

Universidade Federal do Rio de Janeiro

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTI-
INFLAMATÓRIO DE PROTÓTIPOS CANDIDATOS A
FÁRMACO PARA O TRATAMENTO DA ARTRITE
REUMATOIDE**

Ewerton Alves Portela dos Santos.

2015

ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTI- INFLAMATÓRIO DE PROTÓTIPOS CANDIDATOS A FÁRMACO PARA O TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE

Ewerton Alves Portela dos Santos.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como requisito à obtenção do título de Doutor em Farmacologia e Química Medicinal.

Orientadora: Prof^a Ana Luisa Palhares de Miranda.
Laboratório de Estudos em Farmacologia Experimental- LEFEx

**Rio de Janeiro,
Fevereiro de 2015.**

FICHA CATALOGRÁFICA

dos Santos, Ewerton Alves Portela.

Estudo do mecanismo de ação anti-inflamatório de protótipos candidatos a fármaco para o tratamento da artrite reumatoide/ Ewerton Alves Portela dos Santos. Rio de Janeiro: UFRJ, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), 2015.

xxiii, 165f.; 31cm

Orientador (a): Ana Luisa Palhares de Miranda

Tese (Doutorado)- UFRJ/ Instituto de Ciências Biomédicas/ Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal (PPGFQM), 2015.

Referências Bibliográficas: f. 132- 165.

1. Artrite reumatoide 2. Anti-TNF- α 3. Anti-inflamatórios 4. Desenvolvimento de fármaco 5. LASSBio-1247. I. Miranda, A. L. P. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal-ICB. III. Título.

ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIO DE PROTÓTIPOS CANDIDATOS A FÁRMACO PARA O TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE

Ewerton Alves Portela dos Santos

Orientadora: Ana Luisa Palhares de Miranda, Faculdade de Farmácia- UFRJ.

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, no Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ, como parte dos requisitos necessários a obtenção do Título de Doutor em Farmacologia e Química Medicinal.

Aprovada por:

Prof^a Ana Luisa Palhares de Miranda, Faculdade de Farmácia- UFRJ.

Prof^a Cláudia Farias Benjamim, Instituto de Ciências Biomédicas- UFRJ.

Prof^a Marsen Garcia Pinto Coelho, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes-
UERJ

Prof. Paulo de Assis Melo, Instituto de Ciências Biomédicas- UFRJ.

Prof. Valber da Silva Frutuoso, Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ

**Rio de Janeiro,
Fevereiro de 2015.**

Esta tese foi originada a partir de trabalhos experimentais realizados no Laboratório de Estudos em Farmacologia Experimental (LEFEx) e, em um momento inicial, no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®), situados no Departamento de Biotecnologia Farmacêutica, da Faculdade de Farmácia, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a orientação da Prof^a Ana Luisa Palhares de Miranda e com fomento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



Laboratório de Estudos em Farmacologia Experimental

Dedico esta tese aos meus avós que, pouco alfabetizados ou até mesmo analfabetos, tinham claro bom-senso da necessidade de estudar, ensinaram aos seus filhos e hoje tem um neto na pós-graduação. Dedico também aos meus pais pelo amor irrestrito. Pessoas boas são inesquecíveis.

AGRADECIMENTOS

- A Deus pelo amor da família e de amigos, oportunidades vividas, pela sustentação e força pessoal em momentos de desacordos e por me ajudar a cada dia a compreender o que não parece harmônico;
- À minha mãe Zuila Maria: uma grande batalhadora, incentivadora e torcedora do meu trabalho. Através de gestos, me mostrou que o sentido da vida está no carinho e cuidado das pessoas que nos amam;
- Ao meu pai Gilton Portela que sempre foi um exemplo de vida. Sou extremamente grato a todo seu esforço, amor, dedicação e ensinamentos;
- À minha namorada Carolina Martins, não só pela paciência, carinho e atenção, mas também pelas trocas de ideias científicas que foram fundamentais na minha trajetória;
- À Professora Ana Luisa Palhares de Miranda e ao LEFEx pela infraestrutura de trabalho e pela oportunidade concedida que me encaminhou em um novo horizonte de conhecimentos. Nestes oito anos de ambiente de laboratório, pude conhecer pessoas excepcionais e viver momentos muito bons;
- Ao Professor Eliezer J. Lacerda Barreiro pelos ensinamentos científicos adquiridos durante os seminários e por permitir a continuidade dos estudos com as moléculas do LASSBio®, bem como a oportunidade concedida que contribuiu com parte do meu desenvolvimento pessoal e profissional;
- Aos Professores Carlos Alberto Manssour Fraga e Lídia Moreira Lima pelas sugestões e críticas prestadas a este trabalho;
- À Professora Cláudia Farias Benjamim pela revisão deste trabalho;
- Aos professores da banca pelo aceite do convite;
- Ao mestre Fernando Rodrigues de Sá Alves pelo compromisso ético em sintetizar as moléculas avaliadas neste trabalho, mesmo após ter decidido continuar seus estudos na Alemanha;
- Ao Dr. Cleverton Kleiton (KC) pelas discussões farmacológicas e os ensinamentos no laboratório. Um grande amigo que adquiri nestes tempos;
- À Rafaela Vieira pelo bom convívio e pelas dosagens de PGE₂;
- À Prof^a Marina Vieira Martins que, desde sua época na pós-graduação, sempre me ajudou com conselhos pertinentes;
- À D. Maria Emília e ao seu Ari pela confiança;

- Aos amigos: Prof. Jorge Tributino, Natália Linhares (Nati), Celimar, Bruna Roedel, Bianca Waruar, Simone Rocha, Mariana Giorgi, Mariana Soares, Monique Teixeira, Vinícius Alves, Bárbara Félix, Caroline, Mila Fumian, Fabiana Chaves e Jéssica Farias não só pelas conversas científicas e amizade, mas também pelos ótimos momentos de descontração e risadas;
- Aos amigos do LASSBio®: Prof. Arthur Kümmerle, Prof^a. Letícia Barbosa, Prof. Nailton do Nascimento, Prof^a Renata Lacerda, Alexandra Basílio, Ciro Gonçalves, Daniel Amaral, Daniel Tonin, Isabelle Carine, Marina Amaral, Miguel Rocha, Roberta Tesch, Rodolfo Maia, Rosana Freitas, Thaíse Martins, Tiago da Silva;
- Aos meus primos Anderson, Emerson e Peterson Medeiros, que considero como irmãos que não tive e também suas famílias;
- Ao amigo Júlio César pelas conversas e pela torcida;
- Às técnicas do biotério Josi e Dilma que, sempre bastante atenciosas, atenderam prontamente às solicitações necessárias que permitiram a execução deste trabalho;
- Aos professores do Programa da Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal pelos ensinamentos;
- Aos órgãos de fomento: FAPERJ e principalmente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa.

Uma decisão pode implicar em um ato de coragem, exigir grandes esforços para superar nossos próprios limites e proporcionar grandes mudanças.

RESUMO

ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIO DE PROTÓTIPOS CANDIDATOS A FÁRMACO PARA O TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE

Ewerton Alves Portela dos Santos

Orientador (a): Ana Luisa Palhares de Miranda

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Farmacologia e Química Medicinal.

A Artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica multifatorial caracterizada por dores contínuas intensas e incapacitantes onde o TNF- α exerce papel crucial. Assim, a redução da quantidade de TNF- α constitui uma estratégia adequada no tratamento da AR. Neste contexto, LASSBio-1247 e LASSBio-1248 foram selecionados como protótipos candidatos a fármacos para tratar a AR por apresentarem efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório e reduzirem a produção de TNF- α . Este trabalho mostrou que a diminuição da produção de TNF- α promovido por LASSBio-1247 está relacionada com seu mecanismo de ação porque sua CI_{50} (12,9 μ M) é cerca de dez vezes menor que a concentração capaz de reduzir a viabilidade celular. Mais ainda, os protótipos exibiram efeito anti-hipernociceptivo em modelos induzidos por LPS ou capsaicina (aproximadamente 50%, AUC) sem antagonizar os canais TRPV1. Estes resultados sugerem a possibilidade destes compostos inibirem vias de sinalização importantes para produzir TNF- α . Já o efeito antinociceptivo de LASSBio-1248 envolve a participação de receptores canabinoides sem interferência na temperatura corporal ou aspectos nociceptivos neurogênicos. Finalmente, havia a necessidade de determinar a eficácia destes derivados no modelo de AR. LASSBio-1247 administrado 2x/dia (v.o) reverteu a hipernocicepção em diversos momentos da avaliação. Este efeito pode ter acontecido em virtude de LASSBio-1247 diminuir o TNF- α sistêmico (62%), bem como a quantidade de TNF- α (47%), PGE₂ (63%) e

leucócitos totais na articulação (42%) (os resultados foram comparados ao grupo-controle). Ainda, tanto o efeito antiquimiotático quanto a redução de TNF- α articular podem ter contribuído para diminuir o número de leucócitos totais. Em conjunto, estes resultados apontam para o LASSBio-1247 como protótipo candidato a fármaco promissor para o tratamento por v.o de pacientes com AR.

Palavras-chave: Artrite reumatoide; Anti-TNF- α ; Anti-inflamatórios; Desenvolvimento de fármacos; LASSBio-1247.

**Rio de Janeiro,
Fevereiro de 2015.**

ABSTRACT

STUDY OF ANTI-INFLAMMATORY'S MODE OF ACTION FROM PROTOTYPE DRUGS CANDIDATE TO TREAT RHEUMATOID ARTHRITIS.

Ewerton Alves Portela dos Santos.

Orientador (a): Ana Luisa Palhares de Miranda

Abstract de Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Farmacologia e Química Medicinal.

