar a participação de citocinas pró e antiinflamatórias na nocicepção e edema articulares e na migração celular no modelo de artrite reativa ao LPS, em ratos;
- Comparar o efeito de anticorpos anti-citocinas com o de fármacos antiartríticos potencialmente moduladores da atividade das citocinas.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o efeito dos antiinflamatórios não esteroidais, indometacina e diclofenaco sódico, na nocicepção e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS;
- Verificar a ação de um antiinflamatório glicocorticóide, a dexametasona na nocicepção e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS;
- Determinar o efeito da sulfasalazina, leflunomide, diacereína e pentoxifilina na nocicepção e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS;
- Avaliar o efeito dos anticorpos anti-TNF $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$ , anti-CINC-1 (IL-8) na nocicepção e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS;
- Avaliar o efeito dos anticorpos anti-IL-10, anti-IL-13, anti-IL-4 e da interleucina-13 (IL-13) na nocicepção e edema articulares e na migração celular induzidos pelo LPS.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Os procedimentos experimentais foram realizados com ratos Wistar machos com idade aproximada de 3 meses e peso variando entre 250 e 300 g. Os animais foram criados, até o desmame, pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos, até o uso, no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia ou no Biotério do Laboratório de Neurobiologia da Nocicepção sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 1$  °C) e luz (ciclo de claro/escuro de 12 horas) e dispendo de livre acesso à água e ração. Os animais foram removidos do Biotério para ambientação 1h antes de quaisquer procedimentos experimentais, sendo que os mesmos foram realizados normalmente no período matutino. Os experimentos descritos foram conduzidos de acordo com as diretrizes éticas da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1983) e aprovados pelo comitê de ética local para pesquisa animal sob o número 23080.032820/2003-74/UFSC.

#### 3.2 DROGAS

Os seguintes compostos foram utilizados:

##### **(a) Compostos utilizados para a indução da artrite reativa ao LPS:**

- Carragenina (tipo múltiplo kappa / lambda) proveniente da BDH Químicos Ltda, UK;
- Lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS; sorotipo 055:B5; Sigma Chemical Co., EUA).

##### **(b) Drogas antiinflamatórias esteroidais e não esteroidais:**

- Dexametasona (Merk, Sharp e Dohme Ltda, Brasil);
- Indometacina (Merk, Sharp e Dohme Ltda, Brasil);
- Diclofenaco sódico.

**(b) Compostos inibidores da produção e / ou liberação de citocinas:**

- Pentoxifilina (Trental<sup>®</sup>) (Aventis Pharma Ltda, Brasil);
- Leflunomide (Arava<sup>®</sup>) (Aventis Pharma Ltda, Brasil);
- Diacereína;
- Sulfasalazina.

**(c) Citocinas e anticorpos anti-citocinas pró e antiinflamatórias:**

- Anticorpos anti-IL-1 $\beta$ , anti-TNF $\alpha$ , anti-IL-10, anti-IL-13 e anti-IL-4 (NIBSC, UK);
- Anticorpos anti-CINC-1 (PeproTeck, EUA);
- Interleucina – 13 (IL-13) (derivado rDNA, *E. coli*, NIBSC, UK).

**(d) Reagentes e corantes utilizados no leucograma do fluido sinovial:**

- Reagente diluidor de células: Líquido de Turk (Composição: ácido acético: 2 %, Labsynth Produtos para Laboratório LTDA, Diadema/SP; azul de metileno: 1%, Quimibrás Indústria Química S.A. Rio de Janeiro/RJ; água destilada: q.s.p.);
- Anticoagulante: EDTA (Nuclear, Diadema/SP);
- Corante May-Grünwald (Produtos Citológicos Soldan LTDA, Porto Alegre / RS);
- Corante Giemsa (Labsynth Produtos para Laboratório LTDA, Diadema / SP).

Na tabela a seguir estão relacionadas informações sobre a dose, o tempo de tratamento e o veículo utilizado para diluir as drogas, bem como, as vias de administração (i.art.: intraarticular; i.p.: intraperitoneal; v.o.: via oral) e o volume injetado. O veículo, além de ter sido utilizado para diluir as drogas, também foi usado como tratamento para os respectivos grupos controle, exceto para os anticorpos anti-citocinas, os quais já foram adquiridos como uma solução de anticorpos em soro total, não necessária a realização de diluição. Neste caso, os grupos controle receberam soro inespecífico, ou seja, soro livre de anticorpos (Tabela 1).

**Tabela 1** – Drogas utilizadas no presente estudo com as respectivas doses, tempo de tratamento, veículo, vias de administração e volume injetado.

Drogas	Dose e Tempo de tratamento	Veículo	Vias de administração	Volume injetado
Carragenina	300 µg/joelho; Em articulação naïve	Solução salina 0,9 %	i.art.	25 µl
LPS	0,03; 1,0 ou 30 ng; 3 dias após a carragenina	Solução salina 0,9 %	i.art.	50 µl
Dexametasona	0,4 ou 4,0 mg/kg; 1 h antes do LPS (30 ng)	Solução fisiológica 0,9 %	i.p.	0,1 ml/100 g
Indometacina	0,5 ou 2,5 mg/kg; 1 h antes ou 1h após o LPS (30 ng)	Solução de bicarbonato de sódio 1,29 %	i.p.	0,1 ml/100 g
Diclofenaco sódico	0,5; 2,5 ou 5,0 mg/kg; 1 h antes ou 1h após o LPS (30 ng)	Solução fisiológica 0,9 %	i.p.	0,1 ml/100 g
Pentoxifilina	20 ou 40 mg/kg; 1 h ante do LPS (30 ng)	Solução fisiológica 0,9 %	i.p.	0,1 ml/100 g
Leflunomide	20, 40 ou 80 mg/kg; 1 h antes do LPS (30 ng)	Água destilada	v.o.	0,1 ml/100 g
Diacereína	50 ou 200 mg/kg; 1 h antes do LPS (30 ng)	Solução fisiológica 0,9 %	i.p.	0,1 ml/100 g
Sulfasalazina	30 ou 100 mg/kg; 1h antes do LPS (30 ng)	Solução fisiológica 0,9 %	i.p.	0,1 ml/100g
Interleucina – 13 (IL-13)	0,1; 1,0 ou 10 UI; 20 min antes do LPS (0,03 ng)	Solução fisiológica 0,9 %	i.art.	20 µl
Anticorpos anti- TNF $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$ e anti-CINC-1	20 ou 40 µl do soro total; 20 min antes do LPS (30 ng)	Soro total	i.art.	20 ou 40 µl
Anticorpos anti-IL-10 e anti-IL-13	20 µl do soro total; 20 min antes do LPS (1,0 ou 0,03 ng)	Soro total	i.art.	20 µl

**Observação:** 1 UI de IL-13 = 1 pg de IL-13

### **3.3 INJEÇÃO INTRAARTICULAR DE DROGAS**

A injeção intraarticular (i.art.) de carragenina e a depilação do joelho posterior direito foram realizados nos animais anestesiados com éter etílico e, as demais injeções intraarticulares, com os animais acordados. Para isso, os animais foram gentilmente imobilizados dentro de um cone de polietileno de maneira que fosse possível ter acesso apenas ao joelho posterior direito, o qual recebeu as injeções intraarticulares de drogas. As injeções foram realizadas através do ligamento suprapatelar para dentro da cavidade sinovial, imediatamente após a realização de procedimentos de antisepsia com solução de álcool iodado. O volume máximo de drogas injetadas na cavidade articular foi de 50 µl.

### **3.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

#### **3.4.1 INDUÇÃO DA ARTRITE REATIVA AO LPS**

A artrite reativa ao LPS foi induzida pela injeção intraarticular (i.art.) de lipopolissacarídeo de *E. Coli* (LPS) em articulação previamente sensibilizada com carragenina. Inicialmente a articulação tibio-femural do joelho posterior direito dos ratos recebeu uma injeção de carragenina (300 µg/joelho; 25 µl; i.art.) diluída em solução fisiológica estéril (0,9 %). Três dias após, a mesma articulação recebeu uma injeção de LPS (0,03; 1,0 ou 30 ng/joelho; 50 µl; i.art.) diluído em solução fisiológica estéril (0,9 %). As injeções foram realizadas nos animais anestesiados e o sítio de injeção foi previamente submetido a anti-sepsia com solução de álcool iodado.

#### **3.4.2 AVALIAÇÃO DA INCAPACITAÇÃO ARTICULAR**

Para avaliar o grau de incapacitação motora do membro que recebeu o estímulo nociceptivo, foi utilizado o modelo de incapacitação articular, em ratos, descrito por Tonussi e Ferreira (1992). O sistema de registro é constituído por um cilindro de aço inóx (30 cm de largura e 30 cm de diâmetro), coberto com tela de trama fina de arame de aço inóx, que apresenta rotação contínua a uma velocidade de 3 r.p.m. A superfície do cilindro é dividida em três trilhos iguais, cada qual ligado

ao fio terra de um computador, o que permite a análise de três animais simultaneamente. Sapatilhas metálicas são ajustadas em ambas as patas posteriores, sendo que, apenas a sapatilha que se encontra na pata direita está conectada à porta de entrada de dados do computador. Após a colocação das sapatilhas, os animais foram mantidos em suas respectivas caixas, por pelo menos 1 h, para habituação. Para registrar o estado funcional das articulações, os animais foram submetidos à marcha forçada, no cilindro em rotação, por um período de 60 segundos. O computador registrou o tempo total que a pata posterior direita dos animais ficou sem tocar a superfície do cilindro neste período (Tempo de Elevação da Pata, TEP; s). Em animais normais, o TEP varia em torno de 10 segundos, enquanto a injeção intraarticular de agentes algogênicos causa elevação deste valor indicando o desenvolvimento de incapacitação articular. Em todos os procedimentos experimentais os animais foram treinados no aparelho no dia anterior ao teste. Durante os experimentos, as medidas do TEP foram realizadas uma vez a cada hora por um período de seis horas, sendo que, imediatamente após tal registro os animais foram submetidos a medida do diâmetro articular e subseqüentemente colocados em suas respectivas gaiolas.

### **3.4.3 AVALIAÇÃO DO EDEMA ARTICULAR**

A avaliação do edema inflamatório induzido pelo LPS foi realizada através da medida do diâmetro articular, imediatamente após cada medida da incapacitação articular, uma vez a cada hora e por um período de seis horas. Para isso, os animais foram gentilmente imobilizados dentro de um cone de polietileno de maneira que fosse possível ter acesso apenas ao joelho posterior direito, do qual retirou-se a medida do diâmetro da articulação tibio-femural com o auxílio de um paquímetro. Os dados foram apresentados como a diferença média entre os valores do diâmetro articular obtidos a cada hora após a injeção de LPS e o valor obtido imediatamente antes da injeção do LPS (Variação do Diâmetro Articular, DA, cm).

#### 3.4.4 LEUCOGRAMA DO FLUIDO SINOVIAL

O leucograma do fluido sinovial foi realizado com o objetivo de avaliar quantitativamente e qualitativamente a migração celular para o fluido sinovial, 6h após a estimulação com LPS. Para isso, os animais foram submetidos à eutanásia com éter e, em seguida, efetuou-se a coleta de 2 a 5 µl de fluido sinovial puro para confecção de esfregaços em lâminas de vidro. Estes esfregaços foram corados pelo método May-Grünwald-Giemsa e, posteriormente, utilizados para a contagem diferencial de leucócitos em microscópio óptico comum com auxílio da objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes). Foram contadas 100 células por lâmina, em campos ópticos distribuídos aleatoriamente e diferenciando-se células mononucleares (MON) de polimorfonucleares (PMN). Para realizar a contagem global de leucócitos realizou-se uma lavagem da cavidade articular, imediatamente após a coleta do fluido sinovial puro, com 100 µl de solução salina 0,9 %. Deste lavado, retirou-se uma alíquota de 20 µl que foi diluída em 380 µl de solução salina 0,9 %. A leitura do número total de células foi realizada com o auxílio de Câmara de Neubauer e microscópio óptico (aumento de 400 vezes). Os dados foram expressos como contagem total de células por milímetro cúbico de fluido sinovial  $\pm$  E.P.M. (CT/mm<sup>3</sup>). A partir do número total de células foi realizado o cálculo do número absoluto de MON e de PMN presentes no fluido sinovial. Os resultados foram expressos como a média de MONs ou de PMNs  $\pm$  E.P.M./mm<sup>3</sup>.

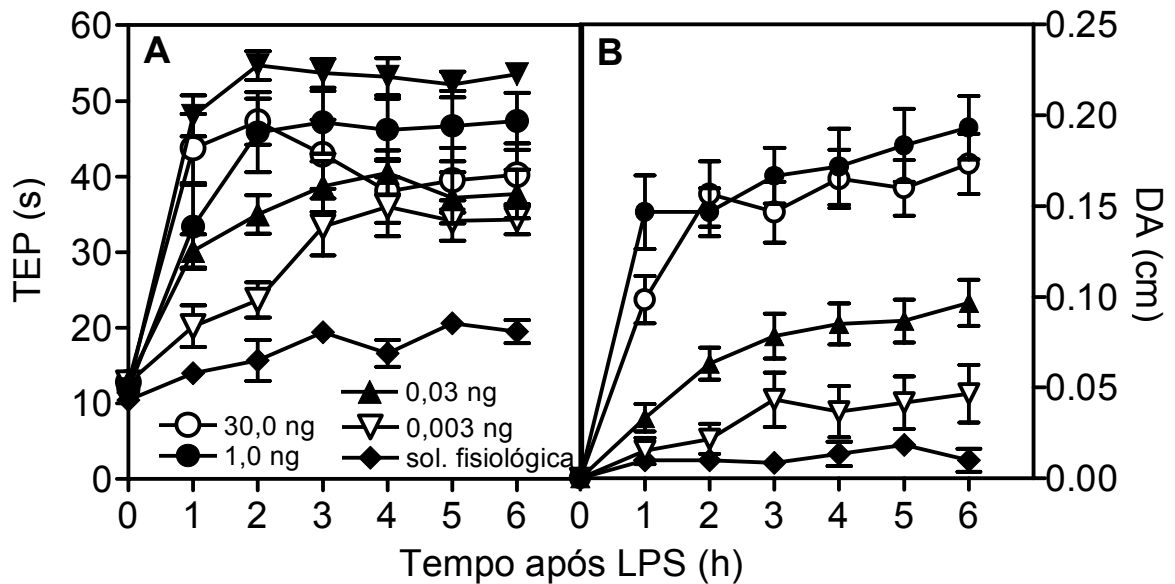
#### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M., 95 %) de seis animais. A análise estatística dos dados foi realizada no programa "Graph Pad Prism 3.0<sup>®</sup>". Utilizou-se análise de variância (ANOVA) de uma via ou para medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey, ou alternativamente, o teste *t* de Student's pareado e não pareado, quando apropriado. Valores de *P* menores que 0,05 (*P* < 0,05) foram considerados como indicativos de significância.

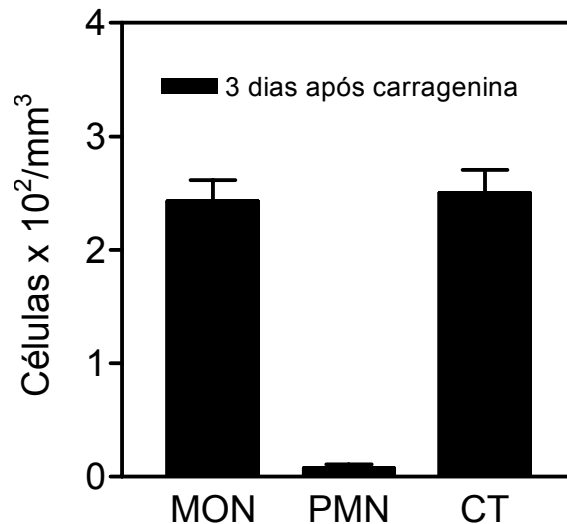
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Artrite reativa induzida de maneira dose-dependente pelo LPS

LPS (30,0; 1,0; 0,03 ou 0,003 ng; 50 µl) ou solução fisiológica 0,9 % estéril (50 µl) foram administrados por via intraarticular três dias após sensibilização da articulação com carragenina (300 µg; 25 µl; i.art.). LPS promoveu aumento dose-dependente da incapacitação e edema articulares (Figura 1A, B). Esta resposta teve início rápido, atingiu a resposta máxima entre a primeira e a segunda hora após a injeção do LPS e persistiu durante as seis horas de análise. Pelo contrário, solução fisiológica quando injetada nos animais pré-sensibilizados com carragenina não desenvolveu nem incapacitação e nem aumento do diâmetro articular. LPS (30,0; 3,0 ou 0,03 ng) injetado em articulação naïve produziu aumento discreto da incapacitação e diâmetro articulares (Figura 3A, B). O conteúdo celular 6 horas após a injeção do LPS tanto em articulação naïve quanto pré-sensibilizada com carragenina foi similar, com prevalência de células mononucleares (MON) sobre as polimorfonucleares. LPS (30,0 ng) produziu maior migração celular do que LPS (3,0 ou 0,03 ng) (Figura 3C). A migração celular induzida pela maior dose de LPS testada (30 ng) em articulação naïve também superou a migração celular observada em articulações pré-sensibilizadas com carragenina.

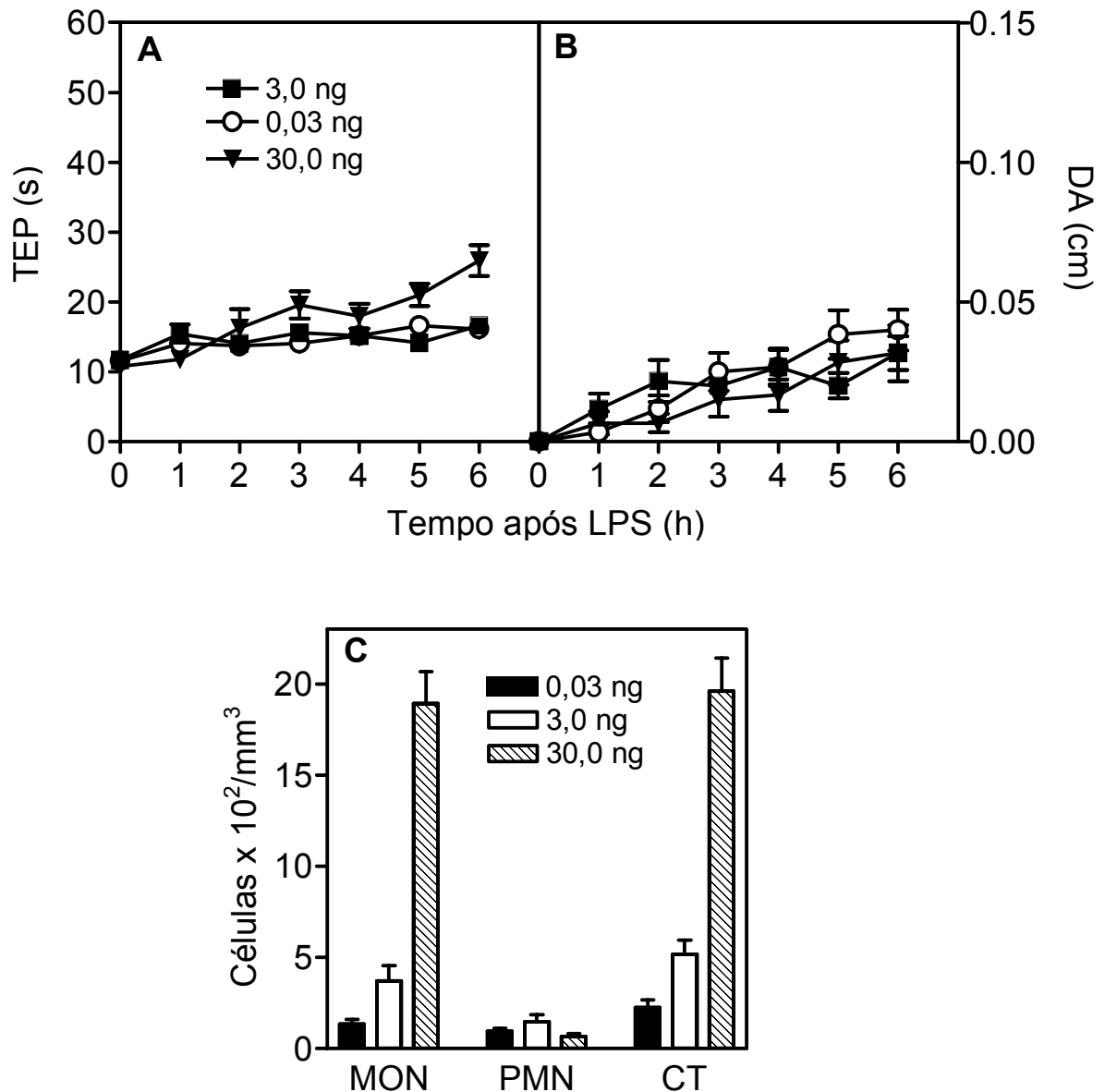


**Figura 1** – Curva dose-resposta do LPS. Efeito da administração intraarticular de LPS na incapacitação (A) e no diâmetro articular (B). LPS (30,0; 1,0; 0,03 ou 0,003 ng; 50 µl) foi administrado 3 dias após a carragenina (300 µg / articulação). O grupo controle recebeu solução fisiológica 0,9 % (sol. fisiológica; 50 µl). Cada ponto representa a média ± E.P.M. de pelo menos 6 animais.



**Figura 2** – Migração celular 3 dias após a sensibilização com carragenina. Carragenina (300 µg / articulação) foi administrada em articulação naiva. A contagem global e diferencial dos leucócitos do fluido sinovial foi realizada 3 dias após a injeção de carragenina (MON: mononucleares; PMN: polimorfonucleares; CT: leucócitos totais). Cada barra representa a média ± E.P.M. de pelo menos 6 animais.



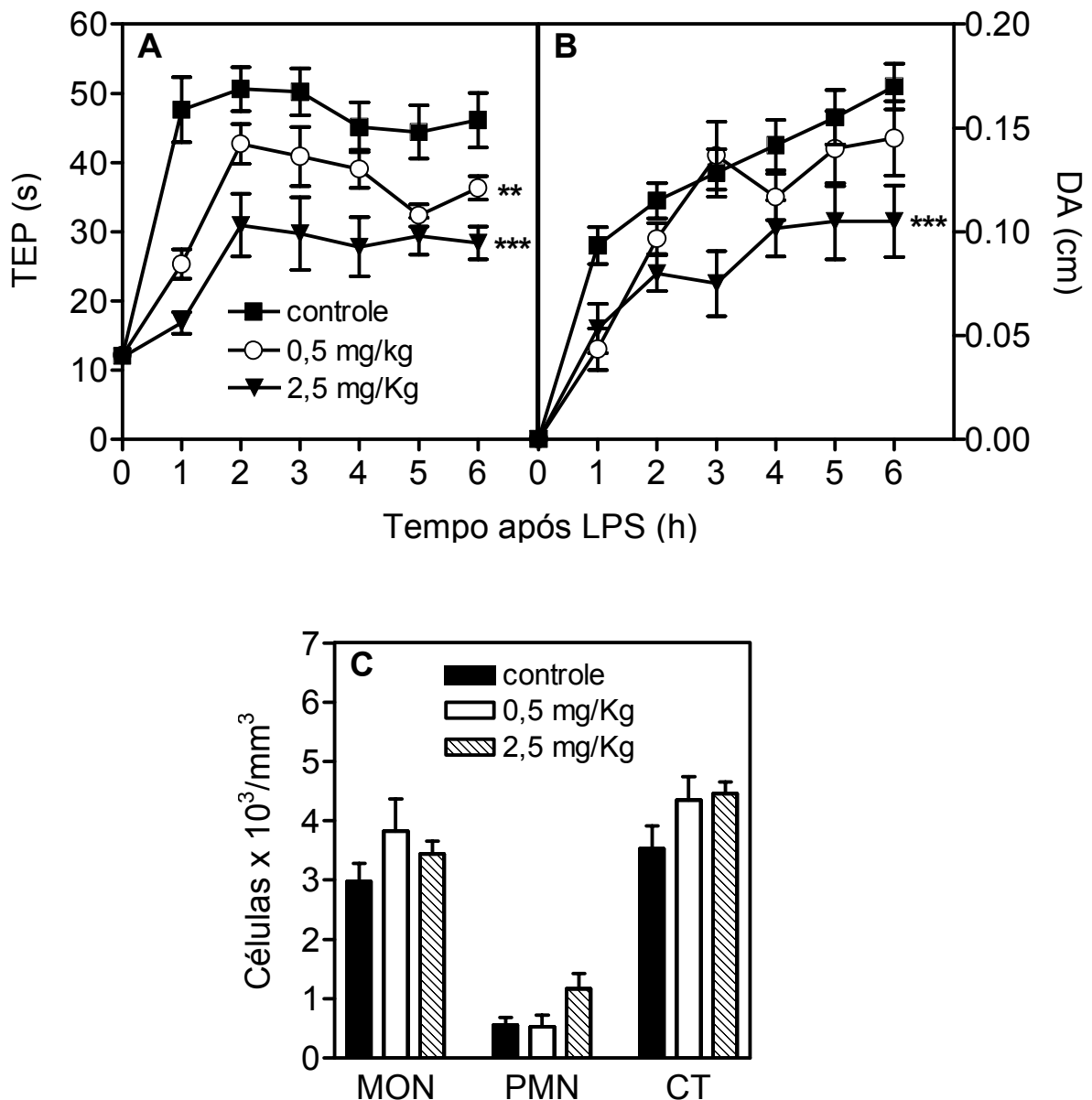


**Figura 3** – Efeito da administração de LPS em articulação naïve na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) e na migração celular (C). LPS (0,03; 3,0 ou 30,0 ng; 50  $\mu$ l) foi administrado em articulação naïve. A contagem global e diferencial dos leucócitos do fluido sinovial foi realizada 6 h após a injeção de LPS (MON: mononucleares; PMN: polimorfonucleares; CT: leucócitos totais). Cada ponto / barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais.