Rheumatoid Arthritis (RA) is a multifactorial chronic inflammatory disease characterized by continuous debilitating pain where TNF- α plays crucial role. Thus, the reduction of TNF- α level is an important strategy to treat RA. Therewith, LASSBio-1247 and LASSBio-1248 were selected as prototype drug candidate to treat RA because their antinociceptive and anti-inflammatory effects as well as the reduction of TNF- α level, as previously reported. This study showed that the reduction of TNF- α production promoted by LASSBio-1247 is related to its mechanism of action because its IC₅₀ (12,9 μ M) is about tenfold fewer than its concentration that decreases cell viability. Furthermore, the prototypes exhibited anti-hypernociceptive effect in LPS and capsaicin models (around 50%, AUC) without antagonizing the TRPV1 receptor. These results suggest the possibility of prototypes acting as an inhibitor of signaling pathways important to TNF- α production. Moreover, LASSBio-1248's antinociceptive effect involves cannabinoid receptors but it cannot interfere with body temperature or in neurogenic aspects. Finally, we have checked compounds' efficacy in the mBSA-induced delayed-type hypersensitivity (RA model). LASSBio-1247 by oral pathway twice/day reversed hypernociception at several points. It must be related to its ability to reduce TNF- α level (62%) at plasma as well as TNF- α (47%), PGE₂ (63%) and the number of total leukocytes in the synovial fluid (42%) (all compounds' results were

compared to control-group). Both anti-chemotactic effect as TNF- α levels reduction promoted by LASSBio-1247 must be affected the cell migration to joint. Together, these results point out LASSBio-1247 as a promising orally prototype drug candidate to treat RA.

Key words: Rheumatoid arthritis, anti-TNF- α , Anti-inflammatory drugs; Drug development; LASSBio-1247.

**Rio de Janeiro,
Fevereiro de 2015.**

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	24
1.1 PATOGÊNESE E ASPECTOS CLÍNICOS DA ARTRITE REUMATOIDE	25
1.1.1 O processo álgico	28
1.1.1.1 Canais de potencial transitório	31
1.1.1.2 Prostanoides	32
1.2 FISIOPATOLOGIA DA AR	34
1.2.1 Citocinas pró-inflamatórias	40
1.2.1.1 Fator de Necrose Tumoral <i>alpha</i> (TNF- α)	40
1.2.2 Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK)	44
1.2.3 Fator de transcrição nuclear <i>kappa</i> B (NF-κB)	48
1.2.4 Janus quinase (JAK)	51
1.2.5 Antinocicepção e imunossupressão mediados pelo sistema canabinoide	53
1.3 MODELO DE ARTRITE REUMATOIDE INDUZIDA POR ANTÍGENO (AIA)	54
1.4 FARMACOTERAPIA DA AR	56
1.4.1 Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs)	57
1.4.2 Glicocorticoides	58
1.4.3 Medicamentos antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs)	60
1.4.3.1 Inibidor JAK3	61
1.4.4 Fármacos biotecnológicos	63
2. JUSTIFICATIVA	68
2.1 DERIVADOS <i>N</i> -ACILIDRAZÔNICOS INDÓLICOS	71
3. OBJETIVOS	73
3.1 OBJETIVO GERAL	74
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	74
4. MATERIAIS E MÉTODOS	76
4.1 MATERIAL	77
4.1.1 Animais	77

4.1.2 Reagentes	77
4.1.3 Soluções	79
4.1.3.1 Solução Salina 0,9%	79
4.1.3.2 Solução de Goma Arábica 5%	79
4.1.3.3 Solução PBS	79
4.1.3.4 Solução de formalina 2,5%.....	79
4.1.3.5 Solução de dosagem de proteína.....	79
4.1.3.6 Solução de capsaicina.....	79
4.1.3.7 Solução de azul de Evans	79
4.2 DOSAGEM DE TNF-α EM CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS ESTIMULADOS POR LPS	80
4.2.1 Determinação da potência inibitória (CI₅₀) sobre a produção da citocina TNF-α	80
4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	80
4.4 ENSAIO DE HIPERNOCICEPÇÃO TÉRMICA INDUZIDA POR LPS OU CAPSAICINA	81
4.5 INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRPV1: ESTUDOS DE IMAGEAMENTO DE CÁLCIO EM CÉLULAS HEK-293	82
4.6 MODELO DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 2,5%	83
4.6.1 Modelo de nocicepção induzida por formalina 2,5%: uso de antagonistas canabinoides	84
4.7 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL	85
4.8 ENSAIO DE HIPERNOCICEPÇÃO MECÂNICA INDUZIDO POR BSA_m	86
4.9 POTENCIAL ULCEROGÊNICO	87
4.10 SEPARAÇÃO DE NEUTRÓFILOS POLIMORFONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA DE RATOS POR GRADIENTE DE PERCOLL: MIGRAÇÃO CELULAR	88
4.11 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	89
4.12 OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) E DE PLASMA POBRE EM PLAQUETAS (PPP)	89
4.13 ENSAIO DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR ÁCIDO ARAQUIDÔNICO (AA)	90
4.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	90
5. RESULTADOS	91

5.1 DOSAGEM DA PRODUÇÃO DE TNF- α EM CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS ESTIMULADOS COM LPS.....	92
5.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS	96
5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERNOCICEPTIVO INDUZIDO POR LPS ...	97
5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERNOCICEPTIVO EM MODELO INDUZIDO POR CAPSAICINA.....	99
5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS NAH INDÓLICOS SOBRE O RECEPTOR TRPV1	101
5.6 EFEITO ANTINOCICEPTIVO DOS DERIVADOS NAH INDÓLICOS NO MODELO DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 2,5%.....	102
5.6.1 Avaliação da participação dos receptores canabinoides no efeito antinociceptivo dos derivados NAH indólicos	103
5.7 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM DERIVADOS NAH INDÓLICOS	105
5.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIQUIMIOTÁTICO DOS DERIVADOS NAH INDÓLICOS.....	106
5.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERNOCICEPTIVO MECÂNICO NO MODELO DE AIA	107
5.9.1 Dosagem de TNF-α de animais com AIA.....	112
5.9.2 Dosagem de PGE₂ de animais com AIA	114
5.10 POTENCIAL ULCEROGÊNICO	115
5.11 AVALIAÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR AA.....	115
6. DISCUSSÃO	118
7. CONCLUSÕES.....	130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1: Surgimento de luxações no metacarpo e no pulso caracterizam a fase intermediária da AR. Estado avançado da doença: mão em zigzag com lesão poli articular e simétrica com luxação e fusão das articulações aparentes. O desvio ulnar é comum.....	27
Figura 2: Estímulos nocivos provocam a liberação de mediadores inflamatórios que interagem com seus receptores e ativam a PKA e PKC que, por sua vez, fosforilam os canais TRPV1. Esta ação permite que concentrações menores de prótons ative os canais de cátion e facilitam a entrada de Na ⁺ e Ca ²⁺ e a consequente sensibilização do nociceptor.....	29
Figura 3: Cascata de formação de prostanoídes a partir do ácido araquidônico.....	33
Figura 4: Representação da estrutura de uma articulação normal comparada com alterações patofisiológicas da articulação acometida pela AR.....	35
Figura 5: Interações intercelulares e liberação de mediadores pró-inflamatórios contribuem para a amplificação e magnitude da inflamação durante a AR.....	38
Figura 6: Estágio inicial da doença onde há estreitamento do espaço articular e erosões marginais (seta amarela) e; AR avançada com perda da cartilagem articular, estreitamento dos espaços de quase todas as articulações (seta amarela) e desvio ulnar dos dedos (seta vermelha)	39
Figura 7: Cascata de ativação das MAPKs.	45
Figura 8: A transcrição gênica de proteínas e mediadores inflamatórios a partir da ativação do NF- κ B	49
Figura 9: Ativação da via de sinalização intracelular JAK/STAT e a regulação da transcrição gênica induzidas por citocinas	52
Figura 10: Cascata de eventos que desencadeia a hipernocicepção em animais com artrite induzida por BSA.....	56
Figura 11: Tofacitinibe é um inibidor JAK3 administrado por via oral indicado para o tratamento da AR.	62
Figura 12: Estrutura dos derivados <i>N</i> -acilidrazônicos indólicos LASSBio-1247 e LASSBio-1248.....	71
Figura 13: Esquema representativo do ensaio de hipernocicepção térmica induzida por LPS.	82

Figura 14: Esquema representativo do ensaio de hipernocicepção térmica induzida por capsaicina.	82
Figura 15: Esquema representativo do ensaio de nocicepção induzida por formalina 2,5%.	84
Figura 16: Esquema representativo do ensaio de nocicepção induzida por formalina 2,5%: avaliação do sistema canabinoide.	85
Figura 17: Esquema representativo da avaliação da temperatura corporal de camundongos.....	86
Figura 18: Esquema de imunização dos animais e indução de AIA.....	86
Figura 19: Utilização do von Frey eletrônico para a avaliação da resposta hipernociceptiva no modelo de AIA	87

LISTA DE GRÁFICOS

Página

Gráfico 1: Efeito inibitório de LASSBio-1247 sobre a produção de TNF- α é dependente da concentração.....	93
Gráfico 2: Efeito inibitório de LASSBio-1248 sobre a produção de TNF- α é dependente da concentração.....	93
Gráfico 3: Curva concentração-resposta do derivado LASSBio-1247 no modelo de dosagem de TNF- α proveniente de macrófagos peritoneais estimulados por LPS...	94
Gráfico 4: Curva concentração-resposta do derivado LASSBio-1248 no modelo de dosagem de TNF- α proveniente de macrófagos peritoneais estimulados por LPS...	95
Gráfico 5: Efeito de LASSBio-1247, LASSBio-1248 e da talidomida sobre a viabilidade celular no ensaio de MTT.....	96
Gráfico 6: Efeito anti-hipernociceptivo de LASSBio-1247 e LASSBio-1248 no modelo de hipernocicepção térmica induzida por LPS.	98
Gráfico 7: Efeito anti-hipernociceptivo global dos derivados NAH indólicos obtidos pelo cálculo da área sob a curva (AUC) no modelo de hipernocicepção térmica induzida por LPS.	98
Gráfico 8: Efeito anti-hipernociceptivo dos derivados NAH indólicos LASSBio-1247 e LASSBio-1248 no modelo de hipernocicepção térmica induzida por capsaicina ...	100
Gráfico 9: Efeito anti-hipernociceptivo global dos derivados NAH indólicos LASSBio-1247 e LASSBio-1248 obtido pelo cálculo da área sob a curva (AUC).....	100
Gráfico 10: Os derivados NAH indólicos não alteram o influxo de Ca ⁺² em células HEK-293 que expressam o canal TRPV1 humano.	101
Gráfico 11: Efeito antinociceptivo dos derivados NAH indólicos LASSBio-1247 e LASSBio-1248 nas fases neurogênica e inflamatória do modelo de nocicepção induzido por formalina 2,5%.....	102
Gráfico 12: Avaliação da participação dos receptores canabinoides durante a fase inflamatória do modelo de nocicepção induzida por formalina 2,5%.....	103
Gráfico 13: Avaliação da participação dos receptores canabinoides na modulação do efeito antinociceptivo dos derivados LASSBio-1247 e LASSBio-1248 na fase inflamatória do modelo de nocicepção induzida por formalina 2,5%.....	104
Gráfico 14: O tratamento com LASSBio-1247 e LASSBio-1248 não altera a termorregulação corporal dos animais.	105

Gráfico 15: Avaliação do efeito antiquimiotático de LASSBio-1247 e LASSBio-1248 sobre a migração de neutrófilos.	106
Gráfico 16: Avaliação da atividade anti-hipernociceptiva do derivado LASSBio-1247 e da indometacina no ensaio de hipernocicepção mecânica durante 24 h no modelo de AIA.	108
Gráfico 17: Avaliação da atividade anti-hipernociceptiva de LASSBio-1248 e da indometacina no ensaio de hipernocicepção mecânica durante 24 h no modelo de AIA.	108
Gráfico 18: Avaliação da atividade anti-hipernociceptiva de LASSBio-1247 e da indometacina no ensaio de hipernocicepção mecânica de 25 a 97 h após a indução por BSA _m	109
Gráfico 19: Avaliação da atividade anti-hipernociceptiva de LASSBio-1248 e da indometacina no ensaio de hipernocicepção mecânica de 25 a 97 h após a indução por BSA _m	110
Gráfico 20: Efeito anti-hipernociceptivo global de LASSBio-1247, LASSBio-1248 e da indometacina obtidos pelo cálculo da área sob a curva (AUC) nas primeiras 24 h do modelo de AIA.	111
Gráfico 21: Efeito anti-hipernociceptivo global de LASSBio-1247, LASSBio-1248 e da indometacina obtidos pelo cálculo da área sob a curva (AUC) na fase crônica do modelo de AIA.	111
Gráfico 22: Os derivados LASSBio-1247 e LASSBio-1248 reduzem a quantidade de leucócitos totais do lavado articular no modelo de AIA.	112
Gráfico 23: Efeito de LASSBio-1247, LASSBio-1248 e da indometacina sobre as quantidades de TNF- α plasmático em camundongos com AIA.	113
Gráfico 24: LASSBio-1247 reduz a quantidade de TNF- α articular em camundongos do modelo de AIA.	114
Gráfico 25: LASSBio-1247 reduz a quantidade intra-articular de PGE ₂ do modelo de AIA em camundongos.	115
Gráfico 26: LASSBio-1247 reduz a agregação plaquetária induzida por AA em um efeito dependente da concentração.	116
Gráfico 27: Curva concentração-resposta do derivado LASSBio-1247 no modelo de agregação plaquetária induzida por AA.	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características socioeconômicas associadas com a AR.....	70
Tabela 2: Efeito inibitório de LASSBio-1247 sobre a produção de TNF- α proveniente de macrófagos peritoneais estimulados por LPS.	94
Tabela 3: Efeito inibitório de LASSBio-1248 sobre a produção de TNF- α proveniente de macrófagos peritoneais estimulados por LPS.	95
Tabela 4: Efeito inibitório de LASSBio-1247 sobre a agregação plaquetária induzida por AA.	117

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Fármacos biotecnológicos indicados para o tratamento da AR.....	65
----------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AA- ácido araquidônico;
AEA- anandamida;
ACR- Colegiado Americano de Reumatismo;
AIA- artrite induzida por antígeno;
AIEs- anti-inflamatórios esteroidais;
AINEs- anti-inflamatórios não-esteroidais;
AR- artrite reumatoide;
AUC- área sob a curva;
CB- canabinoide;
CFA- adjuvante de Freund completo;
Cl₅₀- concentração inibitória para cinquenta por cento do efeito máximo;
COX- cicloxigenase;
DE₅₀- dose eficaz para 50% do efeito máximo;
DMARD- medicamentos antirreumáticos modificadores da doença;
DMSO- dimetilsulfóxido;
DNA- ácido desoxirribonucleico;
DRG- gânglio da raiz dorsal;
EPM- erro padrão da média;
ERK- quinase regulada por sinal extracelular;
EULAR- Liga Europeia contra o Reumatismo;
FAAH- amido hidrolase de ácidos graxos;
fMLP- formil-metionil-leucil-fenilalanina;
GM-CSF- fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos;
IgG- imunoglobulina G;
IL- interleucina;
iNOS- óxido nítrico sintase induzida;
I. P- intraperitoneal;
I. PI- intraplantar;
IKK- I *kappa* B quinase;
JAK- janus quinase;
JNK- quinase N-terminal c-Jun;

LASSBio®- Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas;
LEFEx- Laboratório de Estudos em Farmacologia Experimental;
LOX- lipoxigenase;
LPS- lipopolissacarídeo;
MAGL- monoacilglicerol lipase;
MAPK- proteína quinase ativada por mitógeno;
mBSA- albumina bovina sérica metilada;
MHC- complexo principal de histocompatibilidade;
MTT- 3, -(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difenil tetrazólico;
n- número de animais;
NAH- *N*-acilidrazona;
NETs- *neutrophil extracellular traps*;
NF- κ B- fator de transcrição nuclear *kappa* B;
NO- óxido nítrico;
OMS- Organização Mundial de Saúde;
PDGF- fator de crescimento derivado de plaqueta;
PGD₂- prostaglandina D₂;
PGE₂- prostaglandina E₂;
PGI₂- prostaciclina;
PLA₂- fosfolipase A₂;
PKA- proteína quinase A;
PKC- proteína quinase C;
PPP- plasma pobre em plaquetas;
PRP- plasma rico em plaquetas;
PRRs- receptores de reconhecimento padrão;
RNAm- ácido ribonucleico mensageiro;
SNC- sistema nervoso central;
STAT- transdutores de sinais e ativadores de transcrição;
TYK- tirosina quinase;
TNF- α - fator de necrose tumoral-*alpha*;
TRPV1 (h) - receptor vaniloide de potencial transitório do tipo 1 (humano);
TxA₂- tromboxana A₂;
VEGF- fator de crescimento endotelial vascular;
v.o- via oral.

1. INTRODUÇÃO

1.1 PATOGÊNESE E ASPECTOS CLÍNICOS DA ARTRITE REUMATOIDE

Segundo definição, o reumatismo é uma designação imprecisa comum a várias doenças que se caracterizam pela inflamação, degeneração ou distúrbios metabólicos de tecidos conjuntivos, principalmente bolsas sinoviais, músculos, tendões e articulações (DOS ANJOS & FERREIRA, 1999). Geralmente, estas síndromes são crônicas e refletem o início e a persistência de sintomas como a dor (SARZI-PUTTINI *et al.*, 2014).

Dentre as doenças reumáticas conhecidas, a artrite reumatoide (AR) é a mais comum e pode ser caracterizada como uma doença inflamatória crônica de cunho autoimune que pode acometer progressivamente cartilagem e ossos de qualquer articulação (GRASSI *et al.*, 1998). Contudo, os efeitos sistêmicos que surgem com o advento da AR já podem ocorrer alguns anos antes das articulações serem afetadas (PAUNOVIC & HARNETT, 2013).

Sua relevância se reflete na incidência de aproximadamente 1% da população mundial, sendo que a prevalência é cerca de três vezes maior em mulheres que em homens (KARSDAL *et al.*, 2011). Conforme descrito na literatura, entre 20 a 50 novos casos a cada 100.000 habitantes são relatados anualmente (UHLIG & KVIEN, 2005). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o aumento da incidência e da prevalência desta doença atinge o ápice aos 70 anos dos indivíduos e tende a aumentar com o envelhecimento da população (SYMMONS *et al.*, 2006).

Em um amplo estudo homogêneo e representativo da população, Nielsen e colaboradores (2012) observaram que as mulheres fumantes com idade média entre 50-69 anos constituem o grupo mais susceptível ao desenvolvimento da AR (KURIYA *et al.*, 2009; COSTENBADER *et al.*, 2006). Dentre outros motivos, há mais uma razão para que as mulheres não fumem. Além disto, a literatura indica que a região do genoma responsável pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) responde de 30 a 50% de susceptibilidade ao AR. Como exemplo do impacto de componentes genéticos, gêmeos homozigotos tem quatro vezes mais chances de manifestar a doença comparados a irmãos heterozigotos (BOISSIER *et al.*, 2012; SILMAN *et al.*, 1993). Logo, estes dados revelam o caráter multifatorial para o desencadeamento da AR.

Claramente, existe uma fase pré-clínica da AR onde as células imunológicas começam a identificar estruturas do próprio organismo como antígeno, seguido pelo surgimento de marcadores de inflamação sistêmica no plasma como por exemplo as

interleucinas (IL) (IL-1, IL-6, IL-15), o fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e o fator de necrose tumoral *alpha* (TNF- α), bem como anticorpos contra proteínas do próprio indivíduo (fator reumatoide e anticorpo anticitrulinado) (SCHAEVERBEKE *et al.*, 2012).

Geralmente, o curso clínico da referida doença é caracterizado pelo início lento, insidioso e progressivo na maioria dos pacientes. Aproximadamente 20% destes indivíduos apresentam fases de remissão parcial ou completa, mas os sintomas inevitavelmente retornam e podem afetar novas articulações (ROSENBERG, 2004). Inicialmente, há relatos de mal-estar, fadiga, que estão associados com a gravidade da doença e com sofrimento psíquico, além de dor generalizada antes mesmo de qualquer evidência de lesão articular (RUSSEL *et al.*, 2011).

Com certa frequência, o padrão de envolvimento das articulações se inicia com as articulações menores das mãos e dos pés, seguidas pelos pulsos, tornozelos, cotovelos e joelhos (Figura 1A). Igualmente, a coluna e os quadris também podem ser acometidos, mas somente em estágios avançados da doença (ROSENBERG, 2004).

O resultado final é a presença das articulações deformadas que não possuem estabilidade, além de pouca ou nenhuma amplitude dos movimentos que também é influenciada pela destruição da cartilagem, de tendões, ligamentos e das cápsulas articulares (Figura 1B e C). Uma considerável parcela dos pacientes sofre incapacidade permanente moderada a grave em poucos anos após o diagnóstico da AR (DE PUNDER *et al.*, 2011; LUNDKVIST *et al.*, 2008). Todo este processo desencadeia dores contínuas intensas que podem interferir consideravelmente na qualidade de vida do paciente (COSTA *et al.*, 2014).