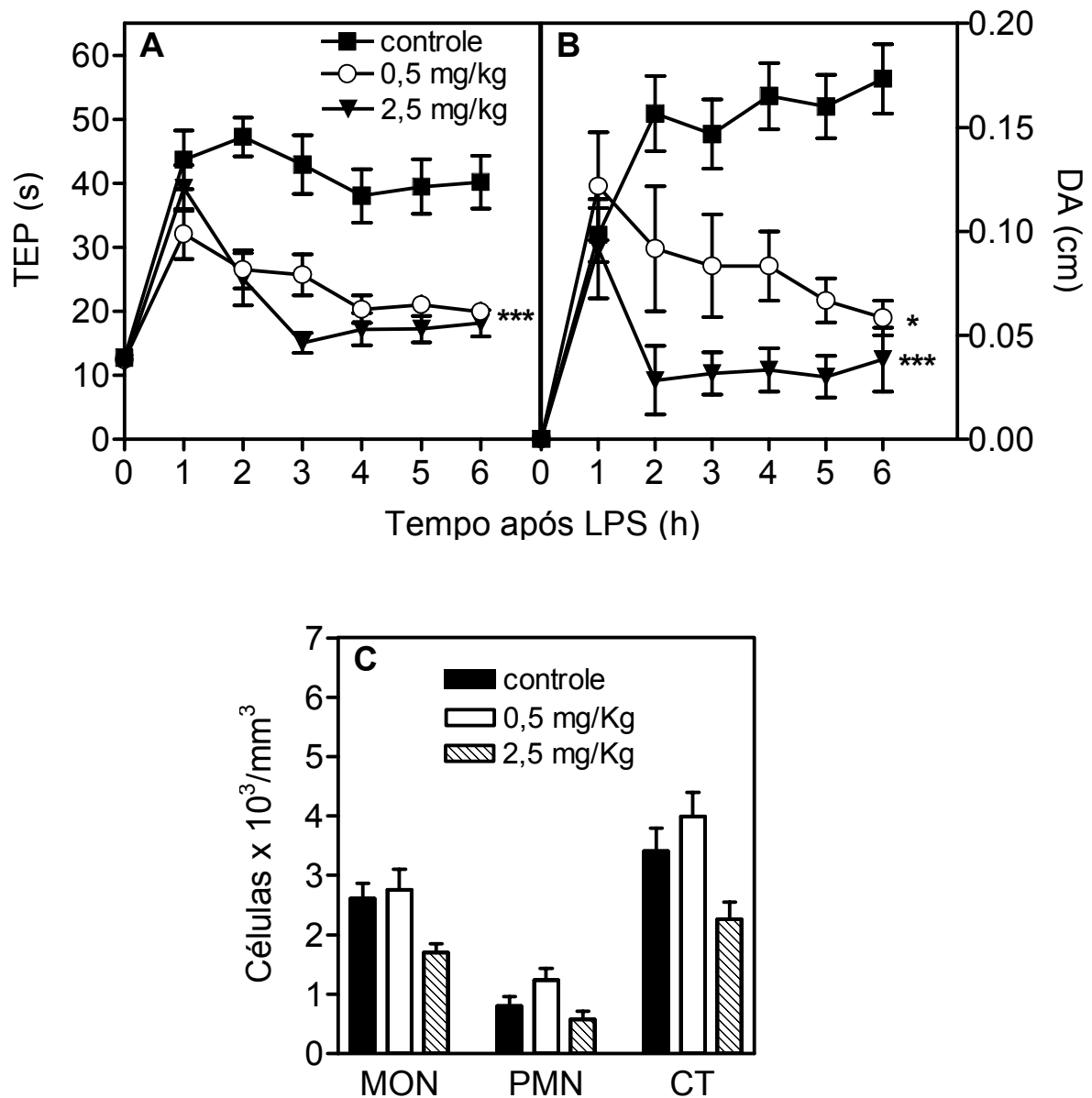
## **4.2 Avaliação da ação de fármacos antiinflamatórios na incapacitação e diâmetro articulares e na migração celular induzidos pelo LPS**

### **4.2.1 Efeito do pré e pós-tratamento com indometacina na incapacitação e diâmetro articulares e na migração celular induzidos pelo LPS**

Indometacina (0,5 ou 2,5 mg/kg) foi administrada por via intraperitoneal 1h antes ou 1h após o estímulo com LPS (30 ng). Quando administrada 1h antes do LPS, ambas as doses de indometacina promoveram significativa inibição da incapacitação articular (indometacina 0,5 mg/kg:  $P < 0,01$ ; 2,5 mg/kg:  $P < 0,001$ ) (Figura 4A). Apenas a dose maior de indometacina foi capaz de inibir o aumento do diâmetro articular induzido pelo LPS ( $P < 0,001$ ) (Figura 4B). Nesta condição, indometacina não alterou significativamente a migração de MON (MON controle:  $2969 \pm 306$  células/mm<sup>3</sup>; MON indometacina 0,5 mg/kg:  $3823 \pm 538$  células/mm<sup>3</sup>; MON indometacina 2,5 mg/kg:  $3438 \pm 213$  células/mm<sup>3</sup>) e nem de PMN (PMN controle:  $556 \pm 122$  células/mm<sup>3</sup>; PMN indometacina 0,5 mg/kg:  $526 \pm 196$  células/mm<sup>3</sup>; MON indometacina 2,5 mg/kg:  $1170 \pm 247$  células/mm<sup>3</sup>) (Figura 4C). Quando administrada 1h após a injeção de LPS, ambas as doses de indometacina promoveram inibição da incapacitação (indometacina 0,5 e 2,5 mg/kg:  $P < 0,001$ ) (Figura 5A) e do aumento do diâmetro articular induzidos pelo LPS (indometacina 0,5 mg/kg:  $P < 0,05$  e indometacina 2,5 mg/kg:  $P < 0,001$ ) (Figura 5B), porém, não foi capaz de inibir a migração de MON ou de PMN quando comparada ao grupo controle (MON controle:  $2607 \pm 260$  células/mm<sup>3</sup>; MON indometacina 2,5 mg/kg:  $1694 \pm 156$  células/mm<sup>3</sup>; PMN controle:  $805 \pm 149$  células/mm<sup>3</sup>; PMN indometacina 2,5 mg/kg:  $572 \pm 139$  células/mm<sup>3</sup>) (Figura 5C).



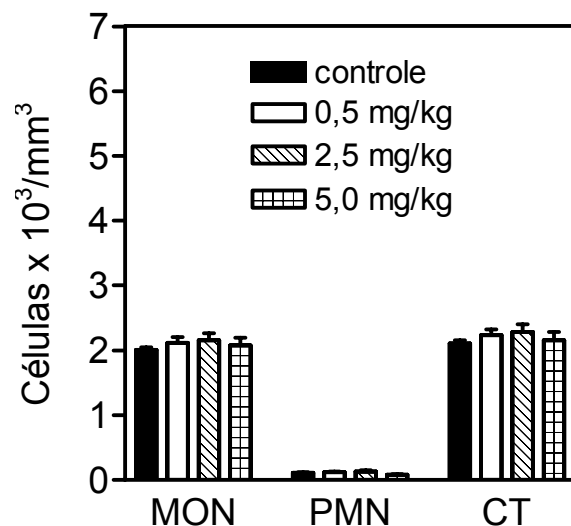
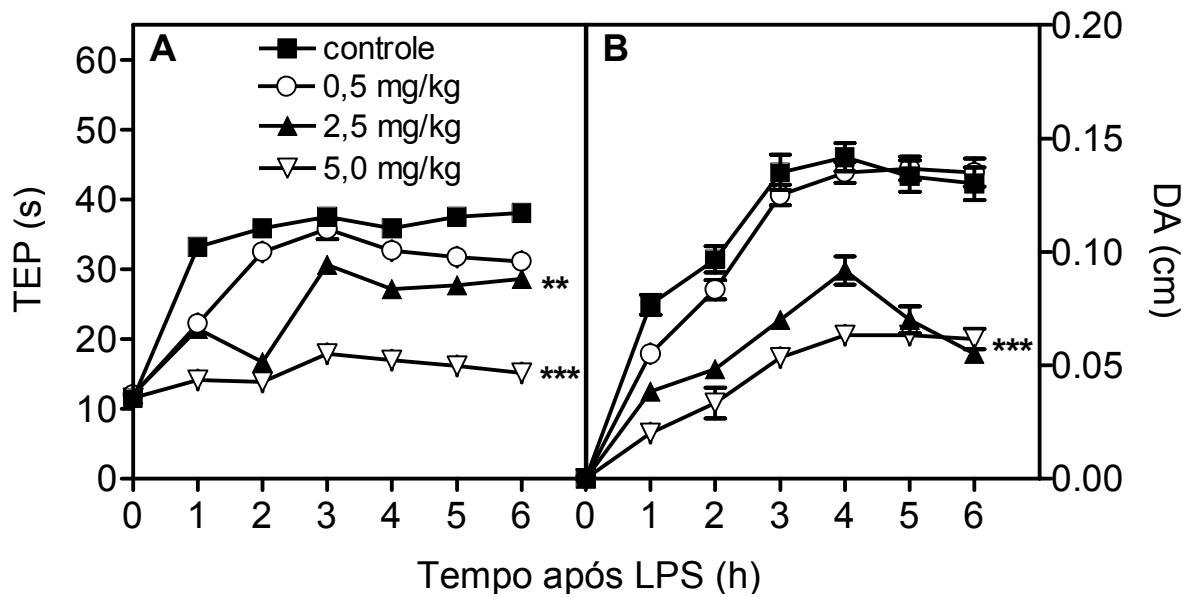
**Figura 4** – Efeito do pré-tratamento com indometacina na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) e na migração celular (C) induzidos pelo LPS. Indometacina (0,5 ou 2,5 mg/kg; i.p.) foi administrada 1h antes do LPS (30 ng). O grupo controle recebeu solução de bicarbonato de sódio 1,29 % (0,1 ml / 100 g). A contagem global e diferencial dos leucócitos do fluido sinovial foi realizada 6 h após a injeção de LPS (MON: mononucleares; PMN: polimorfonucleares; CT: leucócitos totais). Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais. \*\* e \*\*\* representam a diferença estatisticamente significativa com  $P < 0,01$  e  $0,001$  respectivamente (A, B: Anova para medidas repetidas seguida do teste de Tukey; C: Anova de uma via seguida do teste de Tukey).



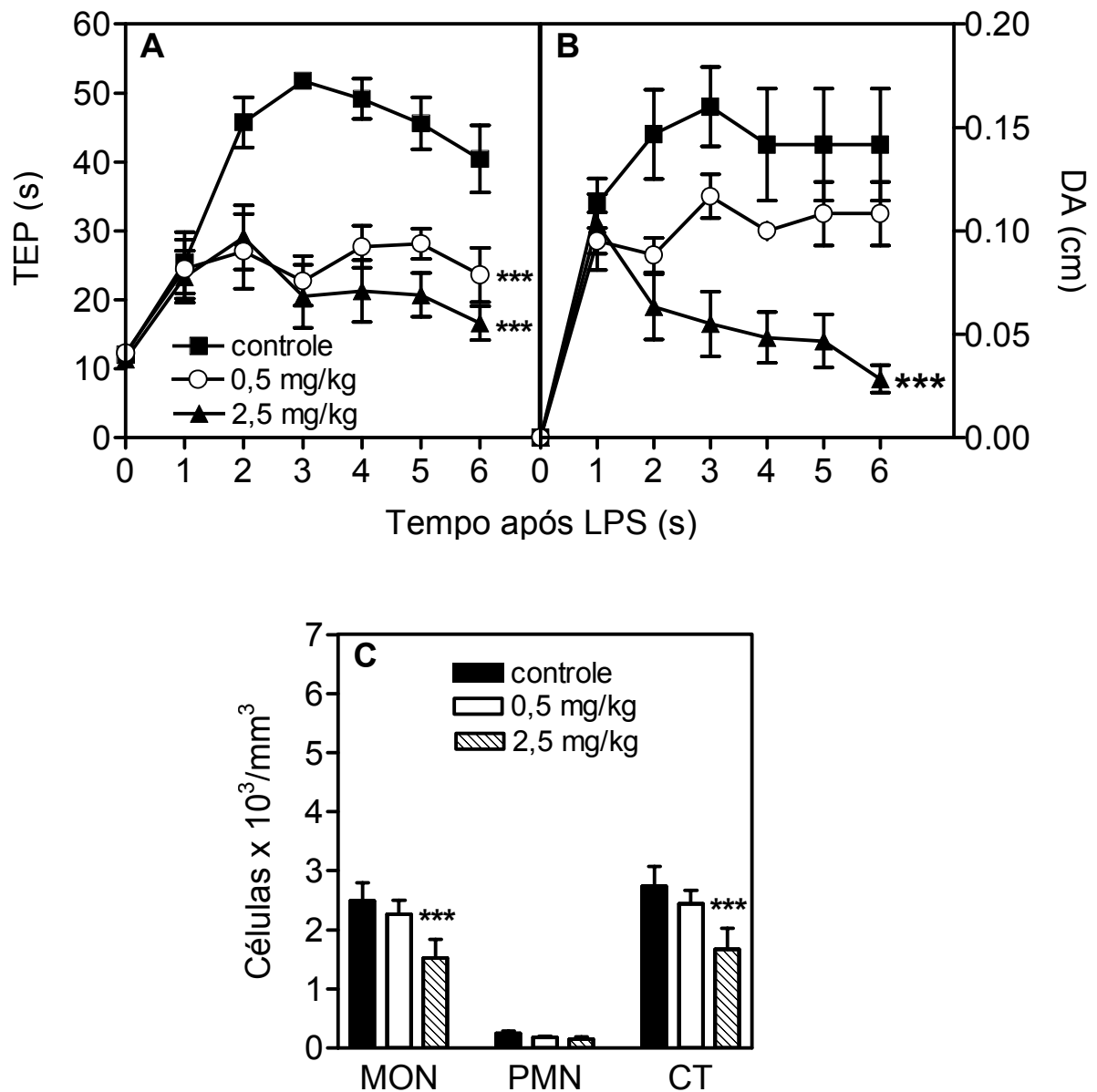
**Figura 5** – Efeito do pós-tratamento com indometacina na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) e na migração celular (C) induzidos pelo LPS. Indometacina (0,5 ou 2,5 mg/kg; i.p.) foi administrada 1h após o LPS (30 ng). O grupo controle recebeu solução de bicarbonato de sódio 1,29 % (0,1 ml / 100 g). A contagem global e diferencial dos leucócitos do fluido sinovial foi realizada 6 h após a injeção de LPS (MON: mononucleares; PMN: polimorfonucleares; CT: leucócitos totais). Cada ponto / barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais. \* e \*\*\* representam a diferença estatisticamente significativa com  $P < 0,05$  e  $0,001$  (A, B: Anova para medidas repetidas seguida do teste de Tukey; C: Anova de uma via seguida do teste de Tukey).

#### 4.2.2 Efeito do pré e pós-tratamento com diclofenaco de sódio na incapacitação e diâmetro articulares e na migração celular induzidos pelo LPS

Diclofenaco de sódio (0,5; 2,5 ou 5,0 mg/kg) foi administrado por via intraperitoneal 1h antes ou 1h após o LPS (30 ng). Quando administrado 1h antes do LPS, diclofenaco (2,5 e 5,0 mg/kg) inibiu significativamente a incapacitação (diclofenaco 2,5 mg/kg:  $P < 0,01$ ; diclofenaco 5,0 mg/kg:  $P < 0,001$ ) (Figura 6A) e o aumento do diâmetro articular (diclofenaco 2,5 mg/kg e 5,0 mg/kg:  $P < 0,001$ ) (Figura 6B) induzidos pelo LPS. Diclofenaco não alterou a migração de MON (MON controle:  $2001 \pm 108$  células/mm<sup>3</sup>; MON diclofenaco 0,5 mg/kg:  $2117 \pm 213$  células/mm<sup>3</sup>; MON diclofenaco 2,5 mg/kg:  $2152 \pm 261$  células/mm<sup>3</sup>; MON diclofenaco 5,0 mg/kg:  $2079 \pm 274$  células/mm<sup>3</sup>) e nem de PMN (PMN controle:  $107 \pm 20$  células/mm<sup>3</sup>; PMN diclofenaco 0,5 mg/kg:  $115 \pm 27$  células/mm<sup>3</sup>; PMN diclofenaco 2,5 mg/kg:  $131 \pm 30$  células/mm<sup>3</sup>; PMN diclofenaco 5,0 mg/kg:  $79 \pm 24$  células/mm<sup>3</sup>) (Figura 6C) quando comparado ao grupo controle. Diclofenaco, administrado 1h após o LPS, promoveu significativa inibição da incapacitação articular (diclofenaco 0,5 e 2,5 mg/kg:  $P < 0,001$ ) (Figura 7A). Apenas a maior dose de diclofenaco (2,5 mg/kg) promoveu inibição do aumento do diâmetro articular ( $P < 0,001$ ) (Figura 7B) e da migração de MON ( $P < 0,001$ ) (Figura 7C).



**Figura 6** – Efeito do pré-tratamento com diclofenaco de sódio na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) e na migração celular (C) induzidos pelo LPS. Diclofenaco (0,5; 2,5 e 5,0 mg/kg; i.p.) foi administrado 1h antes do LPS (30 ng). O grupo controle recebeu solução fisiológica 0,9 % (0,1 ml / 100 g). A contagem global e diferencial dos leucócitos do fluido sinovial foi realizada 6 h após a injeção de LPS (MON: mononucleares; PMN: polimorfonucleares; CT: leucócitos totais). Cada ponto / barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais. \*\* e \*\*\* representam a diferença estatisticamente significativa com  $P < 0,01$  e  $0,001$  respectivamente (A, B: Anova para medidas repetidas seguida do teste de Tukey; C: Anova de uma via seguida do teste de Tukey).

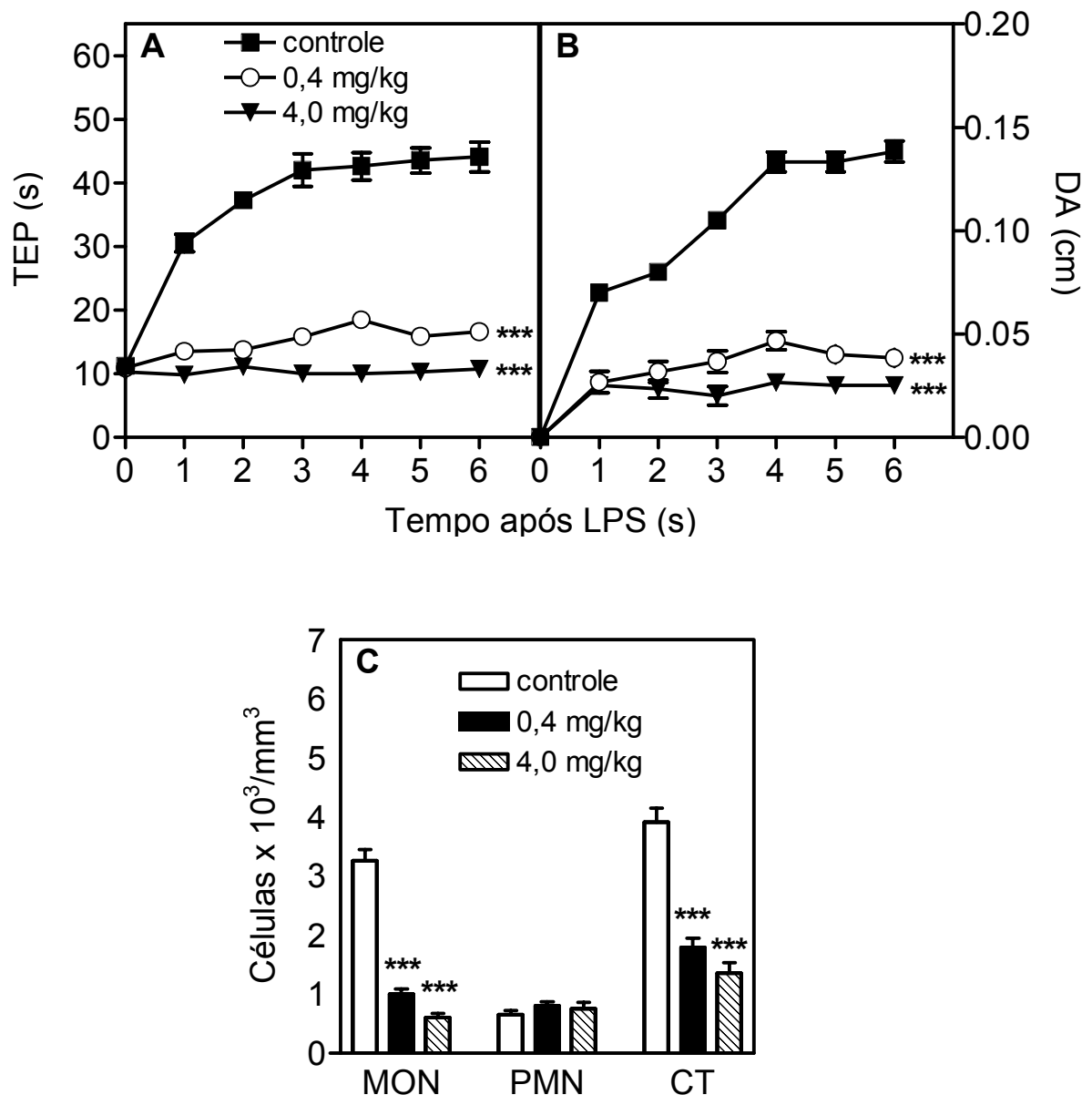


**Figura 7** – Efeito do pós-tratamento com diclofenaco de sódio na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) e na migração celular (C) induzidos pelo LPS. Diclofenaco (0,5 e 2,5 mg/kg; i.p.) foi administrado 1h após o LPS (30 ng). O grupo controle recebeu solução fisiológica 0,9 % (0,1 ml / 100 g). A contagem global e diferencial dos leucócitos do fluido sinovial foi realizada 6 h após a injeção de LPS (MON: mononucleares; PMN: polimorfonucleares; CT: leucócitos totais). Cada ponto / barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais. \*\*\* representa a diferença estatisticamente significativa com  $P < 0,001$  (A, B: Anova para medidas repetidas seguida do teste de Tukey; C: Anova de uma via seguida do teste de Tukey).

#### 4.2.3 Efeito do pré-tratamento com dexametasona na incapacitação e diâmetro articulares e na migração celular induzidos pelo LPS

Dexametasona (0,4 ou 4,0 mg/kg) foi administrada por via intraperitoneal 1h antes do LPS (30 ng). Ambas as doses inibiram significativamente a incapacitação articular ( $P < 0,001$ ), (TEP controle:  $44,1 \pm 5,7$  s; TEP dexametasona 0,4 mg/kg:  $16,5 \pm 2,1$  s; TEP dexametasona 4,0 mg/kg:  $10,7 \pm 0,9$  s) (Figura 8A), o aumento do diâmetro articular ( $P < 0,001$ ), (DA controle:  $0,13 \pm 0,01$  cm; DA dexametasona 0,4 mg/kg:  $0,03 \pm 0,01$  cm; DA dexametasona 4,0 mg/kg:  $0,02 \pm 0,01$  cm) (Figura 8B) e a migração de MON ( $P < 0,001$ ) (MON controle:  $3262 \pm 444$  células/mm<sup>3</sup>; MON dexametasona 0,4 mg/kg:  $993 \pm 232$  células/mm<sup>3</sup>; MON dexametasona 4,0 mg/kg:  $598 \pm 184$  células/mm<sup>3</sup>). Dexametasona não alterou a migração de PMN (PMN controle:  $652 \pm 169$  células/mm<sup>3</sup>; PMN dexametasona 0,4 mg/kg:  $798 \pm 179$  células/mm<sup>3</sup>; PMN dexametasona 4,0 mg/kg:  $751 \pm 268$  células/mm<sup>3</sup>) (Figura 8C).

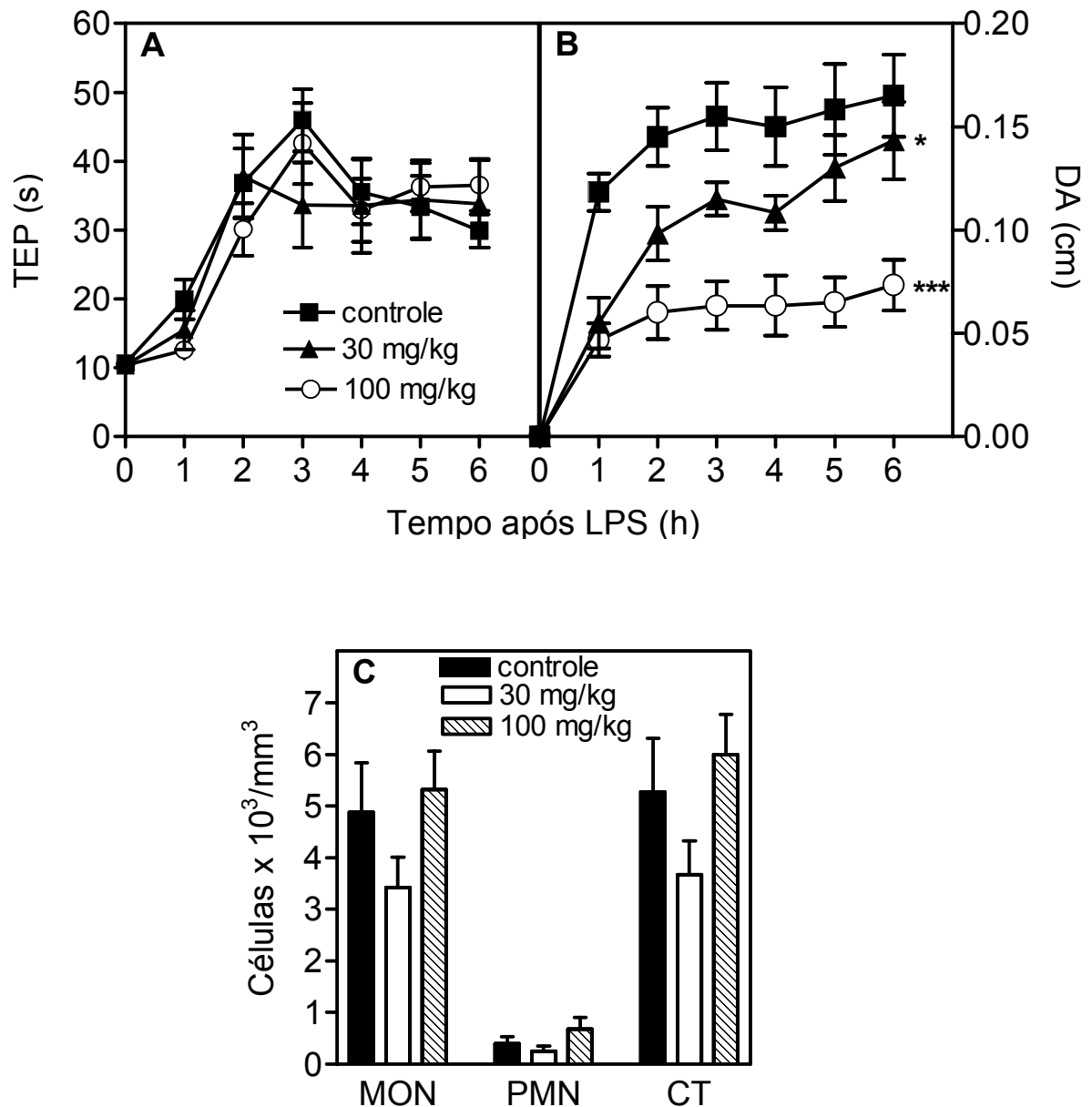




**Figura 8** – Efeito do pré-tratamento com dexametasona na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) e na migração celular (C) induzidos pelo LPS. Dexametasona (0,4 ou 4,0 mg/kg; i.p.) foi administrada 1h antes do LPS (30 ng). O grupo controle recebeu solução fisiológica 0,9 % (0,1 ml / 100 g). A contagem global e diferencial dos leucócitos do fluido sinovial foi realizada 6 h após a injeção de LPS (MON: mononucleares; PMN: polimorfonucleares; CT: leucócitos totais). Cada ponto / barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais. \*\*\* representa a diferença estatisticamente significativa com  $P < 0,001$  respectivamente (A, B: Anova para medidas repetidas seguida do teste de Tukey; C: Anova de uma via seguida do teste de Tukey).

#### **4.2.4 Efeito do pré-tratamento com sulfasalazina na incapacitação e diâmetro articulares e na migração celular induzidos pelo LPS**

Sulfasalazina (30 ou 100 mg/kg) foi administrada por via intraperitoneal, 1h antes do LPS (30 ng). Sulfasalazina promoveu inibição dose-dependente do aumento do diâmetro articular (sulfasalazina 30 mg/kg:  $P < 0,05$ ; 100 mg/kg:  $P < 0,001$ ) (Figura 9B). Por outro lado, não alterou a incapacitação articular (TEP controle:  $36,8 \pm 4,9$  s; TEP sulfasalazina, 30 mg/kg:  $37,8 \pm 6,1$  s; TEP sulfasalazina, 100 mg/kg:  $30,0 \pm 3,8$  s) (Figura 9A) e nem migração de MON ou de PMN (MON controle:  $4879 \pm 962$  células/mm<sup>3</sup>; MON sulfasalazina, 30 mg/kg:  $3422 \pm 590$  células/mm<sup>3</sup>; MON sulfasalazina, 100 mg/kg:  $5319 \pm 749$  células/mm<sup>3</sup>; PMN controle:  $395 \pm 134$  células/mm<sup>3</sup>; PMN sulfasalazina, 30 mg/kg:  $244 \pm 101$  células/mm<sup>3</sup>; PMN sulfasalazina, 100 mg/kg:  $681 \pm 226$  células/mm<sup>3</sup>) (Figura 9C).