Figura 1: (A) Surgimento de luxações no metacarpo e no pulso caracterizam a fase intermediária da AR. (B e C) Estado avançado da doença: mão em ziguezague com lesão poli articular e simétrica com luxação e fusão das articulações aparentes. O desvio ulnar é comum (ROSENBERG, 2004).

Em um trabalho realizado em colaboração entre o Colegiado Americano de Reumatismo (ACR) e a Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR) foi estabelecido que a determinação desta doença autoimune deve ser baseada em uma coleção de critérios associados a um código traduzido por pontuações (ALETAHA *et al.*, 2010).

O primeiro deles é definido pelo número de articulações acometidas onde pode ser atribuída até cinco pontos, a anormalidade sorológica caracterizada pela presença de fator reumatoide ou anticorpo antiproteína citrulinada (pontuação de 0- 3), seguido pela resposta elevada na fase aguda (0- 1 ponto) e, por fim, a duração dos sintomas (<6 ou \geq 6 semanas; 0- 1 ponto). Neste contexto, o indivíduo que atinge a pontuação igual ou superior a seis recebe o diagnóstico de AR (ALETAHA *et al.*, 2010). Vale ressaltar que, apesar de o fator reumatoide (anticorpo que interage com a região Fc da imunoglobulina G (IgG)) ser extensamente utilizando como um marcador plasmático para determinar a AR, apenas 40% dos pacientes é positivo para este anticorpo no início da doença, ou seja, a determinação dos níveis desta proteína circulante não garante a detecção da AR mesmo porque o fator reumatoide pode ser encontrado no plasma de indivíduos saudáveis (MACHOLD *et al.*, 2002; KURIYA *et al.*, 2009).

Este contexto revela um diagnóstico complexo que pode contribuir ao atraso da identificação da doença e favorecer o estabelecimento das lesões irreversíveis, bem como da dor nos pacientes com AR (MJAAVATTEN & BYKERK, 2013).

1.1.1 O processo álgico

A experiência álgica de indivíduos acometido pela AR inclui significativo sofrimento e conseqüente perda da qualidade de vida. Não obstante, os autores mostraram uma correlação direta entre a limitação física e a dor, sendo que este sinal da inflamação contribui mais para a incapacidade física que a lesão de cartilagem e ossos (COSTA *et al.*, 2014; SOKKA *et al.*, 2000).

Durante AR, a dor propriamente dita contribui desfavoravelmente para o impacto psicológico e social da doença no paciente, reduz a qualidade de vida do indivíduo e, de fato, é considerado um problema predominante desta enfermidade crônica autoimune (WALSH & MCWILLIAMS, 2012). Ainda, aproximadamente 90% dos pacientes consideram a resolução da dor como uma das prioridades durante seus tratamentos (LEE, 2013).

Descrita como uma sensação subjetiva e desagradável, a dor é uma experiência complexa que envolve não só a transdução de estímulos ambientais nocivos, mas também processos cognitivos e emocionais com o objetivo de proteger o indivíduo de um dano tecidual iminente (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Para tal função, existem fibras sensoriais periféricas especializadas denominadas nociceptores que podem ser excitadas por fatores químicos, mecânicos e/ou térmicos minimamente suficientes para atingir o limiar nocivo, provocar a liberação de mediadores inflamatórios e o recrutamento celular, culminando com a nocicepção (Figura 2) (MARCHAND *et al.*, 2005). Por causa da existência de diferentes tipos de fibras condutoras de impulsos nervosos, os indivíduos são capazes de captar estímulos sensoriais variados (BASBAUM *et al.*, 2009).

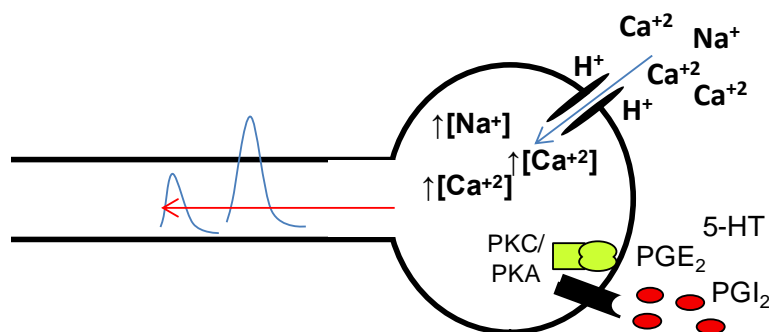


Figura 2: Estímulos nocivos provocam a liberação de mediadores inflamatórios que interagem com seus receptores e ativam a PKA e PKC que, por sua vez, fosforilam os canais TRPV1. Esta ação permite que concentrações menores de prótons ative os canais de cátion e facilitam a entrada de Na^+ e Ca^{+2} e a consequente sensibilização do nociceptor (CRIADO POR: Ewerton A. Portela dos Santos, 2015).

Neste contexto, estudos eletrofisiológicos apontam a existência de três tipos de fibras compostas por duas classes distintas. Na primeira classe, as fibras $\text{A}\beta$ diferem consideravelmente das demais pelo seu maior diâmetro e também por ser altamente mielínica que conseqüentemente reflete na maior velocidade de condução do impulso exclusivamente mecânico e inócua. Além de serem levemente mielinizadas, as fibras $\text{A}\delta$ aferentes são caracterizadas pelo seu calibre mediano e por transmitirem a dor rápida, pontual e bem-localizada. Atualmente, estes nociceptores são subdivididos em: tipo I por responderem a eventos nocivos mecânicos e químicos, mas com limiar térmico relativamente alto ($> 50^\circ\text{C}$), podendo ser ativada por temperaturas menores caso o estímulo seja persistente, e o tipo II que certamente medeia preferencialmente às respostas frente a estímulos térmicos que mecânicos (BASBAUM *et al.*, 2009). A segunda classe é composta por nociceptores heterogêneos de calibre menor em comparação às demais, amielínicos e sensíveis tanto a temperaturas superiores a 43°C quanto a estímulos mecânicos, sendo denominadas como fibras polimodais C. Em virtude destas características, a condução do impulso nervoso pelas referidas fibras aferentes acontece lentamente e a dor é manifestada de modo latente e mal localizada (PERL, 2007).

Em pacientes com AR, a sinóvia é improvável ser a única fonte de dor já que as fibras aferentes também estão localizadas na cápsula articular, ligamentos, tendões e músculos. Como fato relevante, as fibras do músculo e da articulação exibem sensibilização pronunciada frente a estímulos mecânicos (SCHAIBLE *et al.*, 2006). Entretanto, a cartilagem das articulações e cerca de dois terços internos dos

meniscos são normalmente aneurais (KONTTINEN *et al.*, 2006). Com isto, os dados ilustram a possibilidade de a lesão erosiva da cartilagem durante o início da AR não ser detectada mesmo durante o movimento articular, permitindo o alcance a estágios mais avançados de danos locais sem qualquer intervenção do processo.

De modo relevante, a inflamação é considerada como um fator importante na origem da dor (REINOLD *et al.*, 2005). Segundo a revisão da literatura realizado por Walsh & McWilliams (2012), a gravidade do processo álgico está diretamente associada com a extensão da inflamação sinovial.

Com o início da inflamação crônica na AR, a consequente e intensa migração leucocitária para a articulação promove o aumento de quantidades significativas de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e prostanoídes, que medeiam a sensibilização das fibras aferentes a partir da redução do seu limiar de ativação, facilitando a geração do potencial de ação (despolarização) que será conduzido até as lâminas do corno dorsal da medula espinhal (DUBIN & PATAPOUTIAN, 2010; SCHAIBLE & GRUBB, 1993).

Ainda na periferia, o gânglio da raiz dorsal (DRG) contém os corpos celulares de neurônios sensoriais de onde axônios bifurcados se projetam para a formação de sinapse dentro da medula espinhal no sistema nervoso central (SNC), enquanto a outra terminação é sensorial nos tecidos periféricos (MÉMET, 2006). Com isto, culturas de neurônios do DRG são úteis para compreender o mecanismo celular e molecular envolvidos na transdução do estímulo doloroso (DAVIDSON *et al.*, 2014).

Neste contexto, a sensibilização central pode ser resultado da liberação de mediadores excitatórios pelos neurônios periféricos. Com isto, o impulso nervoso é conduzido pelas fibras aferentes até as lâminas. Finalmente, o potencial de ação é conduzido até o córtex somatossensorial e áreas de componentes afetivos do cérebro através do tálamo, fornecendo informações sobre a localização e a intensidade do estímulo doloroso. Portanto, estes relatos ilustram a complexidade do fenômeno álgico (BASBAUM *et al.*, 2009).

Assim, a dor da articulação artrítica pode envolver tanto a inflamação local quanto a sensibilização periférica e central.

Vale ressaltar que o processo álgico desencadeado por mediadores inflamatórios é denominado hiperalgesia e a dor causada por estímulos que normalmente são inócuos é chamada de alodínia (FARQUHAR-SMITH, 2007). Segundo especialistas, o termo hipernocicepção deve ser utilizado nas respostas de

sensibilização dos nociceptores obtidas em animais porque os componentes emocionais associados à ocorrência da dor não podem ser mensurados (VERRI *et al.*, 2006).

Relevantemente, uma compreensão global do fenômeno da nocicepção é necessária para identificar os possíveis alvos de intervenções terapêuticas para os pacientes. Em um destes aspectos, a supressão da inflamação é altamente desejável para amenizar os fardos associados ao processo álgico desencadeado pela AR. Sabendo que nesta doença a dor persiste mesmo em indivíduos sob tratamento, existe a clara necessidade de obter novos fármacos anti-inflamatórios e analgésicos mais efetivos (WALSH & MCWILLIAMS, 2012).

1.1.1.1 Canais de potencial transitório

Em tempo e de interesse particular de grande parte dos pesquisadores que estudam o processo nociceptivo, o receptor vaniloide de potencial transitório (TRPV1) é um canal de cátion não-seletivo, mas que preferencialmente é permeável ao Ca^{+2} , pertencente a uma família de 28 canais com baixa homologia entre si (SCHAIBLE *et al.*, 2006).

Consistente com o seu papel integrador de estímulos dolorosos, o TRPV1 pode ser encontrado a nível central, mais especificamente em regiões do cérebro envolvidas com a transmissão e modulação da dor, mas também periféricamente (SZABO *et al.*, 2002; PALAZZO *et al.*, 2012).

Em virtude de sua localização primária em fibras aferentes sensoriais A δ e polimodais C, a ativação dos canais TRPV1 por temperaturas superiores a 43°C, prótons e pela capsaicina (principal componente pungente da pimenta) permite o influxo de Na^+ e Ca^{+2} para a célula e facilita direta ou indiretamente a formação do potencial de ação (WANG & WOOLF, 2005).

Contudo, apesar de expectativas iniciais apontarem uma possível correlação entre o TRPV1 e a dor evocada pela temperatura, estudos iniciais com camundongos deficientes deste tipo de canal não apresentaram alterações significativas nas respostas nociceptivas basal (WOODBURRY *et al.*, 2004). Em contrapartida, a mesma estratégia experimental mostrou que o TRPV1 é essencial para a ocorrência da hipernocicepção térmica e não à mecânica, indicando que este canal é relevante na sensibilização neuronal desencadeada por mediadores inflamatórios após injúria

tecidual (CATERINA *et al.*, 2000). Neste contexto, o limiar de ativação das fibras aferentes é reduzido à temperatura corporal (PREMKUMAR & ABOOJ, 2013).

1.1.1.2 Prostanoides

Os eicosanoides são agentes biologicamente ativos tanto em condições fisiológicas quanto em doenças. Por exemplo, estes mediadores lipídicos medeiam respostas do processo inflamatório, como a febre, permeabilidade vascular, quimiotaxia de leucócitos e a dor (FOLCO & MURPHY, 2006).

Inicialmente, há a liberação do ácido araquidônico (AA) a partir da hidrólise dos fosfolípidios de membrana pela ação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) que pode ser ativada por fatores de crescimento, bem como por citocinas (ADIBHATLA & HATCHER, 2008; KORBECKI *et al.*, 2013).

Além das lipoxinas e leucotrienos formados a partir da atuação enzimática das isoformas da lipoxigenase (LOX), o AA também pode ser submetido às ações catalíticas de cicloxigenase e posteriormente peroxidase mediadas respectivamente pela prostaglandina H sintase e pela prostaglandina endoperóxido sintase. Ambas também são chamadas de cicloxigenase (COX) e são fundamentais para a síntese de prostanoides (tromboxana A₂ (TxA₂), prostaciclina (PGI₂) e prostaglandina (PG) D₂, PGE₂, além de outras) que acontecerá após interações intercelulares (Figura 3). Ainda, através de seus receptores, a PGE₂ elucida diversos efeitos que inclui a exacerbação da inflamação e a sensibilização nociceptiva (SALA *et al.*, 2010; KAWAHARA *et al.*, 2014) (Figura 2). De acordo com Moriyana e colaboradores (2005), a hipernocicepção térmica pode ser mediada pela PGE₂ após a interação com seus receptores, a consequente ativação da PKA e PKC, culminando com a potencialização e sensibilização do TRPV1 (Figura 2).

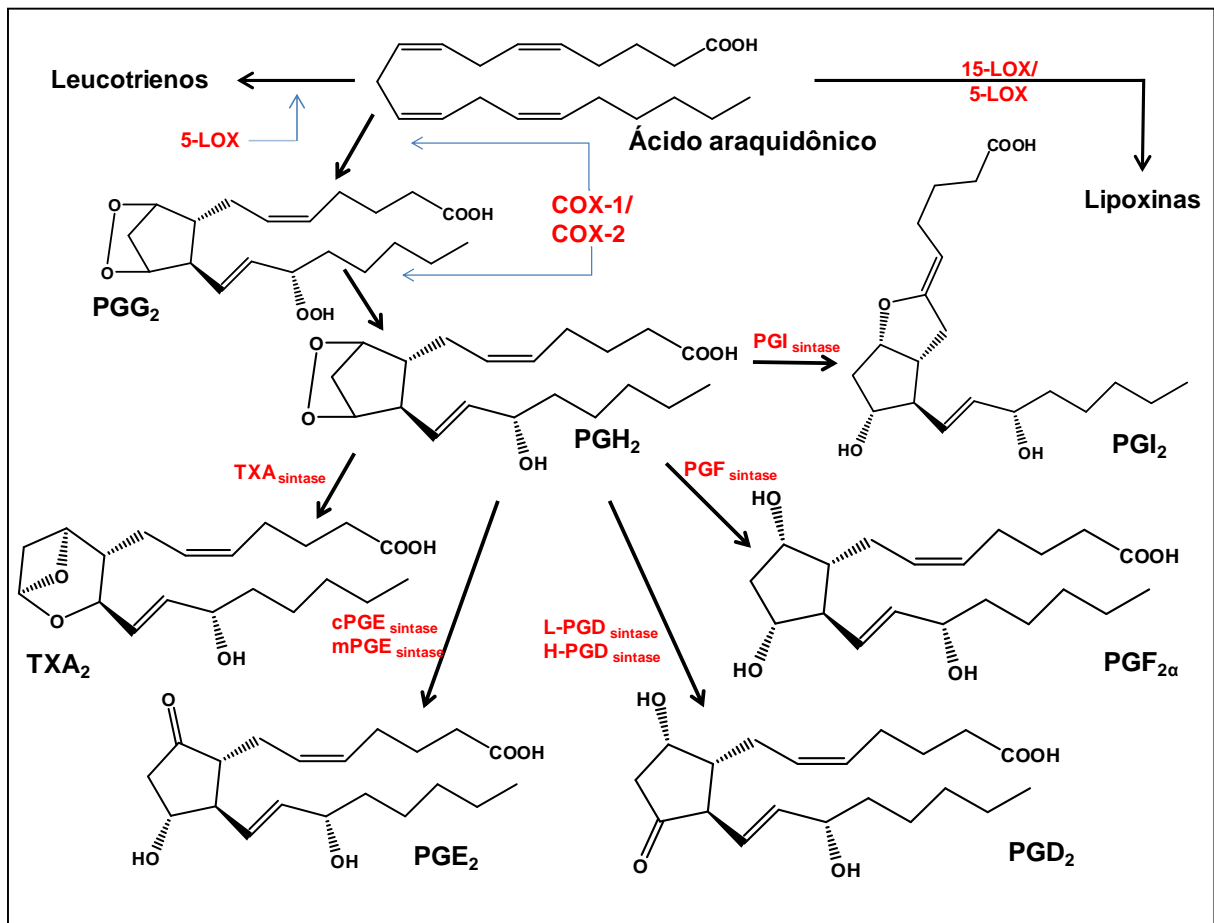


Figura 3: Cascata de formação de prostanoídeos a partir do ácido araquidônico (Adaptado de: SMYTH *et al.*, 2006; SANTOS, 2009) (CRIADO POR: Ewerton A. Portela dos Santos, 2015).

De modo corroborativo, a revisão bibliográfica realizada por Fattahi e Mirshafiey (2012) mostrou que a depleção genética de subtipos dos receptores de PGE₂ atenuou os sinais inflamatórios de animais com AR experimental. Mais especificamente sobre o mecanismo da dor na AR, Schaible e colaboradores (2002) relataram que a presença de receptores para este mediador lipídico nas terminações das fibras contribui para a redução do limiar de ativação dos nociceptores. Em conjunto, os referidos fatos apontam o papel da PGE₂ como mediador da dor periférica associada a AR.

Com respeito às isoformas que convertem o AA em intermediários que formarão os prostanoídeos, a COX-1 é constituída de 576 aminoácidos e é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos, mas pode ser detectada em altos níveis na mucosa gástrica e em plaquetas (SMITH *et al.*, 2000). Mais ainda, o conhecimento

obtido a partir de estudos comparativos entre as estruturas de COX-1 e COX-2 evidenciou o maior sítio catalítico da isoforma 2 e alavancou o desenvolvimento de fármacos seletivos inibidores da COX-2 (XIE *et al.*, 1991; KOSAKA *et al.*, 1994).

Apesar de a COX-2 ser expressa constitutivamente em células endoteliais, vasculatura renal e mácula densa justa-glomerular, esta enzima exibe significativa importância farmacológica na AR porque a sua expressão pode ser induzida por tecidos inflamados em decorrência da ação de citocinas pró-inflamatórias (RAJAKARIAR *et al.*, 2006; RAO & KNAUS, 2008). Além disto, o LPS também pode influenciar positivamente na expressão de COX-2, um aspecto bastante explorado cientificamente em estudos de desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios (BAN *et al.*, 2009).

Recentemente, um trabalho realizado com o modelo de AR induzida por adjuvante de Freund completo (CFA) mostrou que a inflamação está significativamente relacionada com a expressão de COX-2 e PGE₂ no tecido sinovial, podendo ser associada com a nocicepção crônica em camundongos (CHEN *et al.*, 2014; MCEVOY *et al.*, 2004; NARITA *et al.*, 2008). No contexto molecular, os autores indicaram que a hipernocicepção evocada pelo agente nocivo foi mediada na medula espinhal pelo aumento dos níveis de RNAm de COX-2 após a ativação de NF-κB induzida por IL-1β e TNF-α. Em conjunto, estes resultados permitem sugerir a participação tanto de COX-2 quanto de PGE₂ no processo de sensibilização central durante a hipernocicepção.

1.2 FISIOPATOLOGIA DA ARTRITE REUMATOIDE

Marcada pela migração de células do sistema imune adaptativo, como as células T, e também as fagocitárias, como macrófagos e neutrófilos, a inflamação crônica é caracterizada pelo início insidioso, pouco intenso e geralmente assintomático que pode ocorrer por longos períodos, como aqueles desencadeados pela destruição tecidual observada em pacientes com AR (ROBBINS & COTRAN, 2005).

Sabidamente, a AR provoca um amplo espectro de alterações morfológicas, sendo que as articulações manifestam as lesões mais graves. Inicialmente, a sinóvia se torna edemaciada, espessa e hiperplásica, transformando seu aspecto liso em bulbar. De maneira corroborativa, a migração leucocitária para a membrana sinovial, normalmente acelular, resulta no aumento do seu tamanho e é parte constituinte da

resposta inflamatória. As características celulares incluem primeiramente densa infiltração do estroma sinovial por células B e células T CD4⁺, além de concentrações abundantes de macrófagos e fibroblastos (Figura 4) (THOMSON & UDALOVA, 2009).