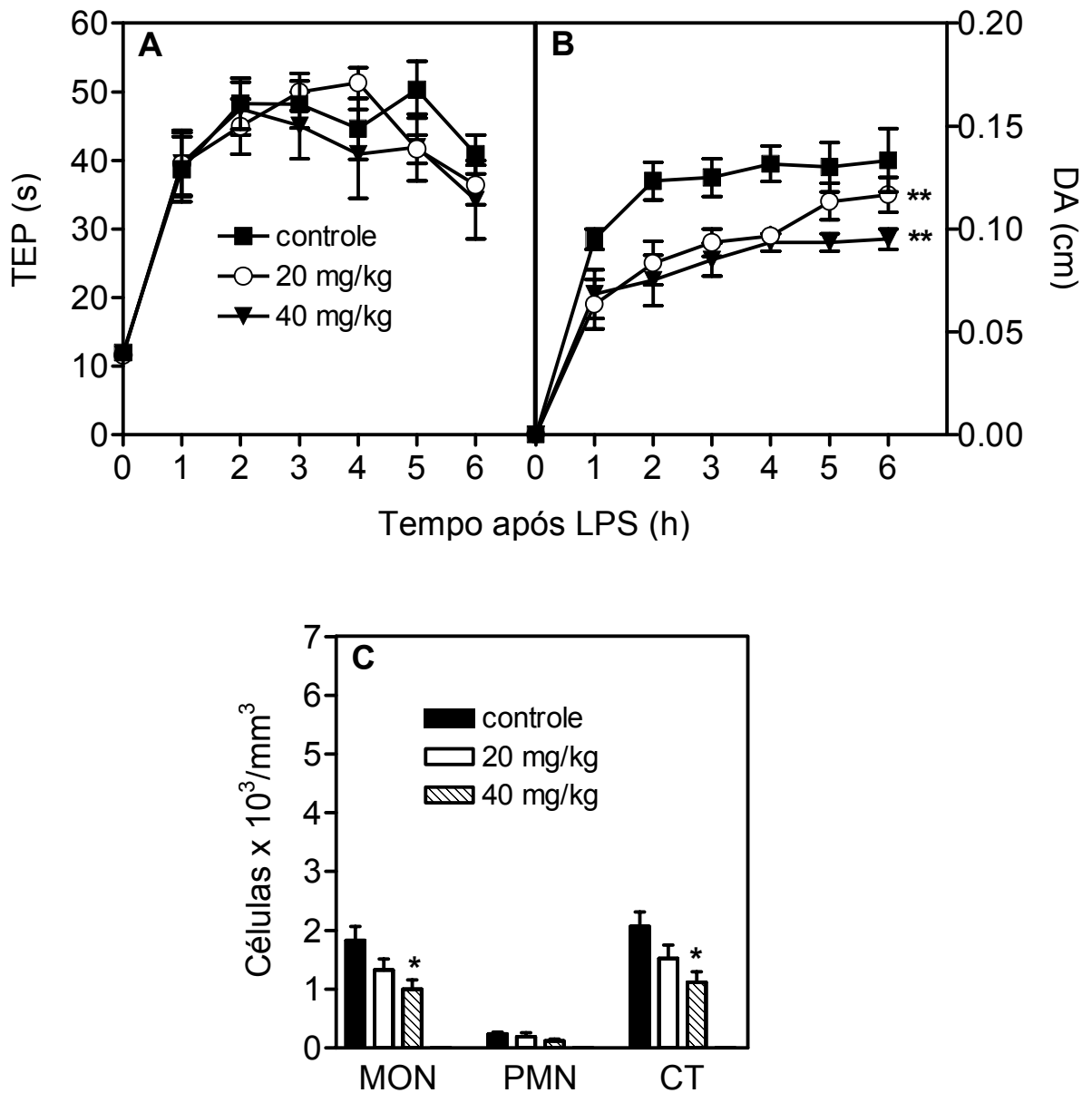


**Figura 9** – Efeito do pré-tratamento com sulfasalazina na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) e na migração celular (C) induzidos pelo LPS. Sulfasalazina (30 ou 100 mg/kg; i.p.) foi administrada 1h antes do LPS (30 ng). O grupo controle recebeu solução fisiológica 0,9 % (0,1 ml / 100 g). A contagem global e diferencial dos leucócitos do fluido sinovial foi realizada 6 h após a injeção de LPS (MON: mononucleares; PMN: polimorfonucleares; CT: leucócitos totais). Cada ponto / barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais. \* e \*\*\* representam a diferença estatisticamente significativa com  $P < 0,05$  e  $0,001$  (A, B: Anova para medidas repetidas seguida do teste de Tukey; C: Anova de uma via seguida do teste de Tukey).

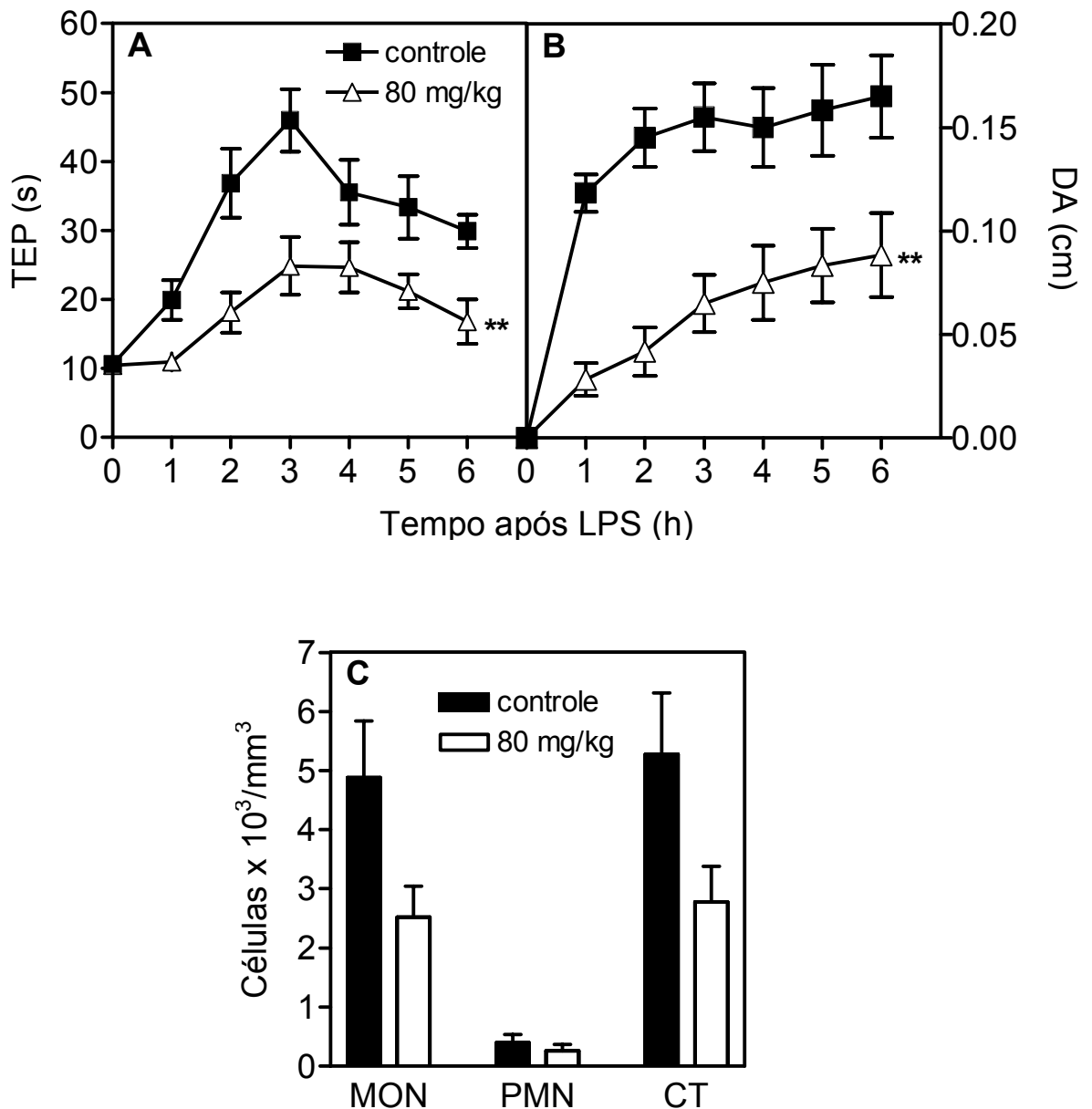
### **4.3 Avaliação da ação de fármacos modificadores de doença (DMARD) na incapacitação e diâmetro articulares e na migração celular induzidos pelo LPS**

#### **4.3.1 Efeito do pré-tratamento com leflunomide na incapacitação e diâmetro articulares e na migração celular induzidos pelo LPS**

Leflunomide (20, 40 ou 80 mg/kg) foi administrado por via oral 1h antes do LPS (30 ng). Apenas a maior dose de leflunomide foi capaz de produzir significativa inibição da incapacitação articular quando comparado ao grupo controle ( $P < 0,01$ ) (TEP controle:  $45,9 \pm 4,5$  s; TEP leflunomide, 80 mg/kg:  $24,8 \pm 4,2$  s) (Figura 11A). Todas as doses de leflunomide inibiram o aumento do diâmetro articular ( $P < 0,01$ ), sendo que a maior dose foi a que produziu o maior efeito antiedematogênico (DA controle:  $0,16 \pm 0,02$  cm; DA leflunomide, 80 mg/kg:  $0,09 \pm 0,02$  cm) (Figura 10B e 11B). Todas as doses de leflunomide também promoveram inibição da migração de MON (MON controle:  $1830 \pm 232$  células/mm<sup>3</sup>; MON leflunomide, 20 mg/kg:  $1326 \pm 183$  células/mm<sup>3</sup>; MON leflunomide, 40 mg/kg:  $994 \pm 163$  células/mm<sup>3</sup>), (MON controle:  $4879 \pm 962$  células/mm<sup>3</sup>; MON leflunomide, 80 mg/kg:  $2519 \pm 525$  células/mm<sup>3</sup>), porém, apenas com a dose de 40 mg/kg é que esta redução foi significativa estatisticamente ( $P < 0,05$ ) (Figura 10C e 11C).



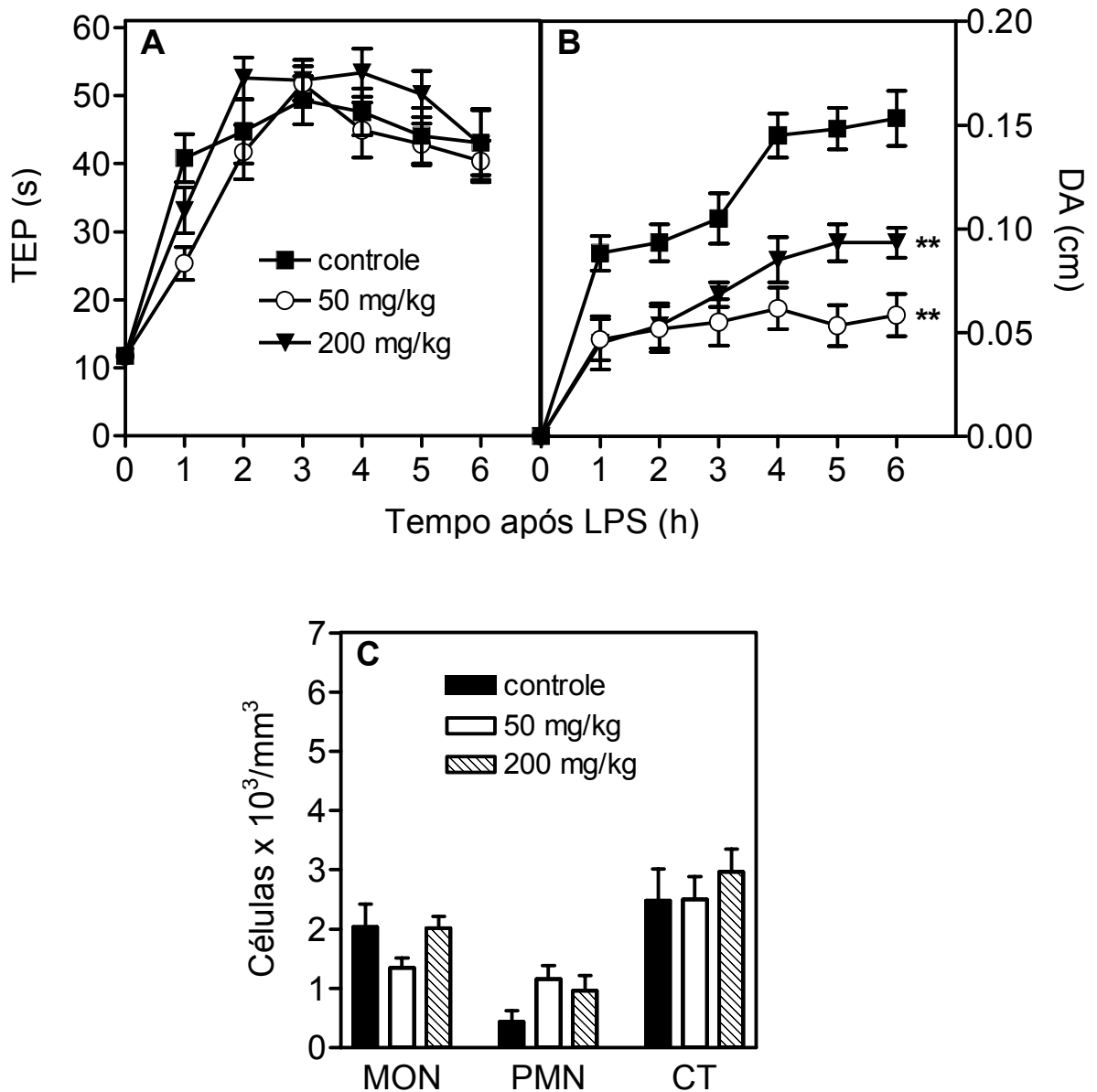
**Figura 10** – Efeito do pré-tratamento com leflunomide na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) e na migração celular (C) induzidos pelo LPS. Leflunomide (20 ou 40 mg/kg; v.o.) foi administrado 1h antes do LPS (30ng). O grupo controle recebeu água destilada (0,1 ml / 100 g). A contagem global e diferencial dos leucócitos do fluido sinovial foi realizada 6 h após a injeção de LPS (MON: mononucleares; PMN: polimorfonucleares; CT: leucócitos totais). Cada ponto / barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais. \* e \*\* representam a diferença estatisticamente significativa com  $P < 0,05$  e  $0,01$  respectivamente (A, B: Anova para medidas repetidas seguida do teste de Tukey; C: Anova de uma via seguida do teste de Tukey).



**Figura 11** – Efeito do pré-tratamento com leflunomide na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) e na migração celular (C) induzidos pelo LPS. Leflunomide (80 mg/kg; v.o.) foi administrado 1h antes do LPS (30 ng). O grupo controle recebeu água destilada (0,1 ml / 100 g). A contagem global e diferencial dos leucócitos do fluido sinovial foi realizada 6 h após a injeção de LPS (MON: mononucleares; PMN: polimorfonucleares; CT: leucócitos totais). Cada ponto / barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais. \*\* representa a diferença estatisticamente significativa com  $P < 0,01$  (A, B: Teste *t* de Student's pareado; C: Teste *t* de Student's não pareado).

#### **4.3.2 Efeito do pré-tratamento com diacereína na incapacitação e diâmetro articulares e na migração celular induzidos pelo LPS**

Diacereína (50 ou 200 mg/kg) foi administrada por via oral 1h antes do LPS (30 ng) e não alterou significativamente a incapacitação articular (TEP controle:  $44,7 \pm 3,4$  s; TEP diacereína 50 mg/kg:  $41,7 \pm 3,9$  s; TEP diacereína 200 mg/kg:  $52,6 \pm 3,0$  s)(Figura 12A) e a migração de MON (MON controle:  $2037 \pm 380$  células/mm<sup>3</sup>; MON diacereína, 50 mg/kg:  $1340 \pm 170$  células/mm<sup>3</sup>; MON 200 mg/kg:  $2011 \pm 205$  células/mm<sup>3</sup>) e de PMN (PMN controle:  $437 \pm 181$  células/mm<sup>3</sup>; PMN diacereína 50 mg/kg:  $1159 \pm 225$  células/mm<sup>3</sup>; PMN diacereína 200 mg/kg:  $955 \pm 263$  células/mm<sup>3</sup>) (Figura 12C) induzidos pelo LPS. Ambas as doses de diacereína inibiram significativamente o aumento do diâmetro articular ( $P < 0,01$ ) (Figura 12B).

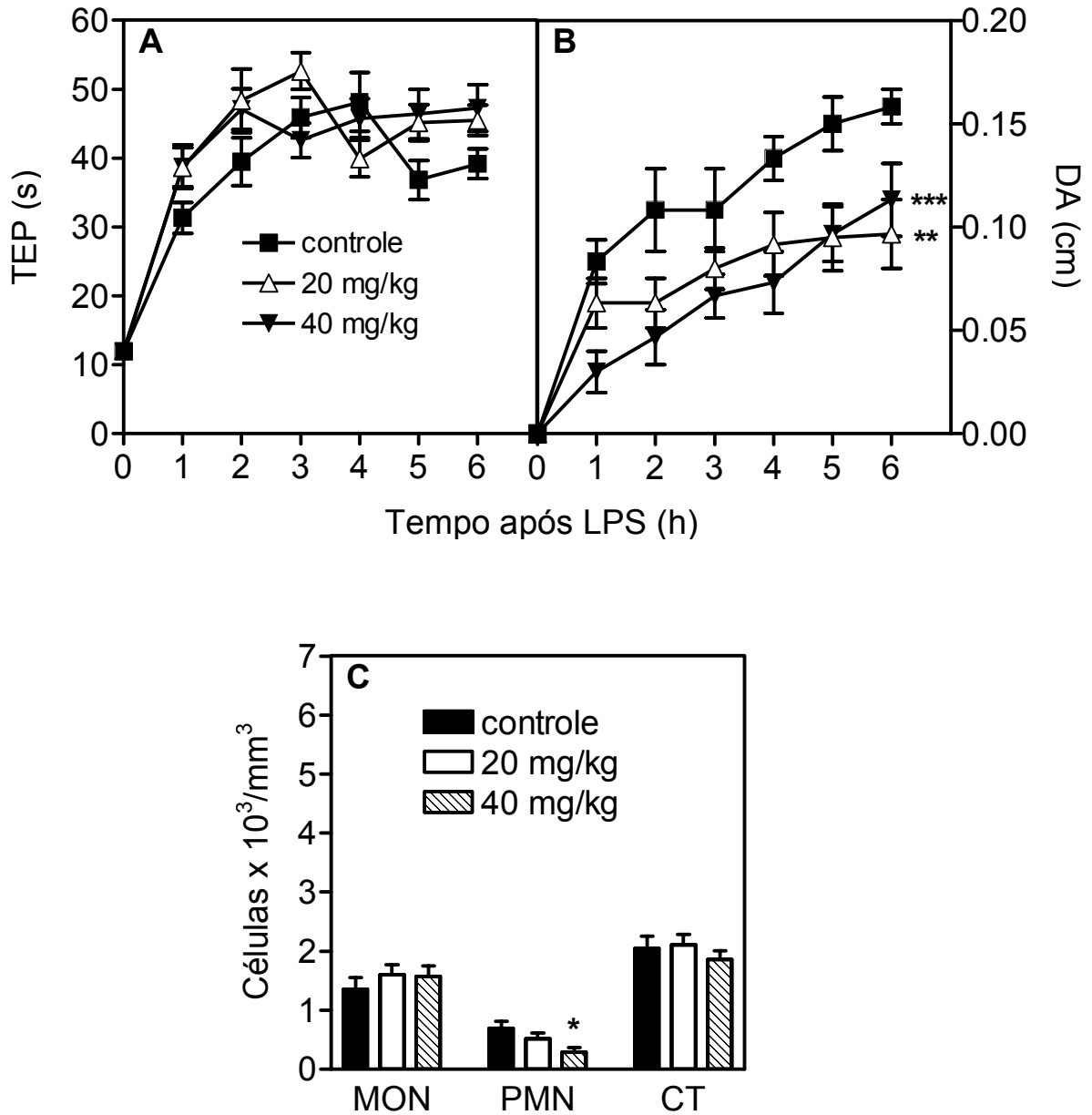


**Figura 12** – Efeito do pré-tratamento com diacereína na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) e na migração celular (C) induzidos pelo LPS. Diacereína (50 ou 200 mg/kg; i.p.) foi administrada 1h antes do LPS (30 ng). O grupo controle recebeu solução fisiológica 0,9 % (0,1 ml / 100 g). A contagem global e diferencial dos leucócitos do fluido sinovial foi realizada 6 h após a injeção de LPS (MON: mononucleares; PMN: polimorfonucleares; CT: leucócitos totais). Cada ponto / barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais. \*\* representa a diferença estatisticamente significativa com  $P < 0,01$  (A, B: Anova para medidas repetidas seguida do teste de Tukey; C: Anova de uma via seguida do teste de Tukey).



### **4.3.3 Efeito do pré-tratamento com pentoxifilina na incapacitação e diâmetro articulares e na migração celular induzidos pelo LPS**

Pentoxifilina (20 ou 40 mg/kg) foi administrada por via intraperitoneal 1h antes do LPS (30 ng). Pentoxifilina não alterou a incapacitação articular (TEP controle:  $39,4 \pm 2,8$  s; TEP pentoxifilina, 20 mg/kg:  $48,3 \pm 4,6$  s; TEP pentoxifilina, 40 mg/kg:  $47,1 \pm 2,9$  s) (Figura 13A) e a migração de MON induzidos pelo LPS (MON controle:  $1349 \pm 204$  células/mm<sup>3</sup>; MON pentoxifilina, 20 mg/kg:  $1598 \pm 172$  células/mm<sup>3</sup>; MON pentoxifilina, 40 mg/kg:  $1570 \pm 176$  células/mm<sup>3</sup>) (Figura 13C). Por outro lado, ambas as doses de pentoxifilina inibiram significativamente o aumento do diâmetro articular (pentoxifilina, 20 mg/kg:  $P < 0,01$ ; 40 mg/kg:  $P < 0,001$ ) (Figura 13B) e, a maior dose de pentoxifilina (40 mg/kg), também inibiu a migração de PMN ( $P < 0,05$ ) (Figura 13C).

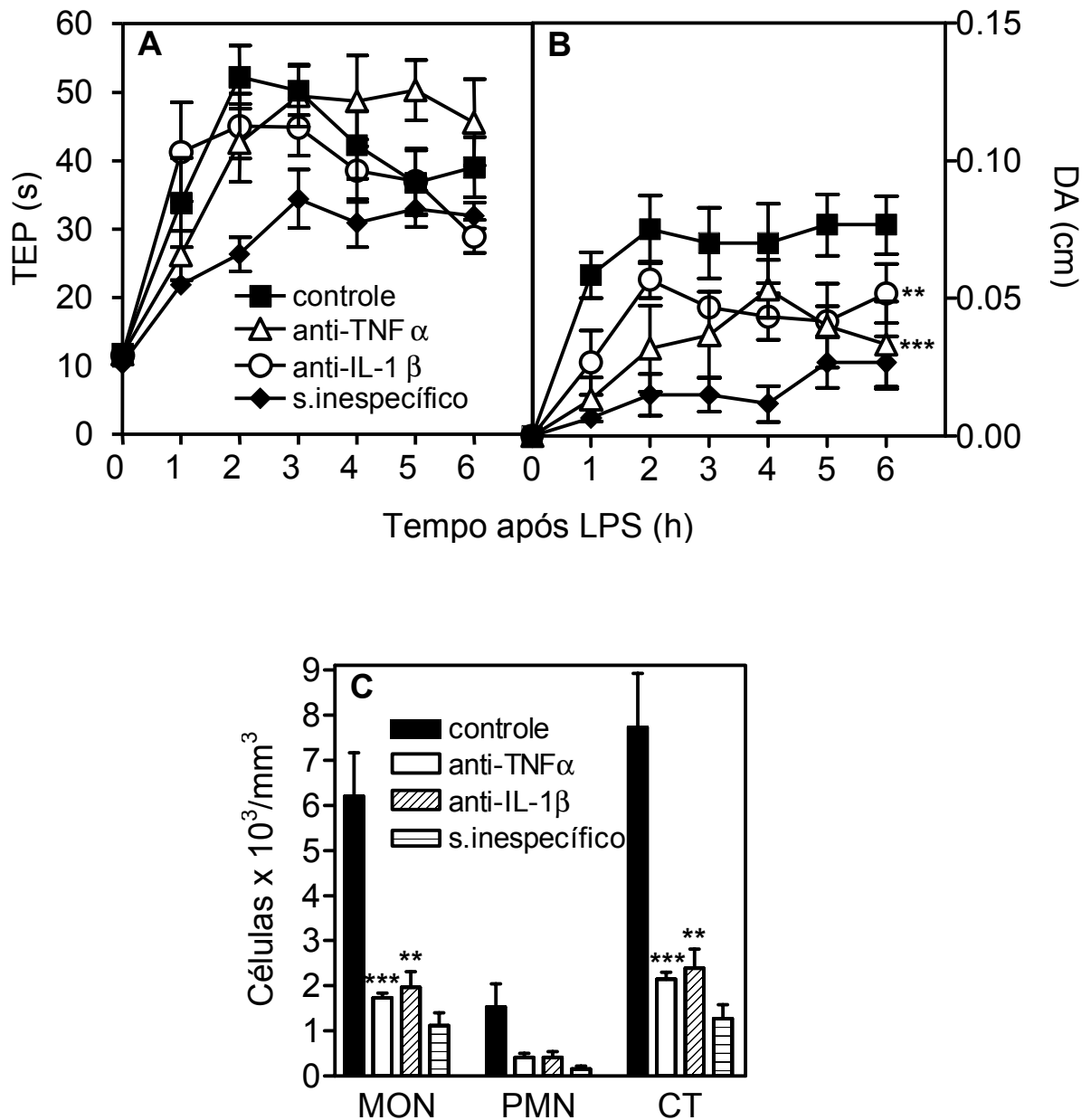


**Figura 13** – Efeito do pré-tratamento com pentoxifilina na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) e na migração celular (C) induzidos pelo LPS. Pentoxifilina (20 ou 40 mg/kg; i.p.) foi administrada 1h antes do LPS (30 ng). O grupo controle recebeu solução fisiológica 0,9 % (0,1 ml / 100 g). A contagem global e diferencial dos leucócitos do fluido sinovial foi realizada 6 h após a injeção de LPS (MON: mononucleares; PMN: polimorfinucleares; CT: leucócitos totais). Cada ponto / barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais. \*, \*\* e \*\*\* representam a diferença estatisticamente significativa com  $P < 0,05$ ; 0,01 e 0,001 respectivamente (A, B: Anova para medidas repetidas seguida do teste de Tukey; C: Anova de uma via seguida do teste de Tukey).

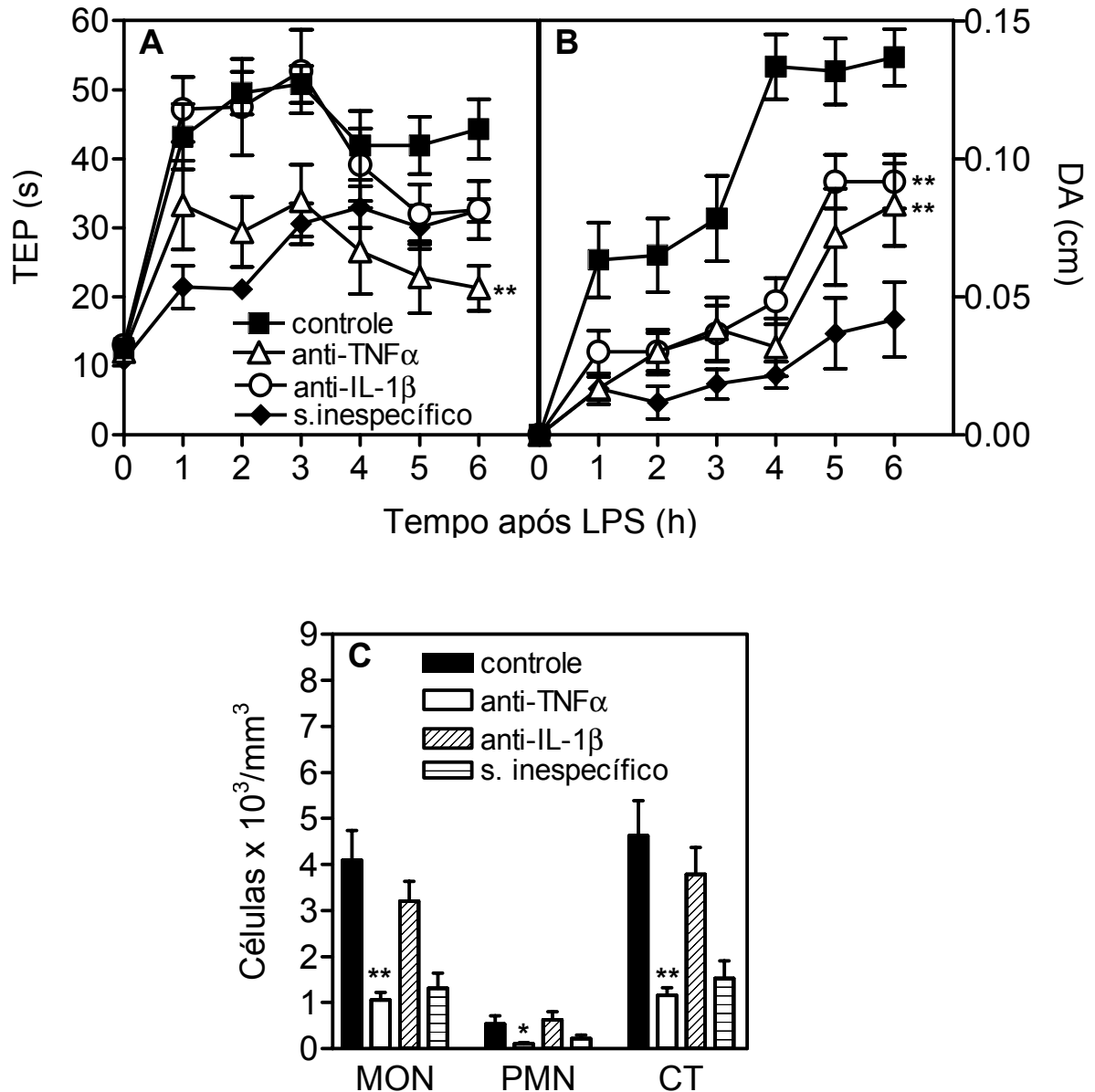
#### **4.4 Avaliação da participação das citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e CINC-1 na incapacitação e diâmetro articulares e na migração celular induzidos pelo LPS**

##### **4.4.1 Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-TNF $\alpha$ ou anti-IL-1 $\beta$ na incapacitação e diâmetro articulares e na migração celular induzidos pelo LPS**

Anticorpos anti-TNF $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$  (20 ou 40  $\mu$ l do soro total) foram administrados por via intraarticular 20 min antes do LPS (30 ng). Anti-TNF $\alpha$  ou anti-IL-1 $\beta$  (20  $\mu$ l) não modificaram a incapacitação articular induzida pelo LPS (TEP controle:  $52,2 \pm 4,6$  s; anti-TNF $\alpha$ :  $42,6 \pm 5,7$  s; anti-IL-1 $\beta$ :  $45,0 \pm 4,7$  s) (Figura 14A). Por outro lado, ambos produziram uma significativa inibição do aumento do diâmetro articular ( $P < 0,01$ ; DA controle:  $0,076 \pm 0,01$  cm; DA anti-TNF $\alpha$ :  $0,033 \pm 0,01$  cm; DA anti-IL-1 $\beta$ :  $0,051 \pm 0,01$  cm) (Figura 14B) e da migração de MON (anti-TNF $\alpha$ :  $P < 0,001$ ; anti-IL-1 $\beta$ :  $P < 0,01$ ) (Figura 14C) quando comparados ao grupo controle (soro inespecífico). Também observou-se uma tendência na inibição da migração de PMN tanto pelo anti-TNF $\alpha$  quanto pela anti-IL-1 $\beta$  ( $P = 0,06$ ), (PMN controle:  $1526 \pm 518$  células/mm<sup>3</sup>; PMN anti-TNF $\alpha$ :  $416 \pm 88$  células/mm<sup>3</sup>; PMN anti-IL-1 $\beta$ :  $414 \pm 125$  células/mm<sup>3</sup>) (Figura 14C). Anticorpos anti-TNF $\alpha$  ou anti-IL-1 $\beta$  (40  $\mu$ l) inibiram o aumento do diâmetro articular ( $P < 0,01$ ; DA controle:  $0,136 \pm 0,01$  cm; DA anti-TNF $\alpha$ :  $0,083 \pm 0,01$  cm; DA anti-IL-1 $\beta$ :  $0,091 \pm 0,01$  cm) (Figura 15B) mas apenas anti-TNF $\alpha$  inibiu a incapacitação ( $P < 0,01$ ; TEP control:  $44,3 \pm 4,3$  s; TEP anti-TNF $\alpha$ :  $21,1 \pm 3,3$  s) (Figura 15A), a migração de MON ( $P < 0,01$ ; MON controle:  $4089 \pm 655$  cél/mm<sup>3</sup>; MON anti-TNF $\alpha$ :  $1055 \pm 162$  cél/mm<sup>3</sup>) ( e de PMN ( $P < 0,05$ ; PMN controle:  $535 \pm 178$  cél/mm<sup>3</sup>; PMN anti-TNF $\alpha$ :  $98 \pm 23$  cél/mm<sup>3</sup>) (Figura 15C). Curiosamente, nesta dose alta, anti-IL-1 $\beta$  perdeu seu efeito inibitório sobre a migração celular. O soro inespecífico (20 ou 40  $\mu$ l; i.art.) injetado 3 dias após a sensibilização da articulação com carragenina e na ausência do LPS produziu discreto aumento da incapacitação e diâmetro articulares. Ambos os volumes injetados (20 ou 40  $\mu$ l), produziram efeitos semelhantes. Este teste foi realizado posteriormente aos procedimentos experimentais em que se testou os anticorpos anti-citocinas (anti-TNF $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$  e anti-CINC-1) e os resultados obtidos são expressos nas figuras 14A, B, 15A, B, 16A, B, e 17A, B.



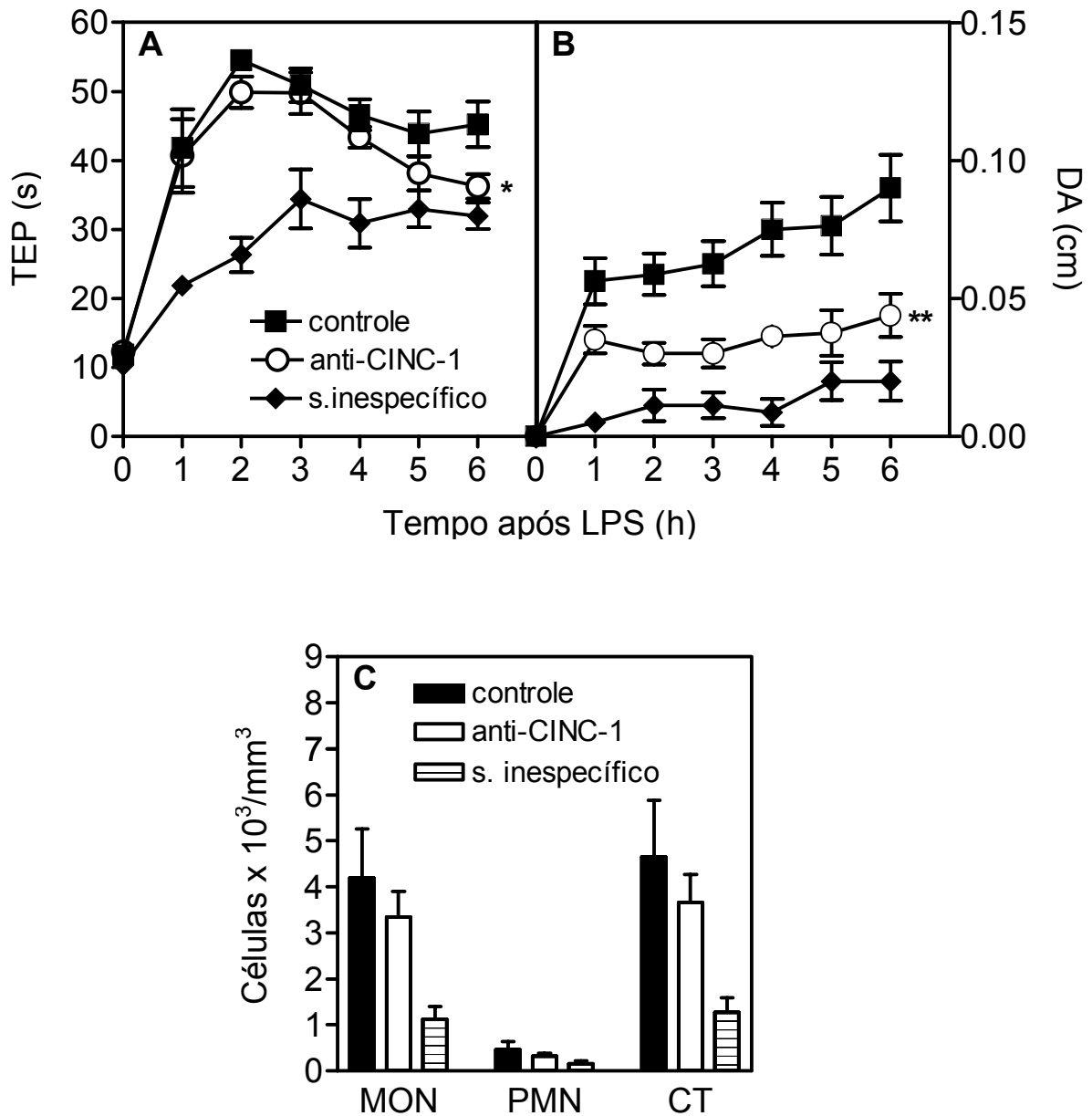
**Figura 14** – Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-IL-1 $\beta$  e anti-TNF $\alpha$  na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) e na migração celular (C) induzidos pelo LPS. Anticorpos anti-IL-1 $\beta$ , anti-TNF $\alpha$  (20  $\mu$ l do soro total; i.art.) ou soro inespecífico (controle; 20  $\mu$ l; i.art.) foram administrados 20 min antes do LPS (30 ng). Um grupo recebeu apenas soro inespecífico (s.inespecífico; 20  $\mu$ l; i.art.) e não recebeu LPS. A contagem global e diferencial dos leucócitos do fluido sinovial foi realizada 6 h após a injeção de LPS (MON: mononucleares; PMN: polimorfonucleares; CT: leucócitos totais). Cada ponto / barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais. \*\* e \*\*\* representam a diferença estatisticamente significativa com  $P < 0,01$  e  $0,001$  respectivamente (A, B: Teste  $t$  de Student's pareado; C: Teste  $t$  de Student's não pareado).



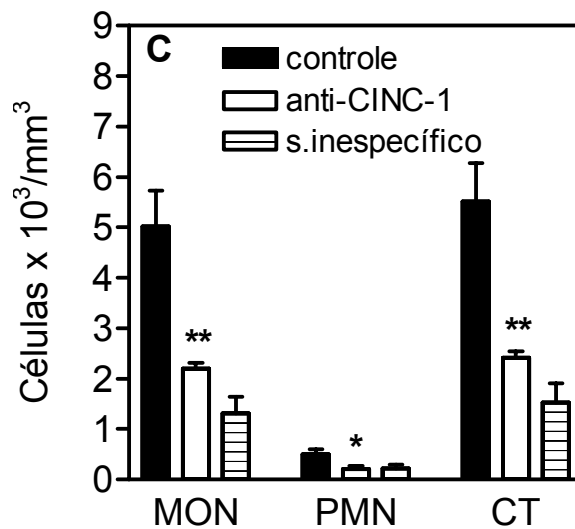
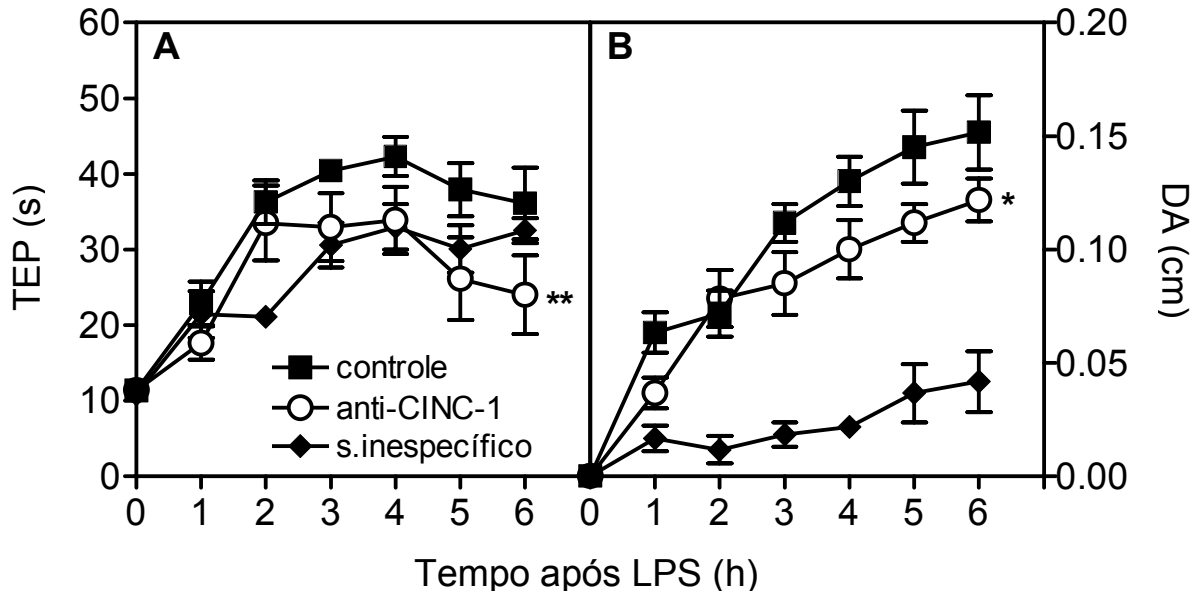
**Figura 15** – Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-IL-1 $\beta$  e anti-TNF $\alpha$  na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) e na migração celular (C) induzidos pelo LPS. Anticorpos anti-IL-1 $\beta$ , anti-TNF $\alpha$  (40  $\mu$ l do soro total; i.art.) ou soro inespecífico (controle; 40  $\mu$ l; i.art.) foram administrados 20 min antes do LPS (30 ng). Um grupo recebeu apenas soro inespecífico (s.inespecífico; 40  $\mu$ l; i.art.) e não recebeu LPS. A contagem global e diferencial dos leucócitos do fluido sinovial foi realizada 6 h após a injeção de LPS (MON: mononucleares; PMN: polimorfonucleares; CT: leucócitos totais). Cada ponto / barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais. \* e \*\* representam a diferença estatisticamente significativa com  $P < 0,05$  e  $0,01$  respectivamente (A, B: Teste *t* de Student's pareado; C: Teste *t* de Student's não pareado).

#### 4.4.2 Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-CINC-1 na incapacitação e diâmetro articulares e na migração celular induzidos pelo LPS

Anticorpos anti-CINC-1 (20 ou 40  $\mu$ l do soro total) foram administrados por via intraarticular 20 min antes do LPS (30ng). Anti-CINC-1 (20  $\mu$ l) produziu pequena, mas significativa, inibição da incapacitação ( $P < 0,05$ ; TEP controle:  $45,2 \pm 3,3$  s; TEP anti-CINC-1:  $36,2 \pm 1,8$  s,) (Figura 16A) e uma proeminente inibição do aumento do diâmetro articular ( $P < 0,01$ ; DA controle:  $0,120 \pm 0,01$  cm; DA anti-CINC-1:  $0,058 \pm 0,01$  cm) (Figura 16B) induzidos pelo LPS. Nesta dose, anti-CINC-1 não alterou a migração de MON (MON controle:  $4194 \pm 1065$  células/ $\text{mm}^3$ ; MON anti-CINC-1:  $3340 \pm 558$  células/ $\text{mm}^3$ ) e nem de PMN (PMN controle:  $455 \pm 180$  células/ $\text{mm}^3$ ; PMN anti-CINC-1:  $317 \pm 64$  células/ $\text{mm}^3$ ) (Figura 16C). Anti-CINC-1 (40  $\mu$ l) promoveu maior inibição da incapacitação ( $P < 0,01$ ) (Figura 17A) e menor inibição do aumento do articular ( $P < 0,05$ ) (Figura 17B) quando comparado com 20  $\mu$ l, embora tenha se observado uma incapacitação articular de menor intensidade (TEP controle do teste com 20  $\mu$ l:  $45,2 \pm 3,3$  s; TEP controle do teste com 40  $\mu$ l:  $36,0 \pm 4,8$  s). Nesta dose maior, anti-CINC-1 também inibiu a migração de MON ( $P < 0,01$ ; MON controle:  $5022 \pm 705$  cél/ $\text{mm}^3$ ; MON anti-CINC-1:  $2201 \pm 110$  cél/ $\text{mm}^3$ ) e de PMN ( $P < 0,05$ ; PMN controle:  $495 \pm 105$  cél/ $\text{mm}^3$ ; PMN anti-CINC-1:  $207 \pm 59$  cél/ $\text{mm}^3$ ) quando comparado com o controle (soro inespecífico) (Figura 17C).



**Figura 16** – Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-CINC-1 na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) e na migração celular (C) induzidos pelo LPS. Anticorpos anti-CINC-1 (20  $\mu$ l do soro total; i.art.) ou soro inespecífico (controle; 20  $\mu$ l; i.art.) foram administrados 20 min antes do LPS (30 ng). Um grupo recebeu apenas soro inespecífico (s.inespecífico; 20  $\mu$ l; i.art.) e não recebeu LPS. A contagem global e diferencial dos leucócitos do fluido sinovial foi realizada 6 h após a injeção de LPS (MON: mononucleares; PMN: polimorfonucleares; CT: leucócitos totais). Cada ponto / barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais. \* e \*\* representam a diferença estatisticamente significativa com  $P < 0,05$  e  $0,01$  respectivamente (A, B: Teste *t* de Student's pareado; C: Teste *t* de Student's não pareado).



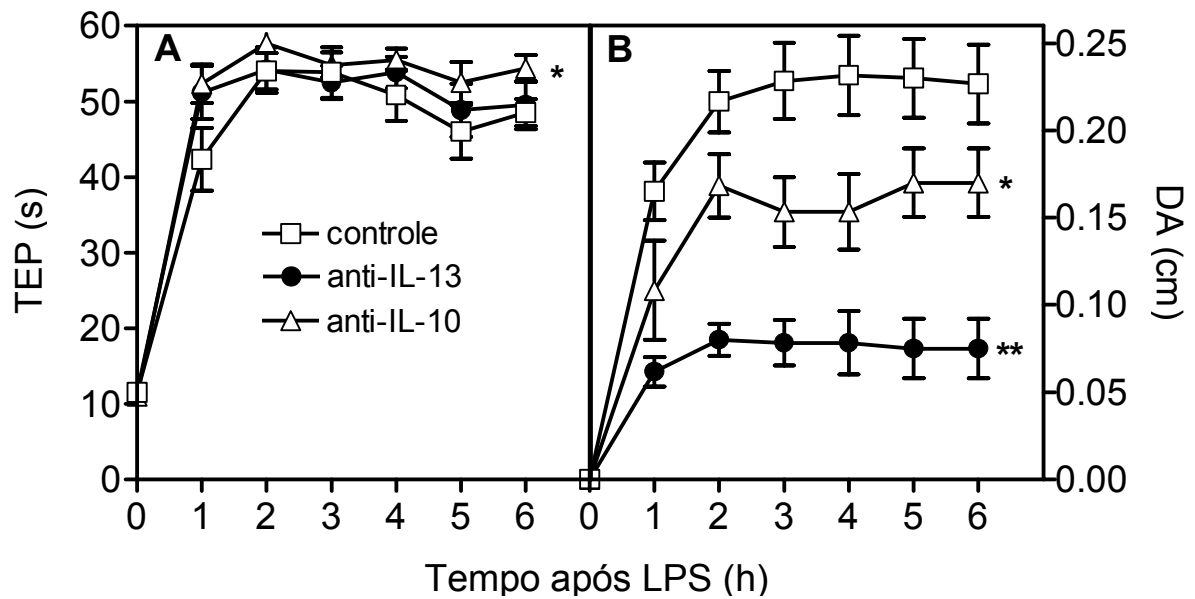
**Figura 17** – Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-CINC-1 na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) e na migração celular (C) induzidos pelo LPS. Anticorpos anti-CINC-1 (40  $\mu$ l do soro total; i.art.) ou soro inespecífico (controle; 40  $\mu$ l; i.art.) foram administrados 20 min antes do LPS (30 ng). Um grupo recebeu apenas soro inespecífico (s.inespecífico; 40  $\mu$ l; i.art.) e não recebeu LPS. A contagem global e diferencial dos leucócitos do fluido sinovial foi realizada 6 h após a injeção de LPS (MON: mononucleares; PMN: polimorfonucleares; CT: leucócitos totais). Cada ponto / barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais. \* e \*\* representam a diferença estatisticamente significativa com  $P < 0,05$  e  $0,01$  respectivamente (A, B: Teste *t* de Student's pareado; C: Teste *t* de Student's não pareado).



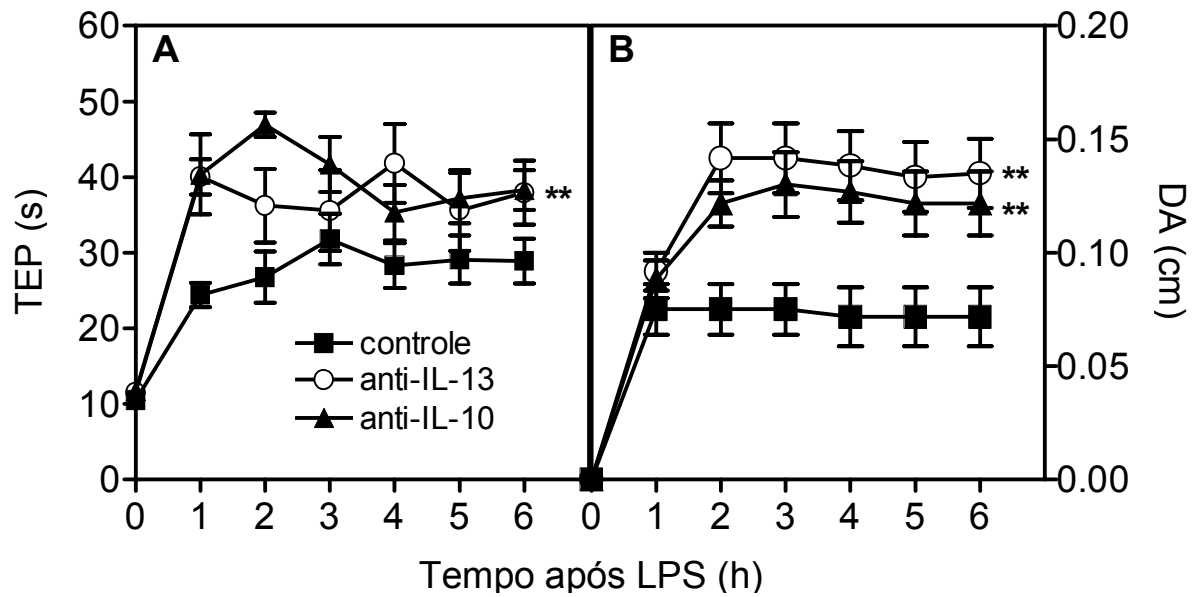
## **4.5 Avaliação da participação das citocinas antiinflamatórias IL-10, IL-13 e IL-4 na incapacitação e diâmetro articulares e na migração celular induzidos pelo LPS**

### **4.5.1 Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-IL-10 ou anti-IL-13 na incapacitação e diâmetro articulares e na migração celular induzidos pelo LPS**

Anticorpos anti-IL-10 e anti-IL-13 (20 µl do soro total) foram administrados por via intraarticular 20 min antes do LPS (1,0 ou 0,03 ng). LPS (1,0 ng) produziu incapacitação e edema articular de maior intensidade que LPS (0,03 ng) e que se desenvolveram de maneira rápida atingindo o valor máximo já nas primeiras horas de teste (TEP controle 1,0 ng:  $54,0 \pm 2,4$  s; TEP controle 0,03 ng:  $26,7 \pm 3,4$  s; DA controle 1,0 ng:  $0,23 \pm 0,02$  cm; DA controle 0,03 ng:  $0,07 \pm 0,01$  cm) (Figura 18A, B e 19A, B). Nesta condição, anti-IL-10 causou aumento da incapacitação articular, quando comparado ao grupo controle ( $P < 0,05$ ), enquanto anti-IL-13 não apresentou nenhuma atividade sobre este parâmetro (TEP controle:  $54,0 \pm 2,4$  s; TEP anti-IL-13:  $54,2 \pm 2,9$  s) (Figura 18A). Tanto anti-IL-10 quanto anti-IL-13 inibiram significativamente o aumento do diâmetro articular ( $P < 0,05$  e  $P < 0,001$  respectivamente) (Figura 18B). Quando anti-IL-10 e anti-IL-13 foram administradas 20 min antes do LPS (0,03 ng), ambas causaram aumento da incapacitação ( $P < 0,01$ ) (Figura 19A) e do diâmetro articular (Figura 19B) induzidos pelo LPS ( $P < 0,01$  e  $P < 0,001$  respectivamente).



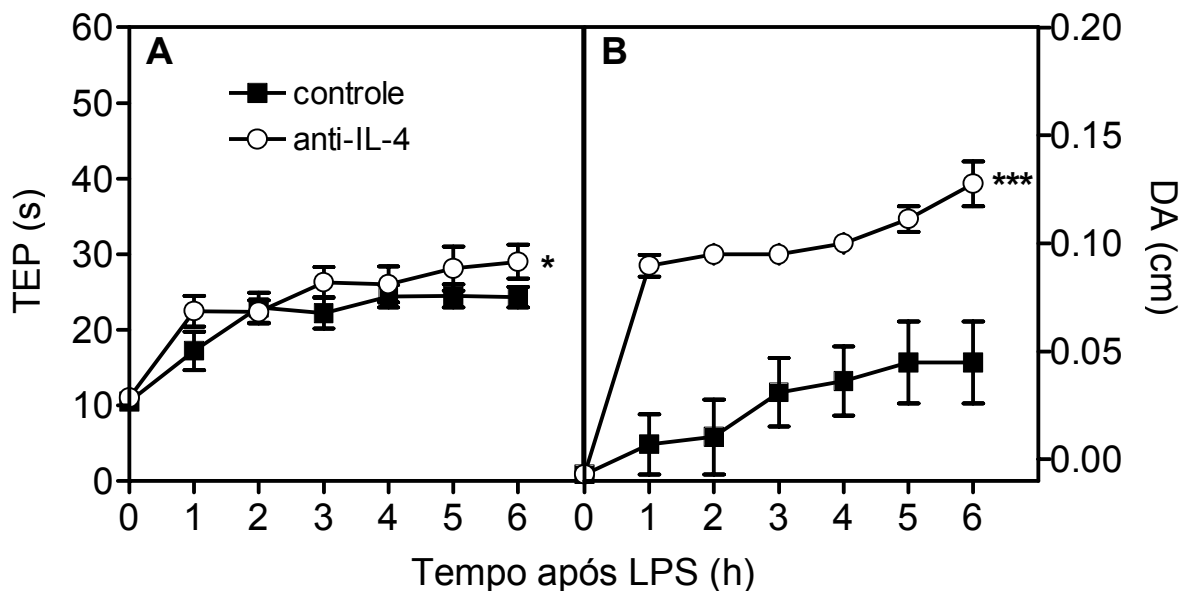
**Figura 18** – Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-IL-10 e anti-IL-13 na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) induzidos pelo LPS. Anti-IL-10 e anti-IL-13 (20  $\mu$ l do soro total; i.art.) foram administrados 20 min antes do LPS (1 ng). O grupo controle recebeu soro inespecífico (20  $\mu$ l; i.art.). Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais. \* e \*\* representam a diferença estatisticamente significativa com  $P < 0,05$  e  $0,01$  respectivamente (A, B: Teste  $t$  de Student's pareado).