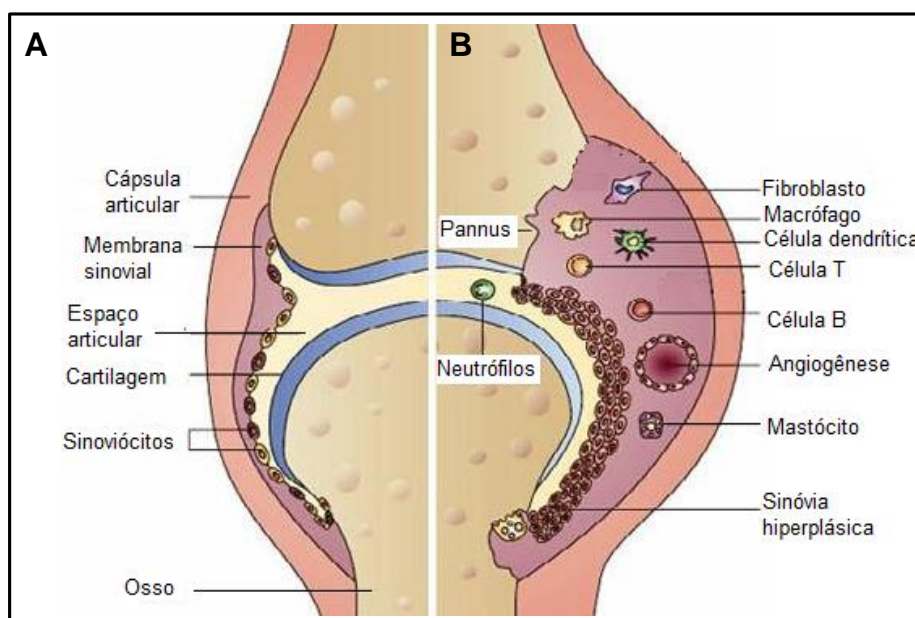


Figura 4: A- Representação da estrutura de uma articulação normal comparada com (B) alterações patofisiológicas da articulação acometida pela AR (Adaptado de: CHOY, 2012).

Já os macrófagos parecem exercer papel principal no desenvolvimento e manutenção da AR em virtude da sua concentração aumentada tanto na membrana sinovial inflamada quanto na cartilagem e também por apresentarem ampla atividade pró-inflamatória e de promoção da lesão articular em qualquer fase da doença. Durante a AR, os macrófagos exibem sinais claros de sua ativação refletidos no aumento da expressão de moléculas de MHC do tipo II, de quimiocinas, metaloproteinasas, além de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-15, GM-CSF e TNF- α , por exemplo) (KINNE *et al.*, 2000). Notoriamente, o grau de migração e ativação de macrófagos está correlacionado não só com a progressão dos danos permanentes à articulação, mas também com a inflamação e a dor do paciente (MULHERIN *et al.*, 1996; TAK *et al.*, 1997; COOK *et al.*, 2011).

Ainda, a liberação dos referidos mediadores inflamatórios influenciará na ativação de fibroblastos, no recrutamento de neutrófilos e diferenciação de células T, corroborando para a amplificação e magnitude da inflamação (Figura 5).

Na sinóvia inflamada durante a AR, há o acúmulo de neutrófilos no fluido articular e, segundo Khandpur e colaboradores (2013), a participação deste tipo celular não se limita na contribuição para a ocorrência da dor inflamatória a partir da produção de PGE₂ (Figura 5). De acordo com os autores, o TNF- α presente na articulação induz a formação de NETs (do inglês: *neutrophil extracellular traps*) pelas referidas células polimorfonucleares que expõe autoantígenos e aumenta a resposta inflamatória de fibroblastos sinoviais. Deste modo, estas observações implicam a participação dos neutrófilos não só na patogênese, mas também na perpetuação da AR.

Basicamente, a autoimunidade é caracterizada por uma falha específica de um mecanismo que envolve as células T e o reconhecimento de estruturas do organismo como antígeno. Evidências na literatura indicam que este problema é crucial para a fisiopatologia da inflamação sinovial na AR ((DELVES *et al.*, 2011; FOURNIER, 2005).

Existem dois tipos principais de células T: as citotóxicas ou CD8⁺ e auxiliares (*helper- h*) ou CD4⁺. As células T CD4⁺ apresentam um papel essencial no processo de iniciação e perpetuação da membrana inflamada e das lesões ósseas observadas durante a AR que, influenciada por citocinas liberadas pelas células dendríticas, podem se diferenciar em células Th do tipo 1 (Th1), tipo 2 (Th2) e em reguladoras (Treg) (ATERIDO *et al.*, 2014). Com perfil pró-inflamatório, um quarto subtipo de células T CD4⁺ caracterizado pela produção de IL-17 (células Th17) foi recentemente identificado e observações sugerem a importância da sua participação na atividade da AR (OUYANG, 2008; NOACK & MIOSSEC, 2014). Cada subtipo de células T secreta um padrão de citocinas diferente entre si que conjuntamente coordenam uma série de eventos intercelulares complexos (CHEN *et al.*, 2012).

De um modo geral, as subpopulações de células Th podem atuar em diferentes intensidades e estágios da AR, governando o desenvolvimento e a cronicidade inflamatória na articulação (CHEN *et al.*, 2012). Mas classicamente, amostras de tecidos sinoviais inflamados de pacientes com AR revelaram que a linhagem de células Th1 compõe o perfil predominante de células T comparado às células Th2 (AARVAK *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2004).

Há também as células Treg cuja função primordial consiste em proteger o organismo de reações exacerbadas e impróprias de células T a antígenos estranhos, bem como suprimir suas ações contra autoantígenos. Estas células parecem ser essenciais para a supressão contínua de células Th1, Th2 e Th17. Ainda, as células

Treg correspondem de 5-10% das células T CD4⁺ maduras, sendo o seu desenvolvimento e a manutenção da sua função supressora dependente da ativação do fator de transcrição Foxp3 (WILLIAMS & RUDENSKY, 2007). No contexto da AR, as células Treg não interrompem a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células T e, de acordo com Valencia e colaboradores (2006), tal problema pode estar relacionado com o aumento da produção de TNF- α que reduz a expressão de Foxp3 (HAQUE *et al.*, 2014).

Passível de interação com macrófagos, as células mesenquimais (células da sinóvia semelhante a fibroblastos) tem surgido como relevantes moduladores do sistema imune. Investigações sobre as funções patogênicas dos fibroblastos sinoviais na AR mostraram que estas células estão em maior número e com atividade aumentada, contribuindo para a inflamação a partir da liberação de mediadores pró-inflamatórios (Figura 5) (LEENCH & MORAND, 2013).

Neste contexto, estudos imuno-histoquímicos apontaram os fibroblastos como a principal fonte de IL-6 que, sinergicamente com a IL-23, pode propiciar a proliferação de células Th17 e também promover o acúmulo de células B, colaborando efetivamente para a resposta humoral (BAUMANN & KUSHNER, 1998; LIN *et al.*, 2012). De modo global, estas evidências permitem sugerir que há a regulação local da autoimunidade por intermédio de mediadores e interações intercelulares (DAYER & CHOY, 2010). Ainda, a migração de células B para a sinóvia inflamada também pode colaborar para a ativação de células T (WANG *et al.*, 2011).

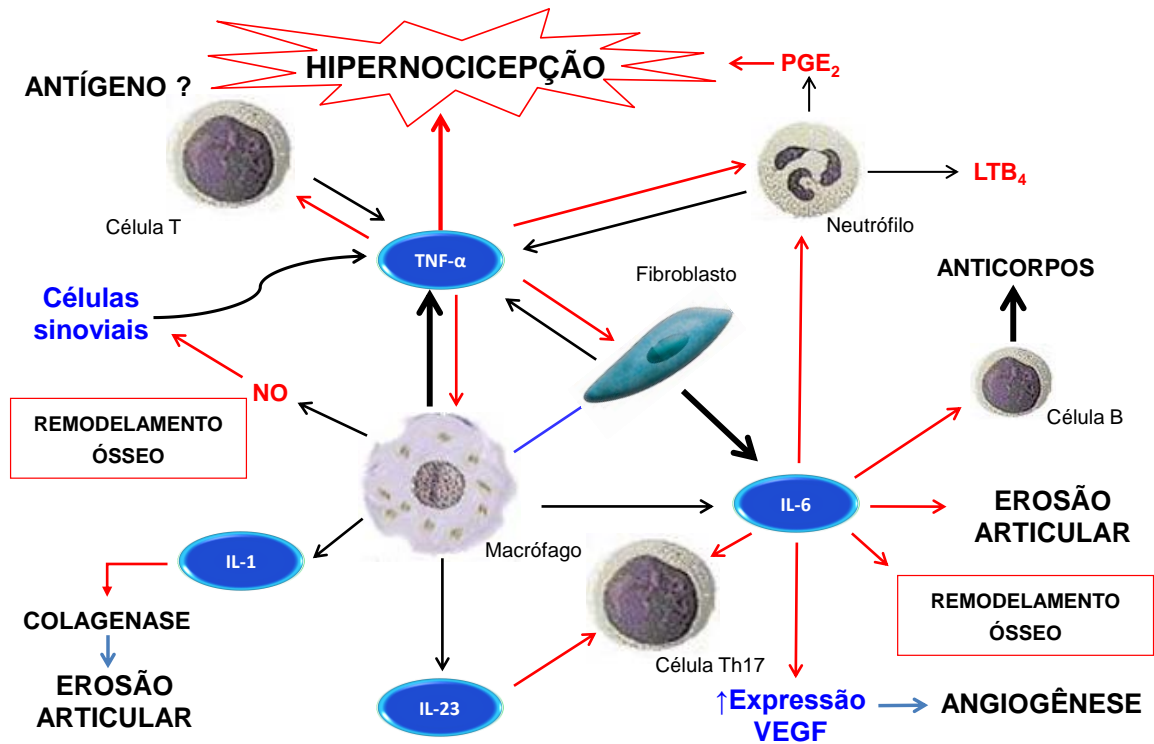


Figura 5: Interações intercelulares e liberação de mediadores pró-inflamatórios contribuem para a amplificação e magnitude da inflamação durante a AR (seta vermelha: ação de mediadores; seta preta: ação celular. As setas mais espessas indicam que o mediador é produzido principalmente pelo tipo celular) (VOLIN & KOCH, 2011; DAYER *et al.*, 2010; FELDMAN, 2002; KINNE *et al.*, 2000) (CRIADO POR: Ewerton A. Portela dos Santos, 2015).