**Figura 19** – Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-IL-10 e anti-IL-13 na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) induzidos pelo LPS. Anti-IL-10 e anti-IL-13 (20  $\mu$ l do soro total; i.art.) foram administrados 20 min antes do LPS (0,03 ng). O grupo controle recebeu soro inespecífico (20  $\mu$ l; i.art.). Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais. \*\* representa a diferença estatisticamente significativa com  $P < 0,01$  respectivamente (A, B: Teste  $t$  de Student's pareado).

#### 4.5.2 Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-IL-4 na incapacitação e diâmetro articulares e na migração celular induzidos pelo LPS

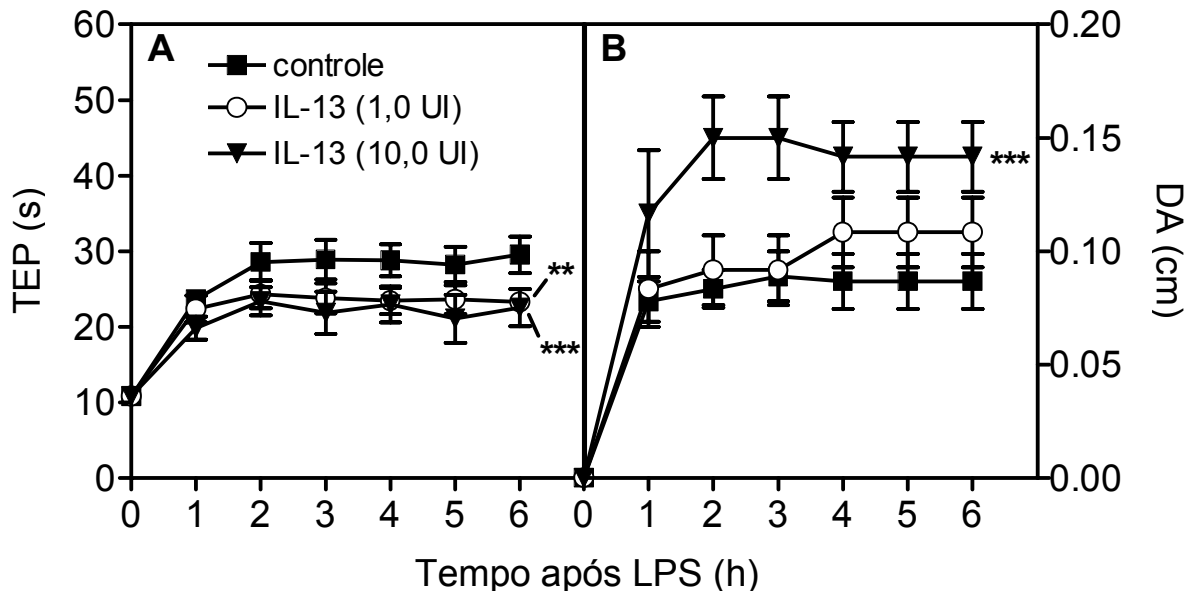
Anticorpos anti-IL-4 (20  $\mu$ l do soro total) foram administrados 20 min antes do LPS (0,03 ng). Anti-IL-4 promoveu aumento da incapacitação articular ( $P < 0,05$ ) (Figura 20A) acompanhado de significativo aumento do diâmetro articular ( $P < 0,001$ ) (DA controle:  $0,05 \pm 0,01$ ; DA anti-IL-4:  $0,13 \pm 0,01$ ) (Figura 20B).



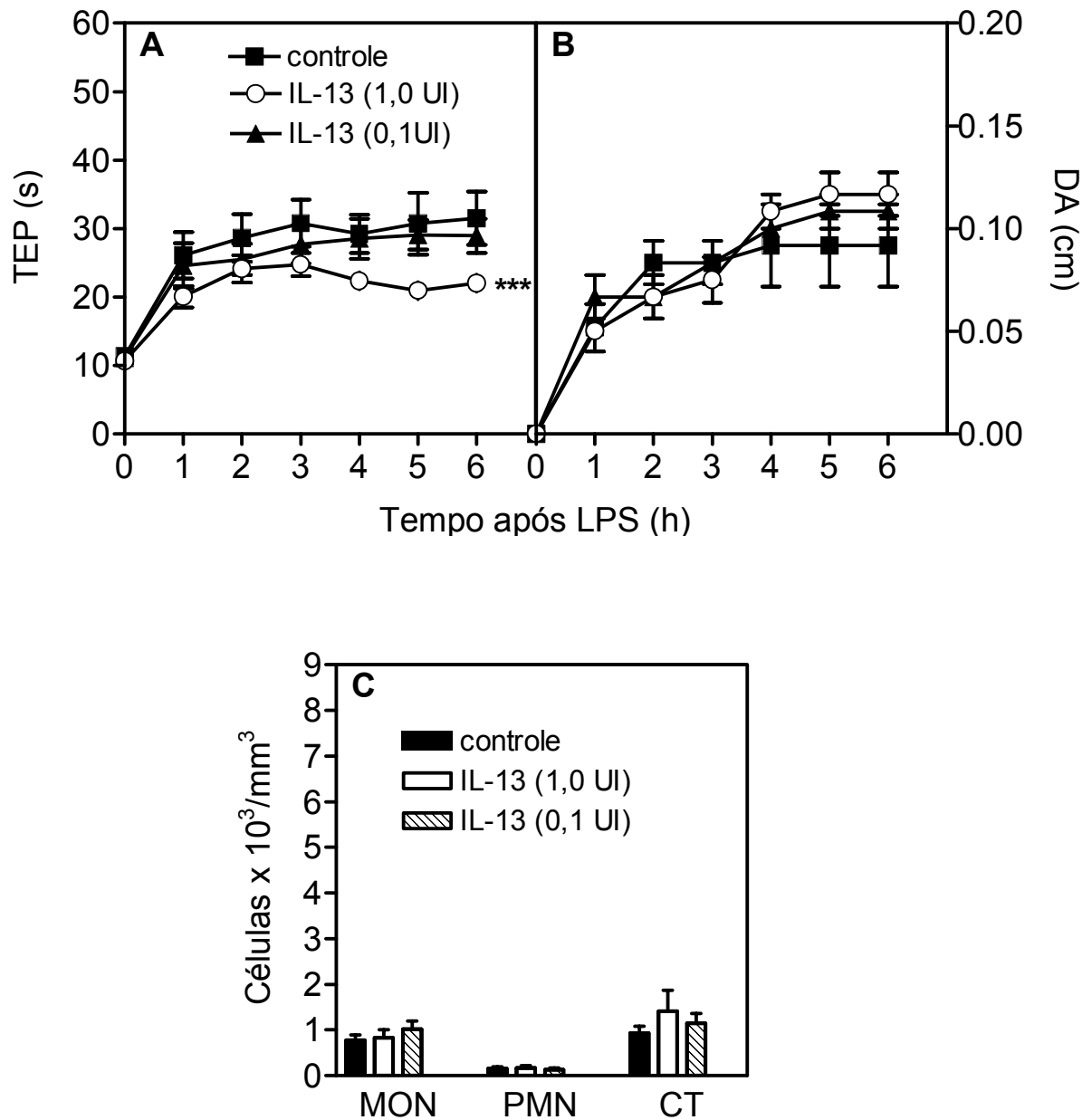
**Figura 20** – Efeito do pré-tratamento com anticorpos anti-IL-4 na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) induzidos pelo LPS. Anti-IL-4 (20  $\mu$ l do soro total; i.art.) foi administrado 20 min antes do LPS (0,03 ng). O grupo controle recebeu soro inespecífico (20  $\mu$ l; i.art.). Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais. \* e \*\* representam a diferença estatisticamente significativa com  $P < 0,05$  e  $0,01$  respectivamente (A, B: Teste *t* de Student's pareado).

#### **4.5.3 Efeito do pré-tratamento com IL-13 na incapacitação e diâmetro articulares e na migração celular induzidos pelo LPS**

A citocina IL-13 (0,1; 1,0 ou 10,0 UI; 20  $\mu$ l) foi administrada por via intraarticular, 20 min antes do LPS (0,03 ng). IL-13 (1,0 UI) inibiu significativamente a incapacitação articular ( $P < 0,001$ ) (Figura 21A e 22A). Por outro lado, promoveu aumento do diâmetro articular a partir da quarta hora de observação, porém não houve diferença estatística em relação ao controle [DA controle:  $0,08 \pm 0,01$  cm; DA IL-13 (1,0 UI):  $0,11 \pm 0,02$  cm] (Figura 21B) e [DA controle:  $0,09 \pm 0,02$  cm; DA IL-13 (1,0 UI):  $0,12 \pm 0,01$  cm] (Figura 22B). IL-13 (10 UI) inibiu significativamente a incapacitação articular ( $P < 0,001$ ) (Figura 21A) e produziu aumento significativo do diâmetro articular ( $P < 0,001$ ) (Figura 21B). IL-13 (0,1 UI) não alterou a incapacitação (Figura 22A) mas promoveu aumento do diâmetro articular a partir da quarta hora de avaliação, porém, a diferença não foi estatisticamente significativa em relação ao controle [DA controle:  $0,09 \pm 0,02$  cm; DA IL-13 (0,1 UI):  $0,11 \pm 0,01$  cm] (Figura 22B). Avaliou-se o efeito apenas das doses de 0,1 e 1,0 UI de IL-13 na migração celular e não houve alteração estatisticamente significativa deste parâmetro [MON controle:  $773 \pm 110$  células/mm<sup>3</sup>; MON IL-13 (0,1 UI):  $826 \pm 174$  células/mm<sup>3</sup>; PMN controle:  $152 \pm 44$  células/mm<sup>3</sup>; PMN IL-13 (0,1 UI):  $124 \pm 42$  células/mm<sup>3</sup>] (Figura 22C).



**Figura 21** – Efeito do pré-tratamento com IL-13 na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) induzidos pelo LPS. IL-13 (1,0 ou 10,0 UI / 20  $\mu$ l; i.art.) foi administrada 20 min antes do LPS (0,03 ng). O grupo controle recebeu soro inespecífico (20  $\mu$ l; i.art.). Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais. \*\* e \*\*\* representam a diferença estatisticamente significativa com  $P < 0,01$  e  $0,001$  respectivamente (A, B: Teste  $t$  de Student's pareado).



**Figura 22** – Efeito do pré-tratamento com IL-13 na incapacitação (A) e diâmetro articulares (B) e na migração celular (C) induzidos pelo LPS. IL-13 (0,1; 1,0 ou 10,0 UI / 20  $\mu$ l; i.art.) foi administrada 20 min antes do LPS (0,03 ng). O grupo controle recebeu soro inespecífico (20  $\mu$ l; i.art.). A contagem global e diferencial dos leucócitos do fluido sinovial foi realizada 6 h após a injeção de LPS (MON: mononucleares; PMN: polimorfonucleares; CT: leucócitos totais). Cada ponto / barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 6 animais. \*\*\* representa a diferença estatisticamente significativa com  $P < 0,001$  (A, B: Teste *t* de Student's pareado; C: Teste *t* de Student's não pareado).

## 5 DISCUSSÃO

A artrite inclui um grupo de doenças inflamatórias crônicas que acometem desde crianças até adultos e idosos e estão associadas com considerável morbidade e mortalidade. Desta forma, o alívio dos principais sintomas (dor e o edema articular), a detenção da progressão da doença, o restabelecimento da qualidade de vida e a redução da invalidez, aliados com uma baixa incidência de efeitos colaterais da medicação, são fatores extremamente relevantes na escolha da farmacoterapia mais adequada para tratar este tipo de patologia.

A descoberta do envolvimento das citocinas na patofisiologia da artrite tem permitido que os fármacos modificadores da doença (DMARDs), cujo mecanismo de ação inclui a modulação destes mediadores, sejam cada vez mais incorporados à nova terapia antiartrítica como alternativa substitutiva aos fármacos pioneiros (antiinflamatórios não esteroidais e glicocorticóides). Além de aliviarem os sintomas, estes fármacos são capazes de reduzir ou até impedir a progressão da artrite, tornando-os uma terapia bastante atrativa. Porém, muitos pacientes submetidos ao tratamento com DMARDs não apresentam uma resposta satisfatória ou a resposta declina com o tempo. Estes fatores, associados à presença de efeitos colaterais importantes, têm gerado questionamentos sobre a real eficácia e as potenciais vantagens de se adotar este tipo de terapia. Além disso, o surgimento de fármacos mais modernos que atuam de maneira direta e específica sobre as citocinas, apresentam início de ação rápido e poucos efeitos adversos, também tem contribuído para uma mudança no padrão de tratamento da artrite. O presente estudo possibilitou a investigação dos efeitos de alguns DMARDs, potencialmente moduladores de citocinas importantes na artrite reativa, em comparação com a terapia padrão (AINEs e glicocorticóides) e com as novas terapias anti-citocinas utilizando um modelo em que a artrite é induzida por LPS em articulações previamente sensibilizadas com carragenina, em ratos.

Os AINEs são, freqüentemente, a terapia analgésica e antiinflamatória de escolha para o tratamento tanto da artrite reumatóide (Wienecke e Gotzsche, 2004) quanto da artrite reativa (Palazzi et al., 2004). Crianças com doenças reumáticas ou artrite juvenil crônica, geralmente toleram bem os AINEs. Nestas doenças, a indometacina e o diclofenaco promovem alívio da dor, do edema e enrijecimento articular e também restabelecem a capacidade funcional (Minisola et al., 1990; Hollingworth, 1993). Estudos em pacientes com osteoartrite, mostram que os AINEs



podem reduzir, em curto prazo e de maneira rápida, a dor nas articulações. No entanto, o uso destes fármacos, a longo prazo, deve ser limitado devido aos sérios efeitos adversos (Dougados, 2001; Bjordal et al., 2004). Testes clínicos mostram que o diclofenaco é tão efetivo quanto a indometacina no restabelecimento da função e na redução da dor em pacientes com artrite reumatóide, osteoartrite e espondilite anquilosante (Brogden et al., 1980; Small, 1989; Case et al., 2003). Porém, a indometacina apresenta maior toxicidade (Hollingworth, 1993; Leeb et al., 2004). O efeito analgésico obtido com o diclofenaco tem início rápido e duradouro e pode ser considerado como um dos poucos AINEs de primeira escolha no tratamento de condições inflamatórias e de dor aguda e crônica (Todd e Sorkin, 1988).

Além de atuarem inibindo a ciclooxigenase e, desta forma, promoverem um alívio sintomático eficaz, os AINEs podem modular o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares ou mononucleares na sinóvia inflamada. A inibição da infiltração de leucócitos pelos AINEs, *in vivo*, ocorre com doses maiores que as requeridas para a inibição local de prostaglandinas. Este dado está de acordo com o fato de que altas doses de AINEs são necessárias para o tratamento de artrite reumatóide e de outras doenças articulares, doses estas muito maiores que as requeridas para promover uma simples analgesia (Parnham, 1999). Em modelos animais distintos do utilizado neste trabalho, como o de artrite induzida por adjuvante de Freund, em ratos, a indometacina (2 mg/kg) inibe completamente o desenvolvimento da hiperalgesia e do edema articular (Tatsuo et al., 1994). Em outro estudo utilizando este mesmo modelo, em coelhos, a indometacina também reduz o edema articular, porém, induz aumento da perda de proteoglicanas da cartilagem articular e do número de linfócitos na sinóvia inflamada sugerindo que, os benefícios sintomáticos da indometacina e drogas relacionadas (AINEs) na artrite inflamatória, podem ser obtidos às custas de efeitos adversos significantes nos tecidos articulares (Pettipher et al., 1989). Por outro lado, também no modelo de artrite induzida por adjuvante, o diclofenaco reduz a concentração de células polimorfonucleares no fluido sinovial sem alterar a concentração de mononucleares (Lopez-Armanda et al., 2002). Estes dados sugerem que os AINEs podem ter efeitos diferenciados na migração de polimorfonucleares e mononucleares para a articulação.

Estudos recentes, em pacientes com espondilite anquilosante, têm mostrado que os AINEs, quando administrados continuamente em uma dose fixa, além de alterarem a sintomatologia, são capazes de prevenir a progressão dos danos estruturais ocasionados pela doença (Liu et al., 2004).

Os resultados do presente estudo confirmam os efeitos antinociceptivo e antiedematogênico da indometacina e do diclofenaco já evidenciados em modelos animais, distintos do utilizado neste trabalho e, em testes clínicos. Ambos os fármacos inibiram a nocicepção e o edema articulares induzidos pelo LPS, no pré e no pós-tratamento, sendo que, no pós-tratamento a eficácia de inibição foi maior. Estes achados sugerem que estes fármacos podem ser efetivos tanto no tratamento sintomático quanto no tratamento a longo prazo de artropatias como a artrite reativa.

Além do alívio sintomático, a maior dose de indometacina e de diclofenaco, testada como pós-tratamento, foi capaz de reduzir a migração de células mononucleares para o fluido sinovial, ressaltando a possível eficácia destes fármacos na redução dos danos articulares gerados pela inflamação que, neste caso, parece ser mediada principalmente pela migração de mononucleares. Além disso, a dose requerida para a inibição da migração celular foi maior que a dose necessária para se obter o efeito antinociceptivo e antiedematogênico máximo, o que poderia explicar, em parte, o porque da necessidade de altas doses de AINEs para tratar de maneira eficaz as doenças articulares (Parnham, 1999). Por outro lado, no pré-tratamento, indometacina e diclofenaco não inibiram a migração celular, pelo contrário, aumentaram de maneira sutil, porém não significativa estatisticamente. Isso demonstra que a inibição da nocicepção e do edema articular por esta classe de fármacos, no pré-tratamento, pode não estar necessariamente associada com a inibição da migração celular para o foco inflamatório. A falha na inibição da migração celular pela indometacina e diclofenaco no pré-tratamento pode ser devido ao fato de que o pré-tratamento permita que as células ou vias de sinalização se reorganizem, frente ao estímulo com LPS, de modo a anular ou compensar uma possível inibição da migração celular. Estes achados chamam a atenção para a real eficácia destes fármacos na artrite pois, embora eles suprimam alguns sintomas, podem estar simultaneamente mascarando um possível agravamento da doença, uma vez que as células mononucleares produzem grande quantidade de citocinas, potencialmente destrutivas para as estruturas articulares. Além disso, é importante salientar que muitos modelos animais que mostram a eficácia destes fármacos, são modelos onde ocorre uma migração predominantemente polimorfonuclear, desta forma, pode-se estar observando o efeito da indometacina e do diclofenaco apenas sobre estas células. Ao contrário, o modelo utilizado neste estudo, permite avaliar a ação destes fármacos tanto na migração de células mononucleares quanto polimorfonucleares. Porém, não se pode

descartar a possibilidade de que este aumento (não significativo) da migração de células mononucleares, no pré-tratamento, possa ser apenas um artefato experimental devido ao tipo de protocolo adotado, não havendo, assim, um potencial problema terapêutico com estas drogas na artrite reativa.

Pacientes que não respondem bem ao tratamento com AINEs, requerem uma terapia adicional. Nestes casos, os glicocorticóides podem ser utilizados em associação com os AINEs ou como monoterapia (Palazzi et al., 2004). A injeção local de glicocorticóides também pode ser útil quando ocorre um quadro de entesite e/ou oligoartrite, enquanto o tratamento sistêmico é indicado para pacientes que apresentam inflamação generalizada (Babic-Naglic, 2004). Em modelos experimentais em que a artrite é induzida por adjuvante de Freund ou zimosan, a dexametasona reduz significativamente a hiperalgesia e o edema articular e promove o restabelecimento da mobilidade espontânea (Tatsuo et al., 1994). Dexametasona, quando administrada à pacientes com artrite reumatóide, reduz significativamente a severidade da artralgia, a rigidez articular matinal, o número de articulações inflamadas e a atividade da doença (Li et al., 1996; Lashina et al., 2000). O mesmo ocorre em pacientes com artrite inflamatória crônica ou osteoartrite (Stein et al., 1999) ou com artropatia da articulação acromioclavicular (Jacob e Sallay, 1997). Nos pacientes com artrite reumatóide, a injeção intraarticular de glicocorticóides também promove uma redução de até 60 % na migração de neutrófilos para a sinóvia, um evento que ocorre em paralelo com a redução da dor articular. A injeção intraarticular de dexametasona em crianças com artrite juvenil também é segura e capaz de promover a completa remissão da inflamação articular de maneira duradoura. Além disso, a dexametasona é efetiva na correção das deformidades e da contração articular (Padeh e Passwell, 1998). O tratamento com glicocorticóides, intraarticular, também é indicado para a artrite reativa, especialmente quando ocorre uma inflamação mais generalizada da articulação (Svenungsson, 1995; Barth e Segal, 1999). No entanto, é conveniente salientar que, além das inúmeras diferenças patofisiológicas que existem entre as artropatias autoimunes como a artrite reumatóide e as espondiloartropatias como a espondilite anquilosante e a artrite reativa, também ocorre uma diferença na responsividade aos glicocorticóides. Pacientes com espondilite anquilosante, geralmente, são menos responsivos à terapia glicocorticóide, um fato que ainda não é completamente explicado. Por outro lado, pacientes que apresentam artrite periférica, uveíte anterior, doença intestinal inflamatória, elevados níveis de proteína C reativa, e que

são HLA B27 negativos, respondem melhor à terapia glicocorticóide.

Os glicocorticóides atuam por diferentes mecanismos de ação e, dentre eles, a inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , o qual é de grande importância no tratamento de diversos processos inflamatórios, incluindo os artríticos (Baughman et al., 2003). Além disso, a dexametasona também tem se mostrado eficaz na inibição da migração de neutrófilos na cavidade articular (Bombini et al., 2004).

No presente estudo, verificamos que a dexametasona, quando administrada por via sistêmica, é capaz de abolir, completamente e de maneira rápida, a nocicepção e o edema articular induzidos pelo LPS e, em paralelo reduzir a migração de células mononucleares para o fluido sinovial. Estes dados suportam a eficácia dos glicocorticóides no tratamento da artrite reativa e confirmam os estudos tanto em outros modelos experimentais quanto em testes clínicos com pacientes portadores de artrite reativa e, até mesmo, outras artropatias. Além disso, estes achados revelam a confiabilidade e a segurança que o modelo de artrite induzida pelo LPS apresenta para o estudo da ação de diferentes fármacos na nocicepção e edema articulares e na migração celular.

O tratamento das artropatias, no passado, era baseado apenas no alívio sintomático da dor, e para isso, fazia-se uso dos AINEs e dos glicocorticóides. Porém, a alta incidência de efeitos colaterais que comprometem a saúde dos pacientes e a ocorrência de danos articulares irreversíveis, já no início da doença, fez surgir a necessidade de um tratamento alternativo mais agressivo para a doença, que não promovesse tantos efeitos colaterais e que fosse capaz de prevenir os danos estruturais nas articulações. Desta forma, as drogas modificadoras da doença (DMARDs), com potenciais efeitos modulatórios sobre algumas citocinas importantes na artrite, tornaram-se a terapia padrão no tratamento principalmente, da artrite reumatóide (Costello e Halverson, 2003; Panico et al., 2003). No presente trabalho, foram avaliados os efeitos de um DMARD padrão, a sulfasalazina, de um DMARD mais novo, o leflunomide, e da diacereína, um agente antiinflamatório que também apresenta propriedades modificadoras da doença.

Em pacientes com artrite reumatóide, o tratamento com sulfasalazina melhora significativamente a dor, o inchaço articular e reduz a progressão da erosão óssea (Box e Pullar, 1997) porém, os benefícios deste fármaco exigem doses maiores que 40 mg/kg/dia (Pullar et al., 1985). Estudos clínicos demonstram que a sulfasalazina também é eficaz no tratamento da artrite psoriática (Fraser et al.,

1993). Juntamente com os AINEs, a sulfasalazina ainda é uma das drogas mais utilizadas no tratamento da artrite reativa (Palazzi et al., 2004). Na espondilite anquilosante, a sulfasalazina reduz a atividade da doença, principalmente em pacientes que apresentam artrite periférica (Clegg et al., 1996) e previne os ataques de uveíte (Dougados et al., 1995; Benitez-Del-Castillo et al., 2000). Estudos *in vivo*, utilizando o modelo de inflamação induzida por carragenina em murinos, têm mostrado que a sulfasalazina também é capaz de inibir o recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório (Gadangi et al., 1996).

No presente estudo, nós confirmamos os efeitos benéficos da sulfasalazina na inibição do edema articular, os quais já tinham sido observados nos testes clínicos realizados em pacientes portadores de diferentes artropatias. Por outro lado, não foi possível detectar nenhum efeito significativo da sulfasalazina na nocicepção e na migração de células. Estes achados são um tanto surpreendentes. A sulfasalazina é uma droga capaz de modular a expressão de citocinas potencialmente envolvidas na dor e no edema (Kang et al., 1999; Haskó et al., 2001), bem como, do fator nuclear NF- $\kappa$ B, envolvido na ativação transcricional de uma série de mediadores pró-inflamatórios (Wahl et al., 1998). Assim, era de se esperar que esta droga apresentasse um efeito mais significativo e talvez semelhante ao observado com antiinflamatórios potentes como a dexametasona. Sendo assim, o presente estudo chama a atenção aos reais benefícios que a sulfasalazina pode apresentar para o tratamento da artrite reativa, os quais podem ser diferentes dos observados na artrite reumatóide.

Em 1999, um novo fármaco foi aprovado para o tratamento da artrite reumatóide, o leflunomide. O leflunomide é uma droga clinicamente eficaz que interfere com mecanismos envolvidos na inflamação articular e na destruição da integridade articular. Dentre os benefícios que o leflunomide confere aos pacientes artríticos está a redução do recrutamento de células inflamatórias, como os neutrófilos, para o fluido sinovial e a redução do edema e do enrijecimento articular (Kraan et al., 2000). Os efeitos imunomodulatórios e antiinflamatórios do leflunomide são mostrados em estudos clínicos (Breedveld e Dayer, 2000) e em diferentes modelos animais de artrite. No modelo mais utilizado, o de artrite induzida por adjuvante em ratos, o leflunomide detém o desenvolvimento da artrite, bem como suprime ou limita o desenvolvimento do edema articular (Bartlett e Schleyerbach, 1985; Pasternak et al., 1987). A eficácia do leflunomide também é observada no modelo de artrite induzida por proteoglicanas (Glant et al., 1992). Estudos clínicos na

Europa e Estados Unidos revelam que o leflunomide melhora significativamente os sinais e sintomas da artrite reumatóide em comparação com o placebo, e que tais efeitos são comparáveis aos do metotrexato e da sulfasalazina. Porém, a eficácia do leflunomide no retardo da progressão da doença parece ser significativamente superior (Goldenberg, 1999; Herrmann et al., 2000). Em pacientes com artrite psoriática (Kaltwasser et al., 2004) ou espondilite anquilosante que apresentam artrite periférica (Haibel et al., 2005), o tratamento com leflunomide também promove significativa melhora. Como as opções terapêuticas para a espondilite anquilosante são limitadas, o leflunomide tem sido uma das drogas mais exploradas (van der Horst-Bruinsma et al., 2002). Estudos, *in vitro*, mostram que o leflunomide inibe a atividade, preferencialmente, de células T de pacientes com artrite reumatóide, o que é visualizado através da inibição da liberação de INF- $\gamma$  por estas células em cultura (Krann et al., 2004). Além disso, o leflunomide reduz o número de macrófagos e a expressão de moléculas de adesão no tecido sinovial destes pacientes (Kraan et al., 2000). Biópsia de tecido sinovial de pacientes tratados com leflunomide mostram o decréscimo da produção local de metaloproteinases, o que contribui para o retardo da progressão da doença. O leflunomide também é capaz de induzir a produção do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra), *in vitro*, por fibroblastos sinoviais e condrócitos articulares estimulados com TNF $\alpha$  ou IL-1 $\beta$ , de paciente com artrite reumatóide e osteoartrite (Palmer et al., 2004). Raros relatos são feitos acerca dos possíveis efeitos do leflunomide na dor articular. No modelo de mononeuropatia em roedores, o leflunomide é capaz de produzir ação anti-alodínica (Sweitzer e DeLeo, 2002).

No presente estudo, evidenciamos os efeitos benéficos do leflunomide na inibição da nocicepção e edema articular, bem como, na migração de células mononucleares para o fluido sinovial. O efeito antinociceptivo do leflunomide, observado neste modelo, pode estar refletindo a inibição que esta droga promove na expressão de substâncias relevantes na dor (COX-2, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e NO) (Winkelstein et al., 2001). Além disso, o leflunomide também apresenta propriedades imunorregulatórias importantes, modulando principalmente, o ciclo celular de linfócitos T e B (Breedveld e Dayer, 2000) e a expressão de moléculas de adesão (Cutolo et al., 2003; Elkayam et al., 2003). Tais propriedades podem estar implicadas na inibição da migração de células mononucleares, observada neste estudo, chamando a atenção para a especificidade de ação desta droga sobre os linfócitos e para seus potenciais efeitos no tratamento de processos artríticos em que estas

células apresentam papel relevante. Além disso, acredita-se que a nocicepção induzida pelo LPS, possa estar relacionada com a migração de células mononucleares e, desta forma, os efeitos inibitórios do leflunomide sobre estas células podem estar, também, se refletindo na nocicepção. Por outro lado, drogas como a sulfasalazina não apresentam propriedade antinociceptiva, neste modelo, mas também não inibem a migração de mononucleares, o que poderia reforçar esta hipótese. Ao contrário, em modelos experimentais de artrite autoimune não se observa claramente os efeitos do leflunomide na nocicepção, provavelmente porque, nestes modelos, ocorre migração tipicamente polimorfonuclear. Porém, observa-se uma significativa ação antiedematogênica do leflunomide (Bartlett e Schleyerbach, 1985; Pasternak et al., 1987; Kraan et al., 2000) o que poderia estar associado à inibição da migração de polimorfonucleares. Esta idéia também poderia explicar, em parte, a ausência de efeito antinociceptivo da sulfasalazina, pois ela foi incapaz de inibir a migração de mononucleares.

A diacereína, uma droga pertencente à classe química das antraquinonas, apresenta eficácia no tratamento sintomático de doenças inflamatórias degenerativas da articulação como a osteoartrite. Estudos em modelos experimentais de inflamação aguda e crônica e de artrite induzida por adjuvante em ratos mostram que a diacereína é capaz de suprimir o desenvolvimento de artrite, inibir o edema e prevenir a perda óssea, apresentando assim, propriedades farmacológicas, em parte, distintas daquelas observadas pelas drogas antiinflamatórias não esteroidais clássicas (Tamura e Ohmori, 2001; Tamura et al., 2002). Estudos em ratos transgênicos para o TNF $\alpha$ , que desenvolvem doença artrítica inflamatória crônica, também têm apontado os efeitos benéficos da diacereína no alívio dos sintomas clínicos, na redução da destruição da cartilagem, no grau de sinovite e na erosão óssea, sugerindo um potencial terapêutico da diacereína em pacientes com artrite reumatóide TNF $\alpha$  (Douni et al., 2004). Além disso, análises comparativas mostram que a diacereína é mais potente que o metotrexato (DMARD), mas não tão efetiva quanto a dexametasona ou os agentes anti-TNF $\alpha$  na supressão da progressão da artrite mediada pelo TNF $\alpha$  (Douni et al., 2004). A diacereína também suprime, *in vitro*, a síntese de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , pelos tecidos sinoviais e cartilagem de pacientes com osteoartrite (Yaron et al., 1999; Moldovan et al., 2000), e previne a degradação da cartilagem em modelo de granuloma em camundongos (Moore et al., 1998). A diacereína apresenta efeitos protetores articulares contra o desenvolvimento de

poliartrite espontânea em camundongos NZB/KN (*New Zealand black/KN*) demonstrando sua utilidade no tratamento de doenças articulares inflamatórias crônicas (Tamura et al., 1999). Estudos clínicos demonstram que a diacereína promove alívio da dor articular em pacientes com osteoartrite, o qual é comparável ao observado com AINEs, e este alívio persiste após a interrupção do tratamento. Pacientes que recebem diacereína são menos deficientes, usam menos AINEs e/ou analgésicos, requerem menos cuidados e tem uma melhora na qualidade de vida (Avouac, 2002; Provedini e Cohen, 2002). Diacereína também apresenta ação inibitória sobre a migração de macrófagos para o exsudato peritoneal e reduz a atividade fagocítica destas células, em modelo de peritonite por tioglicolato (Mian et al., 1989).

Embora alguns estudos tenham mostrado que a efetividade da diacereína é similar a dos AINEs (Mian et al., 1989), o presente estudo não confirmou estes dados. A diacereína apresentou eficácia apenas na inibição do edema articular induzido pelo LPS, similar ao observado em modelos de artrite autoimune. A diacereína não apresentou ação antinociceptiva, diferente do observado em estudos clínicos com pacientes com osteoartrite. Isso sugere que a diacereína pode ser efetiva no alívio da dor em algumas patologias e, ineficaz em outras, como pode ser o caso da artrite reativa. Além disso, a potencial capacidade da diacereína em modular a migração celular (Mian et al., 1989) não foi observada neste estudo, sugerindo novamente que a sua eficácia pode estar relacionada ao tipo de patologia. Além disso, sugere-se que a diacereína inibe a atividade da IL-1 $\beta$ , uma citocina importante na destruição da cartilagem articular (van de Loo e van den Berg, 1990; Yaron et al., 1999; Moldovan et al., 2000), reforçando os possíveis efeitos desta droga na prevenção dos danos articulares que se desenvolvem na artrite reativa. Como são raros os estudos sobre a eficácia da diacereína na artrite reativa, o presente estudo contribui para o conhecimento de alguns dos possíveis efeitos desta terapia nesta patologia porém ainda não esclarece totalmente o seu mecanismo de ação.

A pentoxifilina é um fármaco que inibe, de maneira inespecífica, a liberação de TNF $\alpha$  (Mandell, 1995; Baughman e Iannuzzi, 2003). Pentoxifilina, administrada a pacientes com artrite reumatóide refratária severa, reduz significativamente a dor e a severidade da doença, porém, não altera outros parâmetros clínicos e laboratoriais importantes, sugerindo que os benefícios deste fármaco podem ser muito pequenos para justificar seu uso nesta patologia (Dubost et al., 1997). Quando administrada



por via oral, em pacientes saudáveis, promove a redução da liberação de TNF $\alpha$  dos monócitos do sangue expostos à partículas de titânio ou LPS, demonstrando, assim, a sua habilidade em modular a liberação desta citocina (Pollice et al., 2001). Em modelos animais, a pentoxifilina inibe a hiperalgisia mecânica induzida, em ratos, por carragenina intraplantar, bradicinina ou TNF $\alpha$ , mas não por IL-1 $\beta$  ou PGE $_2$ . Também inibe a resposta de contorção abdominal induzida por ácido acético ou zimosan e a hiperalgisia articular induzida por zimosan, respostas estas que não são revertidas pela co-administração de naloxona, um antagonista de receptor opióide. Por outro lado, não é capaz de inibir a resposta nociceptiva no teste da placa quente (Vale et al., 2004). Pentoxifilina também inibe, de maneira dose-dependente, o acúmulo de neutrófilos induzido por ovalbumina na cavidade articular de ratos previamente sensibilizados com a própria ovalbumina (Bombini et al., 2004), a produção de TNF $\alpha$  por células sangüíneas isoladas e tratadas com LPS (Foster, 2003) e as concentrações de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no exsudato articular de ratos estimulados com zimosan (i.art.). A produção destas citocinas por macrófagos peritoneais de camundongos estimulados, *in vivo*, com zimosan bem como a expressão de TNF $\alpha$ , induzida por carragenina na pata de ratos, também pode ser inibida pela pentoxifilina. Desta forma, sugere-se que a atividade antinociceptiva da pentoxifilina pode estar associada com a inibição da liberação de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Vale et al., 2004).

No presente estudo, a pentoxifilina não apresentou atividade antinociceptiva, mas foi capaz de reduzir o edema e, em paralelo a migração de células polimorfonucleares, não alterando porém, a migração de mononucleares. A ineficácia da pentoxifilina na nocicepção pode estar associada com o modelo (artrite reativa ao LPS) utilizado neste estudo e com o tipo de células que este estímulo recruta. O LPS induz uma migração celular predominantemente mononuclear, e estas parecem estar dando sustentação à nocicepção induzida pelo LPS. Por outro lado, as células polimorfonucleares parecem contribuir mais com o desenvolvimento do edema, o que explicaria a inibição, pela pentoxifilina, do edema articular induzidos pelo LPS. Em outros modelos experimentais, a pentoxifilina apresenta eficácia na nocicepção, diferentemente do observado neste estudo. Estes modelos utilizam, freqüentemente, estímulos como o zimosan ou a carragenina, os quais induzem migração, predominantemente, polimorfonuclear. Estas células, podem estar dando sustentação à nocicepção observada nestes modelos. Como a pentoxifilina parece inibir de maneira eficaz a migração destas células, esta pode

ser, em parte, a explicação de porque, nestes modelos, a pentoxifilina é antinociceptiva. Estes estudos em conjunto, chamam a atenção para o fato de que, embora a pentoxifilina module a ação de uma citocina (TNF $\alpha$ ) extremamente importante, tanto nas patologias artríticas autoimunes quanto na artrite reativa, sua real eficácia, no alívio dos sintomas e na redução da progressão da doença, pode ser bem distinta nestas patologias o que pode explicar, em parte, a ineficácia do tratamento, em alguns indivíduos, e a presença de efeitos colaterais importantes.

A aposta terapêutica mais recente para o tratamento da artrite inclui os agentes bloqueadores da atividade de citocinas pró-inflamatórias como os anticorpos anti-TNF $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$ , os quais exercem sua função via neutralização das respectivas citocinas. Estas citocinas estão entre os principais mediadores presentes na inflamação articular crônica e são responsáveis por grande parte dos danos estruturais articulares como a erosão da cartilagem e do osso.

Estudo clínicos têm mostrado que os agentes anti-TNF $\alpha$  apresentam eficácia, tanto na artrite reumatóide quanto nas espondiloartropatias, o que é evidenciado, em parte, pela redução da progressão dos danos articulares. Além disso, o tratamento é seguro e bem tolerado, resultando em significativo alívio dos sinais e sintomas como redução da dor, do edema e do enrijecimento das articulações (Elliott et al., 1993; Demis et al., 2002). Estudos realizados em pacientes com espondilite anquilosante e artrite psoriática mostram que a terapia anti-TNF $\alpha$  é capaz de promover a regressão da doença, melhorar a função e a qualidade de vida, aliviar a dor e reduzir a artrite periférica, o edema e a entesite (Brandt et al., 2002; Brandt et al., 2004; Schmeling e Horneff, 2004). Em pacientes com artrite reumatóide, a terapia anti-TNF $\alpha$  reduz rapidamente o influxo de leucócitos para as articulações inflamadas mas não prejudica a atividade quimiotática destas células, enquanto a terapia anti-IL-1 $\beta$  melhora os sinais e sintomas clínicos como a dor, a fadiga e a progressão dos danos estruturais articulares (Fleischmann et al., 2004).

O presente estudo demonstrou que anticorpos anti-IL-1 $\beta$ , anti-TNF $\alpha$  e anti-CINC-1 de rato foram capazes de inibir sintomas inflamatórios importantes e freqüentemente associados com a artrite reativa ao LPS, em ratos. O efeito antinociceptivo observado com o anti-TNF $\alpha$  está de acordo com estudos já realizados com esta citocina em modelos de inflamação aguda (Cunha et al., 1992; Watkins et al., 1995; Tonussi e Ferreira, 1999). Além disso, observou-se uma intensa redução do edema articular e da migração de leucócitos semelhante ao observado em outros modelos de artrite. Na artrite induzida por colágeno, um modelo que

lembra a artrite reumatóide, anti-TNF $\alpha$  reduz a severidade da doença e inibe a erosão articular (Williams et al., 2000), bem como inibe o edema e a migração celular (Williams et al., 1992; Piquet et al., 1992; Thorbecke et al., 1992; Weinblatt et al., 2003; Saldenberk-kermanac'h et al., 2004). Na artrite induzida por LPS em coelhos, anti-TNF $\alpha$  também reduz o recrutamento de leucócitos para a cavidade articular (Matsukawa et al., 1997), bem como a migração de células polimorfonucleares em ratos imunizados com ovalbumina (Bombini et al., 2004). Assim, a eficácia dos agentes bloqueadores do TNF $\alpha$  tem sido estreitamente associado à inibição da migração de PMN para a articulação inflamada (Culy e Keating, 2002).

Entre os três anticorpos testados para citocinas pró-inflamatórias, anti-TNF $\alpha$  foi o que causou a maior inibição da nocicepção, embora este parâmetro seja o mais difícil de se inibir no presente estudo. Além disso, a nocicepção foi afetada apenas após o edema e a migração celular serem inibidos ao nível máximo. Estes achados sugerem que a antinocicepção induzida pelo anticorpo anti-TNF $\alpha$  seja um evento independente dos mecanismos antiedematogênicos e inibitórios da migração celular, visto que a menor dose de anti-TNF $\alpha$  causou inibição máxima da migração celular sem afetar a nocicepção. O conceito de efeito direto do TNF $\alpha$  na nocicepção, independente da migração celular, é sustentado pela possível existência de receptores de TNF $\alpha$  nas fibras aferentes primárias (Parada et al., 2003; Fehrenbacher et al., 2005).

A terapia anti-TNF $\alpha$  tem sido avaliada em casos específicos de artrite reativa com resultados promissores (Meador et al., 2002), embora a segurança do tratamento a longo prazo ainda não seja adequadamente conhecida. Os resultados apresentados neste estudo sugerem que este agente biológico pode ser o mais efetivo na melhora da qualidade de vida bem como na progressão / recorrência da doença, uma vez que causou antinocicepção e potente inibição da migração celular, respectivamente. Pelo contrário, anti-IL-1 $\beta$  não produziu efeito antinociceptivo, mas um significativo efeito antiedematogênico e inibitório da migração celular de mononucleares. A falha de efeito antinociceptivo foi inesperado, visto que, estudos anteriores já mostraram que anti-IL-1 $\beta$  é capaz de inibir a hiperalgesia em modelos de inflamação aguda (Cunha et al., 1992; Watkins et al., 1995). Contudo, é possível que a contribuição da IL-1 $\beta$  para a nocicepção neste modelo seja sustentada por outras vias de sinalização.

A perda da inibição da migração celular com alta dose de anti-IL-1 $\beta$  foi outra

surpresa, mas sugere que com o decréscimo da disponibilidade de IL-1 $\beta$  as células inflamatórias lancem mão de outras vias para promover o processo quimiotático. Ambos os achados, a falha do efeito antinociceptivo e a perda do efeito inibitório sobre a migração celular, sugerem que IL-1 $\beta$  tem um papel secundário, mas não essencial neste modelo. Assim, evidências acumuladas sugerem que IL-1 $\beta$  é liberada secundariamente ao TNF $\alpha$  (Cunha et al., 1992; Williams et al., 2000; Matsukawa et al., 1997). Na hiperalgesia inflamatória induzida por LPS, a liberação aguda de TNF $\alpha$  promove uma cascata de citocinas em que IL-1 $\beta$  e IL-8 (CINC-1) podem constituir via paralelas contribuindo para a hiperalgesia em ratos (Cunha et al., 1992). O pré-tratamento com anti-CINC-1 causou efeito antinociceptivo já com a menor dose, além do efeito antiedematogênico e inibitório da migração celular, suportando a noção de que o efeito nociceptivo do TNF $\alpha$ , neste modelo, pode ser significativamente mediado por CINC-1, mas não necessariamente por IL-1 $\beta$ . Também tem sido reportado que IL-1 $\beta$ , similar ao TNF $\alpha$ , pode também estimular a liberação de IL-8 por células endoteliais (Lerisalo-Repo, 1994). Contudo, a falha de efeito antinociceptivo do anti-IL-1 $\beta$  ainda sugere que a fonte de CINC-1 liberada por IL-1 $\beta$ , se presente neste modelo, não é relevante para a nocicepção. Esta observação aumenta a especulação de que em situações clínicas onde existe um processo inflamatório reativo ao LPS, como na artrite reativa, a inibição da IL-1 $\beta$  pode não ser uma estratégia terapêutica efetiva. Outro achado surpreendente deste trabalho foi que anticorpos anti-CINC-1, uma citocina conhecida pela sua ação quimiotática específica para neutrófilos (Watanabe et al., 1991), também produziu significativa inibição da migração de mononucleares. Assim, a maior dose de anti-CINC-1 produziu inibição da migração de polimorfonucleares e mononucleares. Esta é a primeira demonstração de que CINC-1 tem papel na migração de mononucleares para a cavidade sinovial durante a inflamação, embora trabalhos anteriores já tenham demonstrado que CINC também pode estimular a migração de células T nos tecidos linfóides associados ao intestino (Fugimori et al., 2001).

Portanto, estes achados reforçam o importante papel do TNF $\alpha$  em diversas condições inflamatórias, e especialmente em diversas formas de artrite, e também chamam a atenção para a idéia de que CINC-1 (ou IL-8) pode constituir outro alvo eficaz para o tratamento da artrite reativa. Assim, o potente efeito antiedematogênico, e principalmente inibitório da migração celular do anti-CINC-1, levanta a possibilidade de um melhor controle da progressão da doença do que com

as terapias ant-IL-1 $\beta$ . Estes achados também chamam a atenção para a confiabilidade que o modelo utilizado neste estudo apresenta para o estudo de drogas moduladoras da atividade de citocinas, questionando as reais vantagens destas terapias, principalmente na artrite reativa.

A busca do maior entendimento da fisiopatologia das artropatias tem permitido reconhecer o potencial terapêutico de algumas citocinas antiinflamatórias, incluindo a IL-10, IL-13 e IL-4, nestas patologias. IL-10 é capaz de suprimir a liberação de citocinas pró-inflamatórias INF- $\gamma$  e TNF $\alpha$  de células mononucleares do fluido sinovial de pacientes com artrite reativa (Yin et al., 1997). Este achado também é comprovado através de estudos com anticorpos anti-IL-10. O tratamento de células sinoviais com anticorpos anti-IL-10 aumentam, substancialmente, a secreção de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Morita et al., 2001). IL-4 inibe a liberação de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e PGE<sub>2</sub> de monócitos / macrófagos estimulados com LPS (Hart et al., 1989) e, juntamente com IL-10, a liberação de PGE<sub>2</sub> e a expressão de COX-2 por neutrófilos humanos (Niiri et al., 1997). Em modelos animais em que a artrite é induzida por adjuvante, o tratamento prévio com anti-IL-4 e / ou anti-IL-10 facilita a indução da artrite e aumenta a atividade da doença (Kasama et al., 1995; Joosten et al., 1997; Yoshiro et al., 1998). Por outro lado, em modelo de artrite induzida por parede celular de *Streptococcus*, em ratos, anti-IL-10 não foi capaz de suprimir o edema articular e nem as evidências histopatológicas da inflamação (Schier et al., 1998). Estudos em culturas de membrana sinovial de pacientes com osteoartrite, tratada com LPS, mostram que a IL-13, além de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, é capaz de suprimir a liberação de metaloproteinases e favorecer a produção do antagonista de receptor de IL-1 (IL-1Ra) (Jovanovic et al., 1998).

IL-10, IL-13 e IL-4 também estão envolvidas com a ativação de mecanismos analgésicos endógenos, principalmente reduzindo os efeitos hiperalgésicos de citocinas pró-inflamatórias como o TNF $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , produzidas no início do desenvolvimento da inflamação (Rittner et al., 2002). Em modelo de contorção abdominal induzida pelo ácido acético ou zimosan, em camundongos, e no teste de incapacitação articular induzida por zimosan, em ratos, IL-10, IL-13 e IL-4 apresentaram efeito anti-hiperalgésico. Anticorpos contra estas citocinas potencializaram a incapacitação articular e as contorções abdominais, induzidas por zimosan (Vale et al., 2003). IL-13 e IL-10 também atenuam a hiperalgesia induzida por radiação ultravioleta (Saade et al., 2000) enquanto que a IL-4 reduz a hiperalgesia mecânica induzida por carragenina, bradicinina ou TNF $\alpha$ , em ratos

(Cunha et al., 1999).

O presente estudo confirmou os efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios da IL-10 e da IL-13, já observados em modelos experimentais distintos. Anticorpos anti-IL-10 ou anti-IL-13, administrados antes do estímulo com uma dose relativamente baixa de LPS, promoveram aumento da nocicepção e do edema articular, o que sugere os possíveis benefícios terapêuticos destas citocinas para o tratamento da artrite reativa. Porém, quando anti-IL-10 ou anti-IL-13 foram administrados antes de uma dose de LPS, aproximadamente 33 vezes maior, o efeito observado na nocicepção foi o mesmo, mas no edema, foi contrário ao evidenciado com a dose menor de LPS, ou seja, ambas, anti-IL-10 e anti-IL-13 inibiram o edema induzido pelo LPS. O que estes achados representam, na prática, ainda não é totalmente compreendido, mas geram questionamentos sobre a real eficácia desta terapia.

O presente estudo também confirmou os efeitos antinociceptivos da IL-4, anteriormente observados em outros modelos experimentais. Anti-IL-4 potencializou a nocicepção e o edema induzidos pelo LPS. Em modelos experimentais em que a artrite é induzida por adjuvante, IL-4 parece freiar o desenvolvimento da doença. O tratamento com anti-IL-4 promove uma facilitação do desenvolvimento da artrite que apresenta características histológicas bem definidas com aumento do edema articular acompanhado de intensa migração de neutrófilos (Yoshino et al., 1998). Os resultados do presente estudo, aliados aos obtidos nestes modelos, sugerem um potencial terapêutico para esta citocina também na artrite reativa.

Além dos anticorpos anti-citocinas, também avaliamos neste estudo, a ação da administração de IL-13 exógena, na articulação, antes do estímulo com LPS. IL-13 promoveu antinocicepção confirmando os resultados obtidos com a anti-citocina, porém, apresentou efeito pró-edematogênico contrariando os efeitos obtidos com a anti-IL-13 administrada antes do LPS, dose baixa, mas confirmando os efeitos obtidos quando administrada antes do LPS, dose alta. Estes resultados evidenciam que a IL-13 pode estar modulando, de forma independente, os eventos que levam ao desenvolvimento da nocicepção e do edema articular e que podem ocorrer respostas bem distintas quando se tira uma citocina ou quando se acrescenta citocinas exógenas a um sistema inflamatório, o qual pode se reorganizar de maneira diferente e imprevisível frente a estas duas situações.

Deve-se levar em conta, também, que embora neste modelo, a IL-13 endógena pareça ser antiinflamatória, em outras patologias como a asma os seus

efeitos são completamente opostos. A IL-13 é o principal mediador inflamatório na asma alérgica e a responsável pela hiperresponsividade das vias aéreas (Wynn, 2003). Desta forma podemos sugerir que a IL-13 pode não representar uma terapia eficaz na artrite reativa pois embora reduza a dor, pode intensificar outros parâmetros da inflamação como o edema.

Tendo em vista a grande diversidade de terapias disponíveis e os diferentes efeitos que elas apresentam nos mais diversos modelos experimentais, podemos sugerir que, a melhor estratégia terapêutica pode ser a combinação de fármacos capazes de suprimir os principais sintomas da artrite (dor e edema articulares) bem como evitar ou retardar a destruição dos tecidos articulares. Desta forma, o presente estudo sugere que a terapia anti-TNF $\alpha$ , anti-CINC-1 e fármacos modificadores da doença como o leflunomide apresentam grande potencial terapêutico no tratamento de artropatias relacionadas com reatividade ao LPS.

O presente estudo também demonstrou que o modelo de artrite reativa ao LPS pode ser um método útil para se avaliar em paralelo a nocicepção e o edema articulares e também a migração diferencial de células para a cavidade sinovial. A capacidade de quantidades relativamente pequenas de LPS induzirem intensa reação inflamatória em articulações previamente sensibilizadas com carragenina, sugere que em situações clínicas em que o LPS é encontrado em articulações artríticas assépticas, a artrite pode ser resultado desta infiltração de LPS. Um exemplo marcante é a artrite reativa (ReA). Curiosamente, células mononucleares, com características de linfócitos T, constituíram o principal tipo celular que migrou para o fluido sinovial neste modelo, e a artrite reativa é caracterizada por uma migração aumentada de linfócitos T para a sinóvia, que acredita-se que seja a principal célula envolvida na sua patogênese (Hermann et al., 1994; Allen et al., 1997; Yu, 1999; Bollow et al., 2000; Marker-Hermann e Schwab, 2000; Gaston e Lillicrap, 2003).

## 6 CONCLUSÃO

- No modelo de artrite induzida pelo LPS, as citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CINC-1 estão envolvidas no desenvolvimento da nocicepção, edema articular e migração celular;
- IL-10, IL-13 e IL-4 também são produzidas localmente e apresentam efeito inibitório. Contudo, IL-10 e IL-13 também apresentam efeito pró-edematogênico neste modelo;
- Os resultados obtidos com antiinflamatórios não esteroidais e dexametasona sugerem que o modelo de artrite induzida pelo LPS é confiável para avaliar a ação de outras drogas sobre a nocicepção, edema articular e migração celular;
- As drogas modificadoras de doença (DMARDs), potencialmente moduladoras da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , não apresentaram efeito tão potente quanto os respectivos anticorpos anti-citocinas sugerindo que, pelo menos neste modelo *in vivo*, esse mecanismo de ação pode não ser atingido. O leflunomide, foi o único DMARD testado que apresentou efetividade similar aos anticorpos anti-TNF $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$  em todos os parâmetros avaliados (nocicepção, edema articular e migração celular).



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHVONEN, P.; SIEVERS, K.; AHO, K. Arthritis associated with *Yersinia enterocolitica* infection. **Acta Rheumatol. Scand.**, 15(3):232-53, 1969.
- ALCALAY, M.; DEBIAIS, F.; AZAIS, I.; BONTOUX, D. Post-traumatic reactive arthritis. Etiologic, clinical and diagnostic aspects. Apropos of 6 cases. **Rev. Rhum. Mal. Osteoartic.**, 56(11):725-9, 1989.
- ALLEN, R.L.; GILLESPIE, G.M.; HALL, F.; EDMONDS, S.; HALL, M.<sup>a</sup>; WORDSWORTH, B.P.; MCMICHAEL, A.J.; BOWNESS, P. Multiple T cell expansions are found in the blood and synovial fluid of patients with reactive arthritis. **J. Rheumatol.**, 24(9):1750-7, 1997.
- AMOR, B.; FELDMANN, J.L.; DELBARRE, F.; HORS, J.; BEAUJAN, M.M.; DAUSSET, J.N. HL-A antigen W27 - a genetic link between ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome? **Engl. J. Med.**, 290(10):572, 1974.
- ANANDARAJAH, A.P.; RITCHLIN, C.T. Treatment update on spondyloarthropathy. From NSAIDs and DMARDs to anti-TNF-alpha agents. **Postgrad. Med.**, 116(5):31-6, 2004.
- APPEL, H.; NEURE, L.; KUHNE, M.; BRAUN, J.; RUDWALEIT, M.; SIEPER, J. An elevated level of IL-10- and TGFbeta-secreting T cells, B cells and macrophages in the synovial membrane of patients with reactive arthritis compared to rheumatoid arthritis. **Clin. Rheumatol.**, 23(5):435-40, 2004.
- AUTEN, R.L. JR.; MASON, S.N.; TANAKA, D.T.; WELTY-WOLF, K.; WHORTON, M. Anti-neutrophil chemokine preserves alveolar development in hyperoxia-exposed newborn rats. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, 281(2):L336-44, 2001.
- AVOUAC, B. Current medical possibilities in the treatment of arthrosis. **Presse Med.**, 31(1 Pt 2):5-6, 2002.
- BABIC-NAGLIC, D. Pharmacotherapy for spondyloarthropathies. **Reumatizam**, 51(2):22-8, 2004.
- BARTH, W.F.; SEGAL, K. Reactive arthritis (Reiter's syndrome). **Am. Fam. Physician.**, 60(2):499-503, 1999.