Neste ambiente significativamente inflamado, a atividade osteoclástica no osso subjacente permite que a sinóvia penetre no osso e forme erosões justa-articulares, osteoporose e, por fim, a ocorrência do *pannus* onde diversos fatores de crescimento, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), podem contribuir para o remodelamento e permeabilidade vascular. Ainda, esta estrutura é constituída pelo conjunto de fibroblastos, células sinoviais, inflamatórias e tecido de granulação que se proliferam sobre a cartilagem articular e causa sua erosão (Figura 4) (BOISSIER *et al.*, 2012). Neste momento, a união dos ossos apostos mediada pelo *pannus* é seguida de eventual ossificação (Figura 6) (ROSENBERG, 2004).

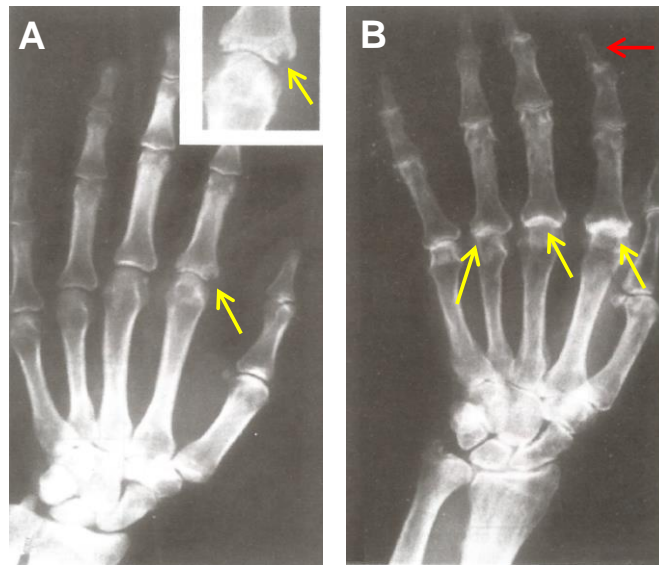


Figura 6: **A-** Estágio inicial da doença onde há estreitamento do espaço articular e erosões marginais (seta amarela) e; **B-** AR avançada com perda da cartilagem articular, estreitamento dos espaços de quase todas as articulações (seta amarela) e desvio ulnar dos dedos (seta vermelha) (ROSENBERG, 2004).

Outrossim, a destruição de ossos e cartilagem das articulações é mediada por distintas vias patológicas, sendo que a extensão da atividade inflamatória tem sido identificada como um importante iniciador das lesões (KOCIJAN *et al.*, 2013). Neste contexto, a sinóvia inflamada constitui uma fonte de citocinas inflamatórias que promovem o influxo e a diferenciação de precursores mononucleares em osteoclastos e conseqüentemente aumentam a reabsorção óssea articular (SCHETT & TEITELBAUM, 2009). Portanto, estes resultados influenciaram o conceito que a inflamação pode ser um desencadeador importante de danos estruturais ósseos nos pacientes com AR (KLEYER & SCHETT, 2014). Contudo, Aletaha e colaboradores (2010) concluíram que as lesões irreversíveis nas cartilagens das articulações contribuem mais significativamente para a perda funcional da articulação que as erosões ósseas.

Então, durante a manifestação da AR, os tecidos sinoviais estão enriquecidos por células imunológicas que produzirão mediadores inflamatórios (IL-17, IL-1, IL-33, IL-6, TNF- α e PGE₂, por exemplo) determinantes para a perpetuação da inflamação crônica e dolorosa da articulação (PAUNOVIC & HARNETT, 2013).

1.2.1 Citocinas pró-inflamatórias

A pesquisa sobre citocinas começou no início dos anos 50 do século passado e, atualmente, representam um grupo importante de mediadores que são essenciais para o funcionamento do sistema imunológico humano (TAYAL & KALRA, 2008; BAK & MIKKELSEN, 2010).

Didaticamente, as citocinas podem ser definidas como polipeptídios de estrutura diversa e baixo peso molecular com função de moléculas mensageiras que tornam possível a comunicação entre diferentes elementos do sistema imune (SCHETT & GRAVALLESE, 2008).

Levantamentos bibliográficos realizados por Tayal e Kalra (2008) indicaram que as funções das citocinas podem ser similares comparadas entre si. Ademais, estes fatores produzidos por leucócitos podem regular uma ampla faixa dos fenômenos inflamatórios associados com a patogênese da AR e de diversas atividades do sistema imune, como a proliferação, diferenciação e ativação de células de defesa e a liberação de outras citocinas.

Dentre outros fatores enquadrados na autoimunidade, a inflamação crônica na AR é suportada pelo desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias (MOELANTS *et al.*, 2013). As citocinas estão presentes abundantemente no soro e sinóvia dos pacientes (SCHETT & GRAVALLESE, 2008).

Vale ressaltar que, do ponto de vista da gênese e manutenção da AR, um dos grupos de citocinas mais importante é a família das interleucinas, mas outros tipos de citocinas também são relevantes para a doença em questão e foram identificados com base na sua atividade citotóxica contra tipos celulares transformados, como o TNF- α (FELDMANN, 2002).

No que tange a AR, as citocinas pró-inflamatórias IL-17, IL-6, IL-1 β e o TNF- α se destacam por autorregular suas produções e controlarem a expressão de enzimas como a isoforma induzida da óxido nítrico sintase (iNOS) e COX-2 cuja importância em processos inflamatórios é significativa em virtude da produção de NO e PGE₂, respectivamente (TSATSANIS *et al.*, 2006).

1.2.1.1 Fator de Necrose Tumoral *alpha* (TNF- α)

O TNF- α foi descoberto em 1975 como uma proteína presente no soro capaz de mimetizar a ação necrótica no tumor em sarcomas transplantados para

camundongos. Já nesta época, uma variedade de testes indicou a possibilidade de TNF- α ser liberado por macrófagos (CARSWELL *et al.*, 1975).

Esta citocina é um polipeptídeo de aproximadamente 17 KDa composto de 157 aminoácidos, cuja produção pode ser induzida por estímulos como antígenos fúngicos e virais, LPS, formalina, bem como IL-1 e o próprio TNF- α (KRIEGLER *et al.*, 1988; FELDMAN *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2000).

Desde 1985, Old suspeitou que o TNF- α poderia ter múltiplas atividades biológicas e, três anos depois, outros pesquisadores sugeriram que o TNF- α seria um mediador primário de respostas inflamatórias, estando envolvido na patogênese de várias doenças como o câncer, a sepse e a doença inflamatória intestinal (KRIEGLER *et al.*, 1988; LIN *et al.*, 2008).

Adicionalmente, sólidas evidências baseadas na presença do TNF- α na articulação de pacientes com AR já apontavam esta citocina como um mediador importante na patogênese da AR (BRENNAN & MCINNES, 2008). Além disto, estudos realizados em modelos animais e em pacientes com AR mostraram que a quantidade de TNF- α e seus receptores estão aumentados no soro comparado com o grupo controle saudável (CHEN *et al.*, 2013; KOBAYASHI *et al.*, 2014). Em seguida, os pesquisadores constataram que os pacientes exibiram em suas articulações quantidades elevadas destes receptores biologicamente ativos em cerca de cinco vezes em relação aos níveis séricos deste mesmo grupo. À época, estes dados permitiram sugerir a produção dos receptores de TNF- α na articulação (COPE *et al.*, 1992).

Para embasar a teoria que o TNF- α exerce papel fundamental na AR, Willians e colaboradores (1992) mostraram que a administração de anticorpo monoclonal específico para TNF- α melhorou significativamente os aspectos clínicos da AR desencadeados no modelo de artrite induzida por colágeno (KEFFER *et al.*, 1991). Relevantemente, um estudo genético preditivo de AR revelou que o aumento sistêmico de TNF- α em camundongos desencadeia uma resposta semelhante à referida doença autoimune (KEFFER *et al.*, 1991). Certamente, a literatura atual exhibe diversos trabalhos que contemplam o TNF- α como o regulador fundamental para o início e a manutenção da AR, sendo liberado por células T CD4⁺ e por macrófagos (MOELANTS *et al.*, 2013).

Inicialmente, cultura de células mononucleares extraídas da sinóvia ou da articulação de pacientes com AR foi capaz de produzir IL-1 sem qualquer estímulo

extrínseco e que, por sua vez, foi revertida pela adição de anticorpo anti-TNF- α . Tal fato indicou que o TNF- α pode ser o principal indutor de IL-1 (BRENNAN *et al.*, 1989). Conseqüentemente, esta citocina que causa inflamação está diretamente relacionada com a lesão articular (DAYER, 2003). O emprego do anticorpo anti-TNF- α também diminuiu pronunciadamente a secreção de outras citocinas pró-inflamatórias (FELDMANN *et al.*, 1996).

Através da ação de quimiocinas presente no fluido e tecido sinovial, o TNF- α promove a migração de leucócitos para a articulação de coelhos em modelos experimentais de AR que produzirão mais quimiocinas, indicando a existência de um ciclo que favorece a manutenção da resposta inflamatória (KOCK, 2005; ASKENASE, 2003).

Outrossim, colaborações científicas confirmaram o papel específico do TNF- α na contribuição da migração de neutrófilos à cavidade articular de animais imunizados (BOMBINI *et al.*, 2004). Corroborando com estes resultados, Pelletier e colaboradores (2010) mostraram existir uma interação franca entre células Th17 com neutrófilos através do TNF- α . Ainda, demonstrado pelo tratamento com anticorpo anti-TNF- α , o recrutamento de células T também pode ser regulado de maneira relevante pela citocina em questão, seja direta ou indiretamente, por meio da indução de receptores de quimiocinas na superfície das células T de pacientes com AR (ISSEKUTZ *et al.*, 1994; ERIKSSON *et al.*, 2013). Claramente, estes dados indicam o efeito quimiotático de TNF- α para a articulação e permitem sugerir sua importância singular na AR.

Não menos importante, uma pesquisa realizada na década de 80 mostrou que o TNF- α estimula a produção de colagenase e PGE₂ pelas células sinoviais humana. Tal fato evidenciou a função na destruição e remodelamento do tecido e ratificou sua participação na indução da dor inflamatória (DAYER *et al.*, 1985; BRENNAN & MCINNES, 2008).