- BARTLETT, R.R.; SCHLEYERBACH, R. Immunopharmacological profile of a novel isoxazol derivative, HWA 486, with potential antirheumatic activity-I. Disease modifying action on adjuvant arthritis of the rat. **Int. J. Immunopharmacol.**, 7(1):7-18, 1985.
- BAS, S.; GRIFFAIS, R.; KVIEN, T.K.; GLENNAS, A.; MELBY, K.; VISCHER, T.L. Amplification of plasmid and chromosome Chlamydia DNA in synovial fluid of patients with reactive arthritis and undifferentiated seronegative oligoarthropathies. **Arthritis Rheum.**, 38(7):1005-13, 1995.
- BAUGHMAN, R.P.; IANNUZZI, M. Tumour necrosis factor in sarcoidosis and its potential for targeted therapy. **BioDrugs**, 17(6):425-31, 2003.
- BENITEZ-DEL-CASTILLO, J.M.; GARCIA-SANCHEZ, J.; IRADIER, T.; BANARES, A. Sulfasalazine in the prevention of anterior uveitis associated with ankylosing spondylitis. **Eye**, 14 ( Pt 3A):340-3, 2000.
- BJORDAL, J.M.; LJUNGGREN, A.E.; KLOVNING, A.; SLORDAL, L. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, including cyclo-oxygenase-2 inhibitors, in osteoarthritic knee pain: meta-analysis of randomised placebo controlled trials. **B.M.J.**, 329(7478):1317, 2004.
- BOLLOW, M.; FISCHER, T.; REISSHAUER, H.; BACKHAUS, M.; SIEPER, J.; HAMM, B.; BRAUN, J. Quantitative analyses of sacroiliac biopsies in spondyloarthropathies: T cells and macrophages predominate in early and active sacroiliitis- cellularity correlates with the degree of enhancement detected by magnetic resonance imaging. **Ann. Rheum. Dis.**, 59(2):135-40, 2000.
- BOMBINI, G.; CANETTI, C.; ROCHA, F.A.; CUNHA, F.Q. Tumour necrosis factor-alpha mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, 496(1-3):197-204, 2004.
- BOX, S.A; PULLAR, T. Sulphasalazine in the treatment of rheumatoid arthritis. **Br. J. Rheumatol.**, 36(3):382-6, 1997.
- BOYER, G.S.; TEMPLIN, D.W.; BOWLER, A.; LAWRENCE, R.C.; HEYSE, S.P.; EVERETT, D.F.; CORNONI-HUNTLEY, J.C. Spondyloarthropathy in the community: clinical syndromes and disease manifestations in Alaskan Eskimo populations. **J. Rheumatol.**, 26(7):1537-44, 1999.
- BRANDT, J.; KHARIOUZOV, A.; LISTING, J.; HAIBEL, H.; SORENSEN, H.; RUDWALEIT, M.; SIEPER, J.; BRAUN J. Successful short term treatment of

- patients with severe undifferentiated spondyloarthritis with the anti-tumor necrosis factor-alpha fusion receptor protein etanercept. **J. Rheumatol.**, 31(3):531-8, 2004.
- BRANDT, J.; HAIBEL, H.; REDDIG, J.; SIEPER, J.; BRAUN J. Successful short term treatment of severe undifferentiated spondyloarthropathy with the anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody infliximab. **J Rheumatol.**, 29(1):118-22, 2002.
- BRANDT, K.D.; SMITH, G.; KANG, S.Y.; MYERS, S.; O'CONNOR, B.; ALBRECHT, M. Effects of diacerhein in an accelerated canine model of osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, 5(6):438-49, 1997.
- BRAUN, J.; BOLLOW, M.; NEURE, L.; SEIPELT, E.; SEYREKBASAN, F.; HERBST, H.; EGGENS, U.; DISTLER, A.; SIEPER J. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. **Arthritis Rheum.**, 38(4):499-505, 1995.
- BRAUN, J.; SIEPER J. Therapy of ankylosing spondylitis and other spondyloarthritides: established medical treatment, anti-TNF-alpha therapy and other novel approaches. **Arthritis Res.**, 4(5):307-21, 2002.
- BRAUN, J.; SIEPER, J.; BREBAN, M.; COLLANTES-ESTEVEZ, E.; DAVIS, J.; INMAN, R.; MARZO-ORTEGA, H.; MIELANTS, H. Anti-tumour necrosis factor alpha therapy for ankylosing spondylitis: international experience. **Ann. Rheum. Dis.**, 61 Suppl 3:iii51-60, 2002.
- BREBAN, M.; FALGARONE, G.; BLANCHARD, H.; DERNIS-LABOUS, E.; LAMARQUE, D. Animal models of the spondyloarthropathies. **Curr. Rheumatol. Rep.**, 2(4):282-7, 2000.
- BREBAN, M.; HACQUARD-BOUDER, C.; FALGARONE, G. Animal models of HLA-B27-associated diseases. **Curr. Mol. Med.**, 4(1):31-40, 2004.
- BREEDVELD, F.C.; DAYER, J.M. Leflunomide: mode of action in the treatment of rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, 59(11):841-9, 2000.
- BRESSAN, E.; FARGES, R.C.; FERRARA, P.; TONUSSI, C.R. Comparison of two PBR ligands with classical antiinflammatory drugs in LPS-induced arthritis in rats. **Life Sci.**, 72(23):2591-601, 2003.

- BROGDEN, R.N.; HEEL, R.C.; PAKES, G.E.; SPEIGHT, T.M.; AVERY, G.S. Diclofenac sodium: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in rheumatic diseases and pain of varying origin. **Drugs**, 20(1):24-48, 1980.
- BURGOS-VARGAS, R. Juvenile onset spondyloarthropathies: therapeutic aspects. **Ann. Rheum. Dis.**, 61 Suppl 3:iii33-9, 2002.
- BUTRIMIENE, I.; JARMALAITĖ, S.; RANCEVA, J.; VENALIS, A.; JASIULEVICIUTE, L.; ZVIRBLIENE, A. Different cytokine profiles in patients with chronic and acute reactive arthritis. **Rheumatology**, 43(10):1300-4, 2004.
- CASE, J.P.; BALIUNAS, A.J.; BLOCK, J.A. Lack of efficacy of acetaminophen in treating symptomatic knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled comparison trial with diclofenac sodium. **Arch. Intern. Med.**, 163(2):169-78, 2003.
- CHEN, T.; RIMPILAINEN, M.; LUUKKAINEN, R.; MOTTONEN, T.; YLI-JAMA, T.; JALAVA, J.; VAINIO, O.; TOIVANEN, P. Bacterial components in the synovial tissue of patients with advanced rheumatoid arthritis or osteoarthritis: analysis with gas chromatography-mass spectrometry and pan-bacterial polymerase chain reaction. **Arthritis Rheum.**, 49(3):328-34, 2003.
- CLAUDEPIERRE, P.; GUEGUEN, A.; LADJOUZE, A. Predictive factors of severity of spondyloarthropathy in North Africa. **Br. J. Rheumatol.**, 34(12):1139-45, 1995.
- CLEGG, D.O.; REDA, D.J.; WEISMAN, M.H.; CUSH, J.J.; VASEY, F.B.; SCHUMACHER, H.R. JR.; BUDIMAN-MAK, E.; BALESTRA, D.J.; BLACKBURN, W.D.; CANNON, G.W.; INMAN, R.D.; ALEPA, F.P.; MEJIAS, E.; COHEN, M.R.; MAKKENA, R.; MAHOWALD, M.L.; HIGASHIDA, J.; SILVERMAN, S.L.; PARHAMI, N.; BUXBAUM, J.; HAAKENSEN, C.M.; WARD, R.H.; MANASTER, B.J.; ANDERSON, R.J.; HENDERSON, W.G.; et al. Comparison of sulfasalazine and placebo in the treatment of reactive arthritis (Reiter's syndrome). **Arthritis Rheum.**, 39(12):2021-7, 1996.
- COLMEGNA, I.; CUCHACOVICH, R.; ESPINOZA, L.R. HLA-B27-associated reactive arthritis: pathogenetic and clinical considerations. **Clin. Microbiol. Rev.**, 17(2):348-69, 2004.
- COSTELLO, J.C.; HALVERSON, P.B. A new era in rheumatoid arthritis treatment. **W.M.J.**, 102(7):29-33, 2003.
- CULY, C.R.; KEATING, G.M. Etanercept: an updated review of its use in rheumatoid

arthritis, psoriatic arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. **Drugs**, 62(17):2493-537, 2002.

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 107(3):660-4, 1992.

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; VEIGA, F.H.; FERREIRA, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. **Br. J. Pharmacol.**, 126(1):45-50, 1999.

CURATOLO, M.; BOGDUK, N. Pharmacologic pain treatment of musculoskeletal disorders: current perspectives and future prospects. **Clin. J. Pain**, 17(1):25-32, 2001.

CUTOLO, M.; SULLI, A.; GHIORZO, P.; PIZZORNI, C.; CRAVIOTTO, C.; VILLAGGIO, B. Anti-inflammatory effects of leflunomide on cultured synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, 62(4):297-302, 2003.

DE-MELO, J.D.; TONUSSI, C.R.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; RAE, G.A. Effects of endothelin-1 on inflammatory incapacitation of the rat knee joint. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 31 Suppl 1:S518-20, 1998 (a).

DE-MELO, J.D.; TONUSSI, C.R.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; RAE, G.A. Articular nociception induced by endothelin-1, carrageenan and LPS in naive and previously inflamed knee-joints in the rat: inhibition by endothelin receptor antagonists. **Pain**, 77(3):261-9, 1998 (b).

DENG, H.; MASON, S.N.; AUTEN, R.L. JR. Lung inflammation in hyperoxia can be prevented by antichemokine treatment in newborn rats. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 162(6):2316-23, 2000.

DEBORD, P.; LOUCHAHI, K.; TOD, M.; COURNOT, A.; PERRET, G.; PETITJEAN, O. Influence of renal function on the pharmacokinetics of diacerein after a single oral dose. **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.**, 19(1):13-9, 1994.

DEMIS, E.; ROUX, C.; BREBAN, M.; DOUGADOS, M. Infliximab in spondylarthropathy-influence on bone density. **Clin. Exp. Rheumatol.**, 20(6 Suppl 28):S185-6, 2002.

- DINARELLO, C.A. Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. **Curr. Opin. Pharmacol.**, 4(4):378-85, 2004 .
- DOUGADOS, M.; NGUYEN, M.; BERDAH, L.; MAZIERES, B.; VIGNON, E.; LEQUESNE, M. Investigators Study Group. Evaluation of the structure-modifying effects of diacerein in hip osteoarthritis: ECHODIAH, a three-year, placebo-controlled trial. Evaluation of the Chondromodulating Effect of Diacerein in OA of the Hip. **Arthritis Rheum.**, 44(11):2539-47, 2001.
- DOUGADOS, M.; VAM DER LINDEN, S.; LEIRISALO-REPO, M.; HUITFELDT, B.; JUHLIN, R.; VEYS, E.; ZEIDLER, H.; KVIEN, T.K.; OLIVIERI, I.; DIJKMANS, B.; et al. Sulfasalazine in the treatment of spondylarthropathy. A randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled study. **Arthritis Rheum.**, 38(5):618-27, 1995.
- DOUNI, E.; SFIKAKIS, P.P.; HARALAMBOUS, S.; FERNANDES, P.; KOLLIAS, G. Attenuation of inflammatory polyarthritis in TNF transgenic mice by diacerein: comparative analysis with dexamethasone, methotrexate and anti-TNF protocols. **Arthritis Res. Ther.**, 6(1):R65-R72, 2004.
- DUBOST, J.J.; SOUBRIER, M.; RISTORI, J.M.; BEAUJON, G.; OUALID, T.; BUSSIERE, J.L.; SAUVEZIE, B. An open study of the anti-TNF alpha agent pentoxifylline in the treatment of rheumatoid arthritis. **Ver. Rhum. Engl. Ed.**, 64(12):789-93, 1997.
- EKMAN, P.; KIRVESKARI, J.; GRANFORS, K. Modification of disease outcome in Salmonella-infected patients by HLA-B27. **Arthritis Rheum.**, 43(7):1527-34, 2000.
- ELKAYAM, O.; YARON, I.; SHIRAZI, I.; JUDOVITCH, R.; CASPI, D.; YARON, M. Active leflunomide metabolite inhibits interleukin 1beta, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, and metalloproteinase-3 production in activated human synovial tissue cultures. **Ann Rheum Dis.**, 62(5):440-3, 2003.
- ELLIOTT, M.J.; MAINI, R.N.; FELDMANN, M.; LONG-FOX, A.; CHARLES, P.; KATSIKIS, P.; BRENNAN, F.M.; WALKER, J.; BIJL, H.; GHRAYEB, J.; et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. **Arthritis Rheum.**, 36(12):1681-90, 1993.
- FEARON, U.; VEALE, D.J. Pathways of cell activation in spondyloarthropathies. **Curr. Rheumatol. Rep.**, 3(5):435-42, 2001.

- FEHRENBACHER, J.C.; BURKEY, T.H.; NICOL, G.D.; VASKO, M.R. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta stimulate the expression of cyclooxygenase II but do not alter prostaglandin E(2) receptor mRNA levels in cultured dorsal root ganglia cells. **Pain**, 113(1-2):113-22, 2005.
- FELDMANN, M.; BRENNAN, F.M.; WILLIAMS, R.O.; WOODY, J.N.; MAINI, R.N. The transfer of a laboratory based hypothesis to a clinically useful therapy: the development of anti-TNF therapy of rheumatoid arthritis. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.**, 18(1):59-80, 2004.
- FELISAZ, N.; BOUMEDIENE, K.; GHAYOR, C.; HERROUIN, J.F.; BOGDANOWICZ, P.; GALERRA, P.; PUJOL, J.P. Stimulating effect of diacerein on TGF-beta1 and beta2 expression in articular chondrocytes cultured with and without interleukin-1. **Osteoarthritis Cartilage**, 7(3):255-64, 1999.
- FIRESTEIN, G.S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, 423(6937):356-61, 2003.
- FLEISCHMANN, R.; STERN, R.; IQBAL, I. Anakinra: an inhibitor of IL-1 for the treatment of rheumatoid arthritis. **Expert. Opin. Biol. Ther.**, 4(8):1333-44, 2004.
- FOSTER, S.J.; MCCORMICK, L.M.; NTOLOSI, B.A.; CAMPBELL, D. Production of TNF alpha by LPS-stimulated murine, rat and human blood and its pharmacological modulation. **Agents Actions**, 38 Spec No:C77-9, 1993.
- FUJIMORI, H.; MIURA, S.; KOSEKI, S.; HOKARI, R.; TSUZUKI, Y.; KOMOTO, S.; HARA, Y.; SUZUKI, H.; SERIZAWA, H.; ISHII, H. Intravital demonstration of modulation of T lymphocyte migration by CINC/gro in rat Peyer's patches. **Digestion**, 63 Suppl 1:97-102, 2001.
- FRASER, S.M.; HOPKINS, R.; HUNTER, J.A.; NEUMANN, V.; CAPELL, H.A.; BIRD, H.A. Sulphasalazine in the management of psoriatic arthritis. **Br. J. Rheumatol.**, 32(10):923-5, 1993.
- GADANGI, P.; LONGAKER, M.; NAIME, D.; LEVIN, R.I.; RECHT, P.A.; MONTESINOS, M.C.; BUCKLEY, M.T.; CARLIN, G.; CRONSTEIN, B.N. The anti-inflammatory mechanism of sulfasalazine is related to adenosine release at inflamed sites. **J. Immunol.**, 156(5):1937-41, 1996.
- GERARD, H.C.; BRANIGAN, P.J.; SCHUMACHER, H.R. JR.; HUDSON, A.P. Synovial Chlamydia trachomatis in patients with reactive arthritis/Reiter's syndrome are viable but show aberrant gene expression. **J. Rheumatol.**

25(4):734-42, 1998.

GLANT, T.T.; MIKECZ, K.; BARTLETT, R.R.; DEAK, F.; THONAR, E.J.; WILLIAMS, J.M.; MATTAR, T.; KUETTNER, K.E.; SCHLEYERBACH, R. Immunomodulation of proteoglycan-induced progressive polyarthritis by leflunomide. **Immunopharmacology**, 23(2):105-16, 1992.

GOLDENBERG, M.M. Leflunomide, a novel immunomodulator for the treatment of active rheumatoid arthritis. **Clin. Ther.**, 21(11):1837-52, 1999.

GRANFORS, K.; JALKANEN, S.; LINDBERG, A.A.; MAKI-IKOLA, O.; VON ESSEN, R.; LAHESMAA-RANTALA, R.; ISOMAKI, H.; SAARIO, R.; ARNOLD, W.J.; TOIVANEN, A. Salmonella lipopolysaccharide in synovial cells from patients with reactive arthritis. **Lancet**, 335(8691):685-8, 1990.

GRANFORS, K.; JALKANEN, S.; VON ESSEN, R.; LAHESMAA-RANTALA, R.; ISOMAKI, O.; PEKKOLA-HEINO, K.; MERILAHTI-PALO, R.; SAARIO, R.; ISOMAKI, H.; TOIVANEN, A. Yersinia antigens in synovial-fluid cells from patients with reactive arthritis. **N. Engl. J Med.**, 320(4):216-21, 1989.

HAIBEL, H.; RUDWALEIT, M.; BRAUN, J.; SIEPER, J. Six months open label trial of leflunomide in active ankylosing spondylitis. **Ann. Rheum. Dis.**, 64(1):124-6, 2005.

HAMMER, M.; ZEIDLER, H.; KLIMSA, S.; HEESEMANN, J. Yersinia enterocolitica in the synovial membrane of patients with Yersinia-induced arthritis. **Arthritis Rheum.**, 33(12):1795-800, 1990.

HART, P.H.; VITTI, G.F.; BURGESS, D.R.; WHITTY, G.A.; PICCOLI, D.S.; HAMILTON, J.A. Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 86(10):3803-7, 1989.

HASKO, G.; SZABO, C.; NEMETH, Z.H.; DEITCH, E.A. Sulphasalazine inhibits macrophage activation: inhibitory effects on inducible nitric oxide synthase expression, interleukin-12 production and major histocompatibility complex II expression. **Immunology**, 103(4):473-8, 2001.

HENDERSON, B.; PETTIPHER, E.R. Arthritogenic actions of recombinant IL-1 and tumour necrosis factor alpha in the rabbit: evidence for synergistic interactions between cytokines in vivo. **Clin. Exp. Immunol.**, 75(2):306-10, 1989.



- HERMANN, E.; FLEISCHER, B.; MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K.H. Bacteria-specific cytotoxic CD8+ T cells: a missing link in the pathogenesis of the HLA-B27-associated spondylarthropathies. **Ann. Med.**, 26(5):365-9, 1994.
- HERRMANN, M.L.; SCHLEYERBACH, R.; KIRSCHBAUM, B.J. Leflunomide: an immunomodulatory drug for the treatment of rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. **Immunopharmacology**, 47(2-3):273-89, 2000.
- HILL GASTON, J.S.; LILLICRAP, M.S. Arthritis associated with enteric infection. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.**, 17(2):219-39, 2003.
- HOLLINGWORTH, P. The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in paediatric rheumatic diseases. **Br. J. Rheumatol.**, 32(1):73-7, 1993.
- HUIZINGA, T.W.; DIJKMANS, B.A.; VAN DER VELDE, E.A.; VAN DE POWW KRAAN, T.C.; VERWEIJ, C.L.; BREEDVELD, F.C. An open study of pentoxifylline and thalidomide as adjuvant therapy in the treatment of rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, 55(11):833-6, 1996.
- HUKUDA, S.; MINAMI, M.; SAITO, T.; MITSUI, H.; MATSUI, N.; KOMATSUBARA, Y.; MAKINO, H.; SHIBATA, T.; SHINGU, M.; SAKOU, T.; SHICHIKAWA, K. Spondyloarthropathies in Japan: nationwide questionnaire survey performed by the Japan Ankylosing Spondylitis Society. **J. Rheumatol.**, 28(3):554-9, 2001.
- HWA, S.Y.; BURKHARDT, D.; LITTLE, C.; GHOSH, P. The effects of orally administered diacerein on cartilage and subchondral bone in an ovine model of osteoarthritis. **J. Rheumatol.**, 28(4):825-34, 2001.
- IIDA, M.; WATANABE, K.; TSURUFUJI, M.; TAKAISHI, K.; IIZUKA, Y.; TSURUFUJI, S. Level of neutrophil chemotactic factor CINC/gro, a member of the interleukin-8 family, associated with lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. **Infect Immun.**, 60(4):1268-72, 1992.
- ISOMAKI, P.; LUUKKAINEN, R.; TOIVANEN, P.; PUNNONEN, J. The presence of interleukin-13 in rheumatoid synovium and its antiinflammatory effects on synovial fluid macrophages from patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, 39(10):1693-702, 1996.
- JACOB, A.K.; SALLAY, P.I. Therapeutic efficacy of corticosteroid injections in the acromioclavicular joint. **Biomed. Sci. Instrum.**, 34:380-5, 1997.

- JOOSTEN, L.A.; LUBBERTS, E.; DUREZ, P.; HELSEN, M.M.; JACOBS, M.J.; GOLDMAN, M.; VAN DEN BERG, W.B. Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis. Protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction. **Arthritis Rheum.**, 40(2):249-60, 1997.
- JOVANOVIC, D.; PELLETIER, J.P.; ALAAEDDINE, N.; MINEAU, F.; GENG, C.; RANGER, P.; MARTEL-PELLE, J. Effect of IL-13 on cytokines, cytokine receptors and inhibitors on human osteoarthritis synovium and synovial fibroblasts. **Osteoarthritis Cartilage**, 6(1):40-9, 1998.
- JUE, D.M.; JEON, K.I.; JEONG, J.Y. Nuclear factor kappaB (NF-kappaB) pathway as a therapeutic target in rheumatoid arthritis. **J. Korean Med. Sci.**, 14(3):231-8, 1999.
- KALTWASSER, J.P.; NASH, P.; GLADMAN, D.; ROSEN, C.F.; BEHRENS, F.; JONES, P.; WOLLENHAUPT, J.; FALK, F.G.; MEASE, P. TREATMENT OF PSORIATIC ARTHRITIS STUDY GROUP. Efficacy and safety of leflunomide in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a multinational, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. **Arthritis Rheum.**, 50(6):1939-50, 2004.
- KANG, B.Y.; CHUNG, S.W.; IM, S.Y.; CHOE, Y.K.; KIM, T.S. Sulfasalazine prevents T-helper 1 immune response by suppressing interleukin-12 production in macrophages. **Immunology**, 98(1):98-103, 1999.
- KASAMA, T.; STRIETER, R.M.; LUKACS, N.W.; LINCOLN, P.M.; BURDICK, M.D.; KUNKEL, S.L. Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. **J. Clin. Invest.**, 95(6):2868-76, 1995.
- KEAT, A.; THOMAS, B.; DIXEY, J.; OSBORN, M.; SONNEX, C.; TAYLOR-ROBINSON, D. Chlamydia trachomatis and reactive arthritis: the missing link. **Lancet**, 1(8524):72-4, 1987.
- KEFFER, J.; PROBERT, L.; CAZLARIS, H.; GEORGOPOULOS, S.; KASLARIS, E.; KIOUSSIS, D.; KOLLIAS, G. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. **E.M.B.O.J.**, 10(13):4025-31, 1991.
- KHAN, M.A. Update on spondyloarthropathies. **Ann. Intern. Med.**, 136(12):896-907, 2002.
- KRAAN, M.C.; REECE, R.J.; BARG, E.C.; SMEETS, T.J.; FARNELL, J.;

- ROSENBERG, R.; VEALE, D.J.; BREEDVELD, F.C.; EMERY, P.; TAK, P.P. Modulation of inflammation and metalloproteinase expression in synovial tissue by leflunomide and methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis. Findings in a prospective, randomized, double-blind, parallel-design clinical trial in thirty-nine patients at two centers. **Arthritis Rheum.**, 43(8):1820-30, 2000.
- KRAAN, M.C.; SMEETS, T.J.; VAN LOON, M.J.; BREEDVELD, F.C.; DIJKMANS, B.A.; TAK, P.P. Differential effects of leflunomide and methotrexate on cytokine production in rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, 63(9):1056-61, 2004.
- LASHINA, N.I.U.; SOLOV'EV, S.K.; BALABANOVA, R.M. Treatment with megadoses of dexaven (dexamethasone) versus methypred (6-methylprednisolone) of patients with rheumatoid arthritis. **Ter. Arkh.**, 72(5):28-31, 2000.
- LEEB, B.F.; BUCSI, L.; KESZTHELYI, B.; BOHMOVA, J.; VALESOVA, M.; HAWEL, R.; MAYRHOFER, F.; SINGER, F.; AGLAS, F.; BROLL, H. Treatment of osteoarthritis of the knee joint. Efficacy and tolerance to acemetacin slow release in comparison to celecoxib. **Orthopade**, 33(9):1032-41, 2004.
- LERISALO-REPO, M. The present knowledge of the inflammatory process and the inflammatory mediators. **Pharmacol. Toxicol.**, 75 Suppl 2:1-3, 1994.
- LI, L.C.; SCUDDS, R.A.; HECK, C.S.; HARTH, M. The efficacy of dexamethasone iontophoresis for the treatment of rheumatoid arthritic knees: a pilot study. **Arthritis Care Res.**, 9(2):126-32, 1996.
- LIU, Y.; CORTINOVIS, D.; STONE, M.A. Recent advances in the treatment of the spondyloarthropathies. **Curr. Opin. Rheumatol.**, 16(4):357-65, 2004.
- LOPEZ-ARMADA, M.J.; SANCHEZ-PERNAUTE, O.; LARGO, R.; DIEZ-ORTEGO, I.; PALACIOS, I.; EGIDO, J.; HERRERO-BEAUMONT, G. Modulation of cell recruitment by anti-inflammatory agents in antigen-induced arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, 61(11):1027-30, 2002.
- LOTZ, M.; TERKELTAUB, R.; VILLIGER, P.M. Cartilage and joint inflammation. Regulation of IL-8 expression by human articular chondrocytes. **J. Immunol.**, 148(2):466-73, 1992.
- LUBBERTS, E.; JOOSTEN, L.A.; HELSEN, M.M.; VAN DEN BERG, W.B. Regulatory role of interleukin 10 in joint inflammation and cartilage destruction in murine streptococcal cell wall (SCW) arthritis. More therapeutic benefit with IL-4/IL-10 combination therapy than with IL-10 treatment alone. **Cytokine**, 10(5):361-9,

1998.

MAINI, R.N.; TAYLOR, P.C.; PALEOLOG, E.; CHARLES, P.; BALLARA, S.; BRENNAN, F.M.; FELDMANN, M. Anti-tumour necrosis factor specific antibody (infliximab) treatment provides insights into the pathophysiology of rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, 58 Suppl 1:156-60, 1999.

MANDELL, G.L. Cytokines, phagocytes, and pentoxifylline. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 25 Suppl 2:S20-2, 1995.

MARKER-HERMANN, E.; SCHWAB, P. T-cell studies in the spondyloarthropathies. **Curr. Rheumatol. Rep.**, 2(4):297-305, 2000.

MATSUKAWA, A.; YOSHIMURA, T.; MIYAMOTO, K.; OHKAWARA, S.; YOSHINAGA, M. Analysis of the inflammatory cytokine network among TNF alpha, IL-1 beta, IL-1 receptor antagonist, and IL-8 in LPS-induced rabbit arthritis. **Lab. Invest.**, 76(5):629-38, 1997.

MCKENZIE, A.N.; CULPEPPER, J.A.; DE WAAL MALEFYT, R.; BRIERE, F.; PUNNONEN, J.; AVERSA, G.; SATO, A.; DANG, W.; COCKS, B.G.; MENON, S.; et al. Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90(8):3735-9, 1993.

MEADOR, R.; HSIA, E.; KITUMNUAYPONG, T.; SCHUMACHER, H.R. TNF involvement and anti-TNF therapy of reactive and unclassified arthritis. **Clin. Exp. Rheumatol.**, 20(6 Suppl 28):S130-4, 2002.

MIAN, M.; BRUNELLESCHI, S.; TARLI, S.; RUBINO, A.; BENETTI, D.; FANTOZZI, R.; ZILLETTI, L. Rhein: an anthraquinone that modulates superoxide anion production from human neutrophils. **J. Pharm. Pharmacol.**, 39(10):845-7, 1987.

MIN, S.S.; HAN, J.S.; KIM, Y.I.; NA, H.S.; YOON, Y.W.; HONG, S.K.; HAN, H.C. A novel method for convenient assessment of arthritic pain in voluntarily walking rats. **Neurosci. Lett.**, 308(2):95-8, 2001.

MINISOLA, G.; DARDANO, B.; CALDERAZZO, L.; AVOLA, E. Clinical efficacy of sodium diclofenac in chronic juvenile polyarthritis. **Pediatr. Med. Chir.**, 12(2):169-73, 1990.

MITSUI, K.; TAKANO, K.; NAKATANI, S.; NAMBU, H.; SHIBATA, F.; NAKAGAWA, H. Chemokine production by rat macrophages stimulated with streptolysin O from

- Streptococcus pyogenes. **Microbiol. Immunol.**, 46(1):37-45, 2002.
- MOLDOVAN, F.; PELLETIER, J.P.; JOLICOEUR, F.C.; CLOUTIER, J.M.; MARTEL-PELLETIER, J. Diacerhein and rhein reduce the ICE-induced IL-1beta and IL-18 activation in human osteoarthritic cartilage. **Osteoarthritis Cartilage**, 8(3):186-96, 2000.
- MOORE, A.R.; GREENSLADE, K.J.; ALAM, C.A.; WILLOUGHBY, D.A. Effects of diacerhein on granuloma induced cartilage breakdown in the mouse. **Osteoarthritis Cartilage**, 6(1):19-23, 1998.
- MORELAND, L.W.; SCHIFF, M.H.; BAUMGARTNER, S.W.; TINDALL, E.A.; FLEISCHMANN, R.M.; BULPITT, K.J.; WEAVER, A.L.; KEYSTONE, E.C.; FURST, D.E.; MEASE, P.J.; RUDERMAN, E.M.; HORWITZ, D.A.; ARKFELD, D.G.; GARRISON, L.; BURGE, D.J.; BLOSCH, C.M.; LANGE, M.L.; MCDONNELL, N.D.; WEINBLATT, M.E. Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. **Ann. Intern. Med.**, 130(6):478-86, 1999.
- MORITA, Y.; YAMAMURA, M.; KAWASHIMA, M.; AITA, T.; HARADA, S.; OKAMOTO, H.; INOUE, H.; MAKINO, H. Differential in vitro effects of IL-4, IL-10, and IL-13 on proinflammatory cytokine production and fibroblast proliferation in rheumatoid synovium. **Rheumatol. Int.**, 20(2):49-54, 2001.
- MOTTA, A.F.; BORGES JUNIOR, N.G.; DA FONSECA, J.C.; TONUSSI, C.R. The antinociceptive effect of iontophoretic direct application of diclofenac to arthritic knee-joints of rats. **Life Sci.** 73(15):1995-2004; 2003.
- NAKAGAWA, H.; ANDO, Y.; TAKANO, K.; SUNADA, Y. Differential production of chemokines and their role in neutrophil infiltration in rat allergic inflammation. **Int Arch. Allergy Immunol.**, 115(2):137-43, 1998.
- NAKAGAWA, H.; IKESUE, A.; KATO, H.; DEBUCHI, H.; WATANABE, K.; TSURUFUJI, S.; NAGANAWA, M.; MITAMURA, M. Changes in the levels of rat interleukin 8/CINC and gelatinase in the exudate of carrageenin-induced inflammation in rats. **J. Pharmacobiodyn.**, 15(9):461-6, 1992.
- NGUYEN, M.; DOUGADOS, M.; BERDAH, L.; AMOR, B. Diacerhein in the treatment of osteoarthritis of the hip. **Arthritis Rheum.**, 37(4):529-36, 1994.
- NIIRO, H.; OTSUKA, T.; IZUHARA, K.; YAMAOKA, K.; OHSHIMA, K.; TANABE, T.; HARA, S.; NEMOTO, Y.; TANAKA, Y.; NAKASHIMA, H.; NIHO, Y. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human

neutrophils. **Blood**, 89(5):1621-8, 1997.

PADEH, S.; PASSWELL, J.H. Intraarticular corticosteroid injection in the management of children with chronic arthritis. **Arthritis Rheum.**, 41(7):1210-4, 1998.

PALAZZI, C.; OLIVIERI, I.; D'AMICO, E.; PENNESE, E.; PETRICCA, A. Management of reactive arthritis. **Expert. Opin. Pharmacother.**, 5(1):61-70, 2004.

PALAZZI, C.; OLIVIERI, I.; SALVARANI, C.; D'AMICO, E.; ALLEVA, G.; VITULLO, P.; PETRICCA, A. Reactive arthritis: advances in diagnosis and treatment. **Reumatismo**, 54(2):105-12, 2002.

PALMER, G.; BURGER, D.; MEZIN, F.; MAGNE, D.; GABAY, C.; DAYER, J.M.; GUERNE, P.A. The active metabolite of leflunomide, A77 1726, increases the production of IL-1 receptor antagonist in human synovial fibroblasts and articular chondrocytes. **Arthritis Res. Ther.**, 6(3):R181-9, 2004.

PANICO, A.; CARDILE, V.; GENTILE, B.; GARUFI, F.; FAMA, P.; BONFIGLIO, G.; RONSISVALLE, G. Effects of leflunomide on human cartilage. **Farmaco**, 58(9):983-7, 2003.

PARADA, C.A.; YEH, J.J.; JOSEPH, E.K.; LEVINE, J.D. Tumor necrosis factor receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of inflammatory hyperalgesia in rat. **Eur. J. Neurosci.**, 17(9):1847-52, 2003.

PARNHAM, M.J. Antirheumatic agents and leukocyte recruitment. New light on the mechanism of action of oxaceprol. **Biochem. Pharmacol.**, 58(2):209-15, 1999.

PARTSCH, G.; STEINER, G.; LEEB, B.F.; DUNKY, A.; BROLL, H.; SMOLEN, J.S. Highly increased levels of tumor necrosis factor-alpha and other proinflammatory cytokines in psoriatic arthritis synovial fluid. **J. Rheumatol.**, 24(3):518-23, 1997.

PASTERNAK, R.D.; WADOPIAN, N.S.; WRIGHT, R.N.; SIMINOFF, P.; GYLYS, J.A.; BUYNISKI, J.P. Disease modifying activity of HWA 486 in rat adjuvant-induced arthritis. **Agents Actions**, 21(3-4):241-3, 1987.

PELLETIER, J.P.; YARON, M.; HARAOU, B.; COHEN, P.; NAHIR, M.A.; CHOQUETTE, D.; WIGLER, I.; ROSNER, I.A.; BEAULIEU, A.D. Efficacy and

safety of diacerein in osteoarthritis of the knee: a double-blind, placebo-controlled trial. The Diacerein Study Group. **Arthritis Rheum.**, 43(10):2339-48, 2000.

PETTIPHER, E.R.; HENDERSON, B.; EDWARDS, J.C.; HIGGS, G.A. Effect of indomethacin on swelling, lymphocyte influx, and cartilage proteoglycan depletion in experimental arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, 48(8):623-7, 1989.

PELLETIER, J.P.; MINEAU, F.; FERNANDES, J.C.; DUVAL, N.; MARTEL-PELLETIER, J. Diacerhein and rhein reduce the interleukin 1beta stimulated inducible nitric oxide synthesis level and activity while stimulating cyclooxygenase-2 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes. **J. Rheumatol.**, 25(12):2417-24, 1998.

PIGUET, P.F.; GRAU, G.E.; VESIN, C.; LOETSCHER, H.; GENTZ, R.; LESSLAUER, W. Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumour necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor. **Immunology**, 77(4):510-4, 1992.

POLLICE, P.F.; ROSIER, R.N.; LOONEY, R.J.; PUZAS, J.E.; SCHWARZ, E.M.; O'KEEFE, R.J.; Oral pentoxifylline inhibits release of tumor necrosis factor-alpha from human peripheral blood monocytes: a potential treatment for aseptic loosening of total joint components. **J. Bone Joint Surg. Am.**, 83-A(7):1057-61, 2001

PROVEDINI, D.; COHEN, P. Efficacy of diacerein on the symptoms and radiographic progression of osteoarthritis. **Presse Med.**, 31(39 Pt 2):4S13-5, 2002.

PULLAR, T.; HUNTER, J.A.; CAPELL, H.A. Sulphasalazine in the treatment of rheumatoid arthritis: relationship of dose and serum levels to efficacy. **Br. J. Rheumatol.**, 24(3):269-76, 1985.

PULITI, M.; VON HUNOLSTEIN, C.; VERWAERDE, C.; BISTONI, F.; OREFICI, G.; TISSI, L. Regulatory role of interleukin-10 in experimental group B streptococcal arthritis. **Infect Immun.**, 70(6):2862-8, 2002.

RELIĆ, B.; GUICHEUX, J.; MEZIN, F.; LUBBERTS, E.; TOGNINALLI, D.; GARCIA, I.; VAN DEN BERG, W.B.; GUERNE, P.A. IL-4 and IL-13, but not IL-10, protect human synoviocytes from apoptosis. **J. Immunol.**, 166(4):2775-82, 2001.

RITTNER, H.L.; BRACK, A.; STEIN, C. Pain and the immune system: friend or foe? **Anaesthesist.**, 51(5):351-8, 2002.

- ROTHSCHILD, B.M.; TURNER, K.R.; DELUCA, M.A. Symmetrical erosive peripheral polyarthritis in the Late Archaic Period of Alabama. **Science**, 241(4872):1498-501, 1988.
- SAADE, N.E.; NASR, I.W.; MASSAAD, C.A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; JABBUR, S.J.; KANAAN, S.A. Modulation of ultraviolet-induced hyperalgesia and cytokine upregulation by interleukins 10 and 13. **Br. J. Pharmacol.**, 131(7):1317-24, 2000.
- SAIDENBERG-KERMANAC'H, N.; CORRADO, A.; LEMEITER, D.; DEVERNEJOU, M.C.; BOISSIER, M.C.; COHEN-SOLAL, M.E. TNF-alpha antibodies and osteoprotegerin decrease systemic bone loss associated with inflammation through distinct mechanisms in collagen-induced arthritis. **Bone**, 35(5):1200-7, 2004.
- SANTER, V.; SRIRATANA, A.; LOWTHER, D.A. Carrageenin-induced arthritis: A morphologic study of the development of inflammation in acute arthritis. **Semin. Arthr. Rheum.**, 13(2):160-8, 1983.
- SCHAIBLE, H.G.; EBERSBERGER, A.; VON BANCHET, G.S. Mechanisms of pain in arthritis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 966:343-54, 2002.
- SCHMELING, H.; HORNEFF, G. Infliximab in two patients with juvenile ankylosing spondylitis. **Rheumatol. Int.**, 24(3):173-6, 2004.
- SCHONGEN, R.N.; GIANNETTI, B.M.; VAN DE LEUR, E.; REINARDS, R.; GREILING, H. Effect of diacetylrhein on the phagocytosis of polymorphonuclear leucocytes and its influence on the biosynthesis of hyaluronate in synovial cells. **Arzneimittelforschung**, 38(5):744-8, 1988.
- SCHRIER, D.J.; SCHIMMER, R.C.; FLORY, C.M.; TUNG, D.K.; WARD, P.A. Role of chemokines and cytokines in a reactivation model of arthritis in rats induced by injection with streptococcal cell walls. **J. Leukoc. Biol.**, 63(3):359-63, 1998.
- SHARMA, P.K.; HOTA, D.; PANDHI, P. Biologics in rheumatoid arthritis. **J. Assoc. Physicians India**, 52:231-6, 2004.
- SHIBATA, F.; KATO, H.; KONISHI, K.; OKUMORA, A.; OCHIAI, H.; NAKAJIMA, K.; AL-MOKDAD, M.; NAKAGAWA, H. Differential changes in the concentrations of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1 and CINC-2 in exudate during rat lipopolysaccharide-induced inflammation. **Cytokine**, 8(3):222-6, 1996.



- SHIBATA, F.; KONISHI, K.; KATO, H.; KOMORITA, N.; AL-MOKDAD, M.; FUJIOKA, M.; NAKAGAWA, H. Recombinant production and biological properties of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants, GRO/CINC-2 alpha, CINC-2 beta and CINC-3. **Eur. J. Biochem.**, 231(2):306-11, 1995.
- SHIBATA, F. The role of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINCs) in inflammation. **Yakugaku Zasshi.**, 122(4):263-8, 2002.
- SIEPER, J.; BRAUN, J.; KINGSLEY, G.H. Report on the Fourth International Workshop on Reactive Arthritis. **Arthritis Rheum.**, 43(4):720-34, 2000.
- SMALL, R.E. Diclofenac sodium. **Clin. Pharm.**, 8(8):545-58, 1989.
- SPADARO, A.; RINALDI, T.; RICCIERI, V.; VALESINI, G.; TACCARI, E. Interleukin 13 in synovial fluid and serum of patients with psoriatic arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, 61(2):174-6, 2002.
- STEIN, A.; YASSOURIDIS, A.; SZOPKO, C.; HELMKE, K.; STEIN, C. Intraarticular morphine versus dexamethasone in chronic arthritis. **Pain**, 83(3):525-32, 1999.
- STEINER, G.; TOHIDAST-AKRAD, M.; WITZMANN, G.; VESELY, M.; STUDNICKA-BENKE, A.; GAL, A.; KUNAVER, M.; ZENZ, P.; SMOLEN, J.S. Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, 38(3):202-13, 1999.
- STIMPSON, S.A.; ESSER, R.E.; CARTER, P.B.; SARTOR, R.B.; CROMARTIE, W.J.; SCHWAB, J.H. Lipopolysaccharide induces recurrence of arthritis in rat joints previously injured by peptidoglycan-polysaccharide. **J. Exp. Med.**, 165(6):1688-702, 1987.
- SVENUNGSSON, B. Reactive arthritis. **Int. J. S.T.D. AIDS**, 6(3):156-60, 1995.
- SWEITZER, S.M.; DELEO, J.A. The active metabolite of leflunomide, an immunosuppressive agent, reduces mechanical sensitivity in a rat mononeuropathy model. **J. Pain**, 3(5):360-8, 2002.
- TAKANO, K.; NAKAGAWA, H. Contribution of cytokine-induced neutrophil chemoattractant CINC-2 and CINC-3 to neutrophil recruitment in lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. **Inflamm. Res.**, 50(10):503-8, 2001.

- TAMURA, T.; OHMORI, K. Diacerein suppresses the increase in plasma nitric oxide in rat adjuvant-induced arthritis. **Eur. J. Pharmacol.**, 419(2-3):269-74, 2001.
- TAMURA, T.; OHMORI, K.; NAKAMURA, K. Effect of diacerein on spontaneous polyarthritis in male New Zealand black/KN mice. **Osteoarthritis Cartilage**, 7(6):533-8, 1999.
- TAMURA, T.; SHIRAI, T.; KOSAKA, N.; OHMORI, K.; TAKAFUMI, N. Pharmacological studies of diacerein in animal models of inflammation, arthritis and bone resorption. **Eur. J. Pharmacol.**, 448(1):81-7, 2002.
- TANAHASHI, M.; KOIKE, J.; KAWABE, N.; NAKADATE-MATSUSHITA, T. Inhibitory effect of TRK-530 on inflammatory cytokines in bone marrow of rats with adjuvant arthritis. **Pharmacology**, 56(5):237-41, 1998.
- TATSUO, M.A.; CARVALHO, W.M.; SILVA, C.V.; MIRANDA, A.E.; FERREIRA, S.H.; FRANCISCHI, J.N. Analgesic and antiinflammatory effects of dipyron in rat adjuvant arthritis model. **Inflammation**, 18(4):399-405, 1994.
- THORBECKE, G.J.; SHAH, R.; LEU, C.H.; KURUVILLA, A.P.; HARDISON, A.M.; PALLADINO, M.A. Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89(16):7375-9, 1992.
- TODD, P.A.; SORKIN, E.M. Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. **Drugs**, 35(3):244-85, 1988.
- TOIVANEN, A.; TOIVANEN, P. Reactive arthritis. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.**, 18(5):689-703, 2004.
- TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Bradykinin-induced knee joint incapacitation involves bradykinin B2 receptor mediated hyperalgesia and bradykinin B1 receptor-mediated nociception. **Eur. J. Pharmacol.**, 326(1):61-5, 1997.
- TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, 48(3):421-7, 1992.
- TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Tumour necrosis factor-alpha mediates carrageenin-induced knee-joint incapacitation and also triggers overt nociception in previously inflamed rat knee-joints. **Pain**, 82(1):81-7, 1999.

- VALE, M.L.; BENEVIDES, V.M.; SACHS, D.; BRITO, G.A.; DA ROCHA, F.A.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Antihyperalgesic effect of pentoxifylline on experimental inflammatory pain. **Br. J. Pharmacol.**, 143(7):833-44, 2004.
- VALE, M.L.; MARQUES, J.B.; MOREIRA, C.A.; ROCHA, F.A.; FERREIRA, S.H.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 304(1):102-8, 2003.
- VAN DE LOO, A.A.; VAN DEN BERG, W.B. Effects of murine recombinant interleukin 1 on synovial joints in mice: measurement of patellar cartilage metabolism and joint inflammation. **Ann. Rheum. Dis.**, 49(4):238-45, 1990.
- VAN DEN BERG, W.B. Anti-cytokine therapy in chronic destructive arthritis. **Arthritis Res.**, 3(1):18-26, 2000.
- VAN DER HORST-BRUIJNSMA, I.E.; CLEGG, D.O.; DIJKMANS, B. Treatment of ankylosing spondylitis with disease modifying antirheumatic drugs. **Clin. Exp. Rheumatol.**, 20(6 Suppl 28):S67-70, 2002.
- WAHL, C.; LIPTAY, S.; ADLER, G.; SCHMID, R.M. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. **J. Clin. Invest.**, 101(5):1163-74, 1998.
- WATANABE, K.; KINOSHITA, S.; NAKAGAWA, H. Purification and characterization of cytokine-induced neutrophil chemoattractant produced by epithelioid cell line of normal rat kidney (NRK-52E cell). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 161(3):1093-9, 1989.
- WATANABE, K.; KOIZUMI, F.; KURASHIGE, Y.; TSURUFUJI, S.; NAKAGAWA, H. Rat CINC, a member of the interleukin-8 family, is a neutrophil-specific chemoattractant in vivo. **Exp. Mol. Pathol.**, 55(1):30-7, 1991.
- WATKINS, L.R.; GOEHLER, L.E.; RELTON, J.; BREWER, M.T.; MAIER, S.F. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) hyperalgesia. **Brain Res.**, 692(1-2):244-50, 1995.
- WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, 2(12):973-85, 2003.

- WEINBLATT, M.E.; KEYSTONE, E.C.; FURST, D.E.; MORELAND, L.W.; WEISMAN, M.H.; BIRBARA, C.A.; TEOH, L.A.; FISCHKOFF, S.A.; CHARTASH, E.K. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. **Arthritis Rheum.**, 48(1):35-45, 2003.
- WIENECKE, T.; GOTZSCHE, P.C. Paracetamol versus nonsteroidal anti-inflammatory drugs for rheumatoid arthritis. **Rheum.**, 48(1):35-45, 2004.
- WILLIAMS, R.O.; FELDMANN, M.; MAINI, R.N. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89(20):9784-8, 1992.
- WILLIAMS, R.O.; MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L.; FELDMANN, M.; MAINI, R.N. Evaluation of TNF-alpha and IL-1 blockade in collagen-induced arthritis and comparison with combined anti-TNF-alpha/anti-CD4 therapy. **J. Immunol.**, 165(12):7240-5, 2000.
- WINKELSTEIN, B.A.; RUTKOWSKI, M.D.; SWEITZER, S.M.; PAHL, J.L.; DELEO, J.A. Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and selective cytokine expression but differential behavioral responses to pharmacologic treatment. **J. Comp. Neurol.**, 439(2):127-39, 2001.
- WOODS, J.M.; KATSCHKE, K.J.; TOKUHIRA, M.; KURATA, H.; ARAI, K.I.; CAMPBELL, P.L.; KOCH, A.E. Reduction of inflammatory cytokines and prostaglandin E2 by IL-13 gene therapy in rheumatoid arthritis synovium. **J. Immunol.**, 165(5):2755-63, 2000.
- WOODS, J.M.; AMIN, M.A.; KATSCHKE, K.J. JR.; VOLIN, M.V.; RUTH, J.H.; CONNORS, M.A.; WOODRUFF, D.C.; KURATA, H.; ARAI, K.; HAINES, G.K.; KUMAR, P.; KOCH, A.E. Interleukin-13 gene therapy reduces inflammation, vascularization, and bony destruction in rat adjuvant-induced arthritis. **Hum. Gene Ther.**, 13(3):381-93, 2002.
- WOODS, J.M.; KATSCHKE, K.J.JR.; TOKUHIRA, M.; KURATA, H.; ARAI, K.I.; CAMPBELL, P.L.; KOCH, A.E. Reduction of inflammatory cytokines and prostaglandin E2 by IL-13 gene therapy in rheumatoid arthritis synovium. **J. Immunol.**, 165(5):2755-63, 2000.
- WYNN, T.A. IL-13 effector functions. **Annu. Ver. Immunol.**, 21:425-56, 2003.
- YARON, M.; SHIRAZI, I.; YARON, I. Anti-interleukin-1 effects of diacerein and rhein

in human osteoarthritic synovial tissue and cartilage cultures. **Osteoarthritis Cartilage**, 7(3):272-80, 1999.

YIN, Z.; BRAUN, J.; NEURE, L.; WU, P.; LIU, L.; EGGENS, U.; SIEPER, J. Crucial role of interleukin-10/interleukin-12 balance in the regulation of the type 2 T helper cytokine response in reactive arthritis. **Arthritis Rheum.**, 40(10):1788-97, 1997.

YIN, Z.; SIEGERT, S.; NEURE, L.; GROLMS, M.; LIU, L.; EGGENS, U.; RADBRUCH, A.; BRAUN, J.; SIEPER, J. The elevated ratio of interferon gamma-/interleukin-4-positive T cells found in synovial fluid and synovial membrane of rheumatoid arthritis patients can be changed by interleukin-4 but not by interleukin-10 or transforming growth factor beta. **Rheumatology**, 38(11):1058-67, 1999.

YOSHINO, S.; MURATA, Y.; OHSAWA, M. Successful induction of adjuvant arthritis in mice by treatment with a monoclonal antibody against IL-4. **J Immunol.**, 161(12):6904-8, 1998.

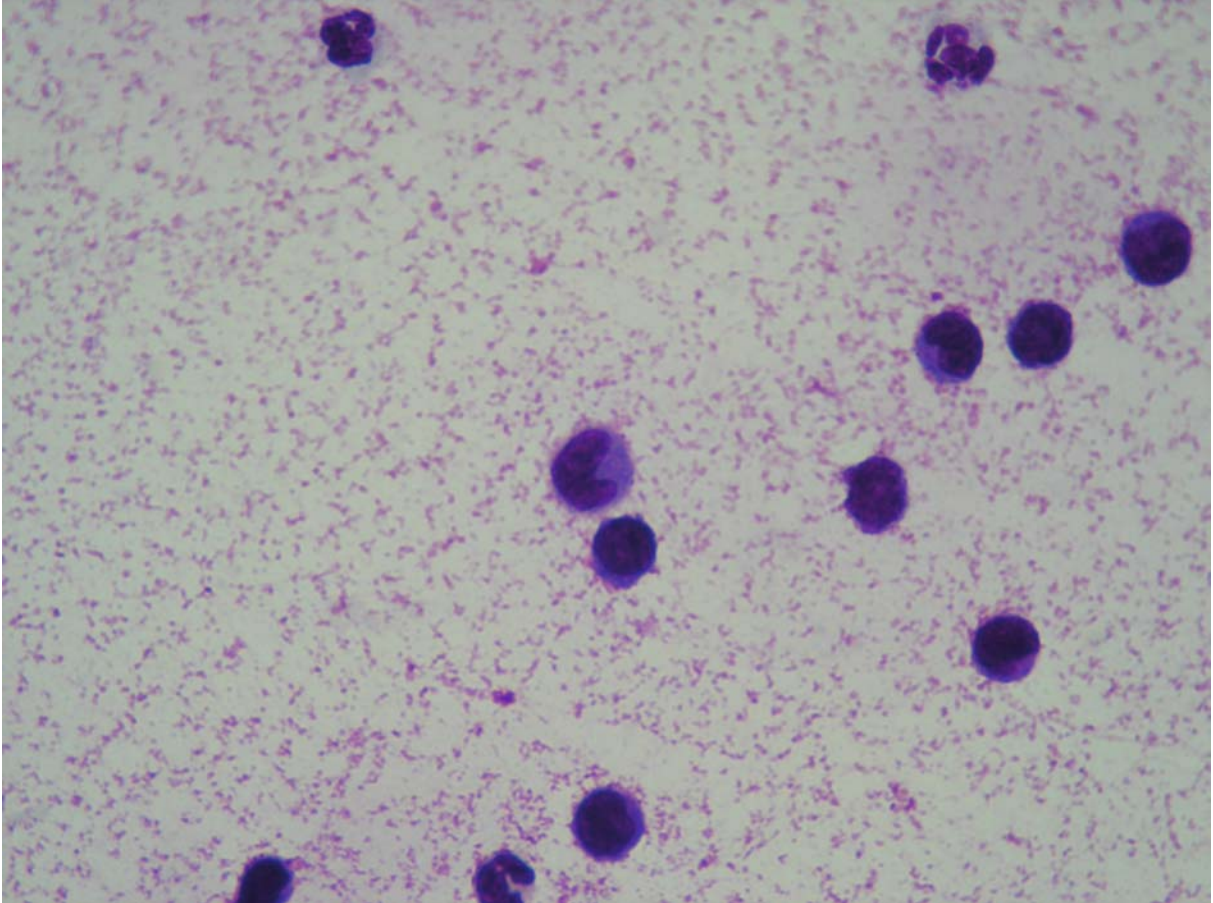
YU, D.T. Pathogenesis of reactive arthritis. **Intern. Med.**, 38(2):97-101, 1999.

**ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS DURANTE O MESTRADO**

- 1 - BRESSAN, E.; FARGES, R.C.; FERRARA, P.; TONUSSI, C.R. Comparison of two PBR ligands with classical antiinflammatory drugs in LPS-induced arthritis in rats. **Life Science**, 72(23):2591-2601, 2003.
  
- 2 - GAVIOLI, E.C.; DUARTE, F.S.; BRESSAN, E.; FERRARA, P.; FARGES, R.C.; LIMA, T.C.M. Antidepressant-like effect of Ro5-4886, a peripheral-type benzodiazepine receptor ligand, in forced swimming test. **European Journal of Pharmacology**, 471:21-26, 2003.
  
- 3 - BRESSAN, E.; CUNHA, F.Q.; TONUSSI, C.R. Anti-CINC-1 inhibits nociception, edema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis: comparison with anti-TNF- $\alpha$  and anti-IL-1 $\beta$ . **Cytokine**. Artigo submetido.

## FOTOS DAS CÉLULAS PRESENTES NO FLUIDO SINOVIAL

### 1 – Células mononucleares presentes no fluido sinovial de ratos



## 2 – Células polimorfonucleares presentes no fluido sinovial de ratos