Bem como outras citocinas e mediadores pró-inflamatórios liberados na articulação artrítica, o TNF- α não só promove e mantém a inflamação como também causa dor inflamatória (SCHAIBLE *et al.*, 2010; INGLIS *et al.*, 2005).

Estudos experimentais demonstram que a administração intra-articular de TNF- α pode causar dor tanto indiretamente, graças a mediadores inflamatórios liberados sequencialmente, quanto de modo direto (CUNHA *et al.*, 2008a; CUNHA *et al.*, 2008b). Neste caso, há indícios consistentes que o TNF- α sensibiliza o TRPV1 e também neurônios condutores de impulsos nociceptivos através da modulação de canais

iônicos de modo persistente (HAGENACKER *et al.*, 2010; CZESCHIK *et al.*, 2008). Este mesmo fenômeno foi observado em neurônios do DRG, onde análises de PCR indicaram a expressão de ambos os subtipos de receptores para TNF- α . (RICHTER *et al.*, 2010).

De modo corroborativo, animais portadores da artrite induzida por antígeno (AIA) apresentaram intensa resposta hipernociceptiva em um padrão típico de nociceptores sensibilizados, com relevante transmissão de corrente iônica nas fibras A δ e as polimodais C que expressam o subtipo 1 de receptor para TNF- α (TNFR1) (SCHAIBLE *et al.*, 2010; RICHTER *et al.*, 2010).

Assim como a administração da referida citocina na cavidade articular reduz o limiar de ativação das fibras periféricas da articulação, König e colaboradores (2014) observaram que a presença de TNF- α no espaço articular favorece o aumento da excitabilidade dos neurônios da medula espinhal. Claramente, os autores mostram que o TNF- α expresso a nível central contribui igualmente para a sensibilidade dos mesmos neurônios, revelando que o TNF- α em ambos os locais facilita a manifestação do processo algico (KÖNIG *et al.*, 2014).

Ainda, camundongos transgênicos expressando níveis elevados de TNF- α que desenvolvem naturalmente AR apresentam maior sensibilidade à dor. Segundo os autores, parece que o TNF- α desencadeia intensa, propagada e prolongada atividade nociceptiva cerebral em estruturas do SNC envolvidas na emoção e percepção da dor, como o tálamo e regiões do sistema límbico (HESS *et al.*, 2011).

Em suma, o TNF- α é mediador fundamental no recrutamento celular e determinação das respostas efectoras das células, além de ser essencial na comunicação intercelular, amplificação e duração da resposta inflamatória e algica (DELVES *et al.*, 2011). Não obstante, assim como o TNF- α , uma ampla gama de citocinas pró-inflamatórias pode atuar sinergicamente durante a AR, envolvendo mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, como aqueles mediados pela MAPK p38 e por NF- κ B (ANDOH *et al.*, 2005).

Portanto, a redução dos níveis destes mediadores na sinóvia inflamada pode contribuir para a diminuição da migração de leucócitos, da dor e ainda amenizar as consequências do processo inflamatório associados à AR. Por isto, a estratégia cujo alvo seja a neutralização ou redução dos níveis de TNF- α na articulação pode ser útil no tratamento da AR.

1.2.2 Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK)

As MAPK compõem uma família de moléculas de sinalização intracelular que engloba três principais membros: proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK), quinase N-terminal c-Jun (JNK) e a p38 (JI *et al.*, 2009).

Em um levantamento bibliográfico realizado em 2014, Patterson e colaboradores mostraram que as MAPKs exercem funções importantes na regulação da mitose, proliferação e viabilidade celular, além de respostas relacionadas com os processos inflamatórios crônicos e álgicos, principalmente mediadas pela JNK e p38. Ademais, estas proteínas quinases ativadas são implicadas direta ou indiretamente em mais de 400 doenças em humanos, inclusive aquelas autoimunes (PATTERSON *et al.*, 2014). Como objeto de uma revisão bibliográfica publicada em 2008, Thalhamer e colaboradores concluíram que há relevância significativa das MAPKs para a propagação da inflamação e na lesão permanente da articulação na AR.

As atividades enzimáticas das MAPKs são altamente influenciadas por eventos extracelulares. Em geral, a fosforilação (ativação) da ERK acontece por mitógenos promotores do crescimento. Em contraste, a JNK e a p38 são induzidas principalmente por estresses ambientais (radiação ultravioleta, aumento da osmolaridade e hipóxia), bem como por estímulos e citocinas pró-inflamatórias, como o LPS, a IL-1 e o TNF- α (ASHWELL, 2006). De modo relevante, a MAPK p38 também pode ser ativada através de interações entre células T e células apresentadoras de antígeno (DODELLER & SCHULZE-KOOPS, 2006).

A cascata de sinalização que resulta na ativação das MAPKs é complexa, mas pode ser resumida por uma sequência de fosforilações incitadas por estímulos externos que culmina com a translocação da MAPK para o núcleo, fosforilando substratos como os fatores de transcrição e promovendo diversos efeitos biológicos (Figura 7). Dentre eles podem ser citados a quimiotaxia e a inflamação (ASHWELL, 2006).

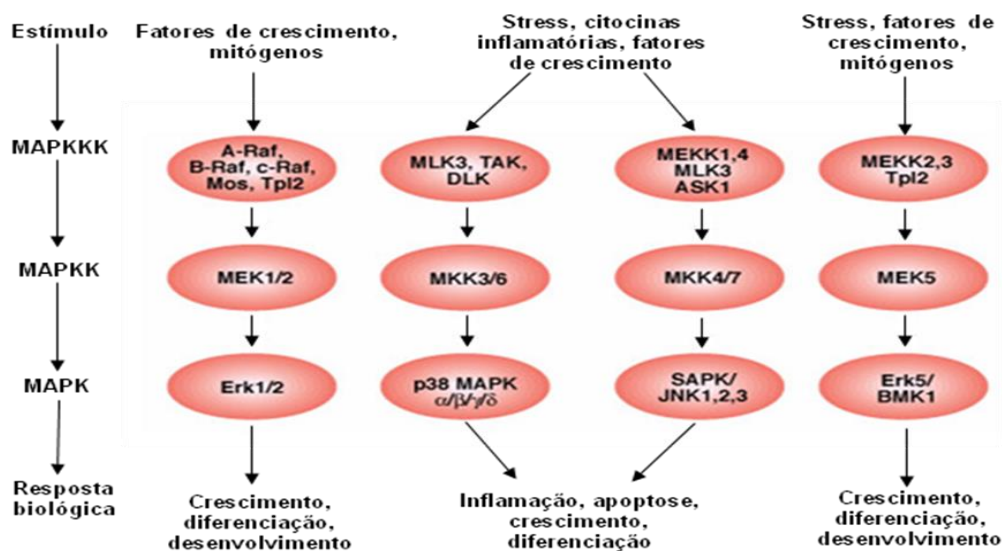


Figura 7: Cascata de ativação das MAPKs (ADAPTADO de: <http://www.medogene.com/MyResearches/Signaling%20pathways/MAPK-Pathway.html>).

Ainda, as vias de sinalização envolvidas a partir da ativação das enzimas MAPK induzem respostas celulares secundárias iniciadas pelo aumento da expressão de TNF- α e de diversas outras citocinas inflamatórias que contribuem com a atividade biológica do próprio TNF- α (SABIO & DAVIS, 2014). Continuamente, existem evidências que condicionam a expressão do gene de TNF- α com o recrutamento de alguns fatores de transcrição por intermédio de MAPKs, como o AP-1 e o NF- κ B (MEANS *et al.*, 2000).

Trabalhos contemporâneos indicam que, apesar da presença da ERK fosforilada tanto em fibroblastos sinoviais estimulados por TNF- α quanto em pequenos vasos ao redor da sinóvia de pacientes com AR, sua contribuição na articulação inflamada ainda não fora elucidada completamente. Ainda nesta conjuntura, a ativação da ERK não pode ser induzida na articulação inflamada com artrite estimulada por CFA (SCHETT *et al.*, 2000; ARCE *et al.*, 2011). Ademais, mesmo havendo relatos que envolvem a fosforilação da ERK com redução da nocicepção e com a possibilidade de supressão de respostas de células T, inibidores seletivos da ativação de ERK não atenuam a inflamação e lesão articular em modelos experimentais de AR (CRUZ *et al.*, 2005). Tal fato permite sugerir que esta MAPK pode não ser relevante para o desenvolvimento do processo inflamatório durante a referida doença autoimune.

Com relação à JNK, investigações apontam para a sua forma ativada no núcleo de células da sinóvia de pacientes com AR que resultam na transcrição gênica de metaloproteinases. Quando ativada pela IL-1 β ou TNF- α , uma das principais consequências da sinalização mediada pela JNK na gênese da AR é a lesão da cartilagem mediada por metaloproteinases (SUNDARRAJAN *et al.*, 2003; INOUE *et al.*, 2006). Corroborando com estes estudos, Han e colaboradores (2001) mostraram que a depleção genética ou inibição de JNK em camundongos provocou menor lesão óssea e na cartilagem, além de modesto efeito na redução do edema na pata comparada com animais selvagens (NOSS *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2012). Tal fato permite sugerir que a JNK realmente está envolvida na degradação da matriz extracelular, mas sua participação não é essencialmente exclusiva para a gênese da AR.

Descrita pela primeira vez como uma enzima que na presença de LPS tem como função principal induzir a liberação de TNF- α , a p38 apresenta quatro isoformas de alta homologia entre as sequências de aminoácidos de suas estruturas (HAN *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 1994). Análises obtidas através de PCR por transcriptase reversa e por marcação de proteínas mostraram que a p38 β é expressa abundantemente em células endoteliais e, assim como a p38 γ , não é detectada nas principais células inflamatórias. Entretanto, tanto a p38 α quanto a p38 δ são encontradas de forma dominante em monócitos e macrófagos, além de neutrófilos, células T CD4⁺ e células endoteliais (HALE *et al.*, 1999).

Em concordância, estudos subsequentes mostram que camundongos deficientes da isoforma p38 β não tiveram a produção de TNF- α afetada. Em contraste, a p38 α foi determinada como a isoforma essencial no controle da produção desta citocina, apesar de ambas as isoformas p38 γ e p38 δ terem sido implicadas na regulação do RNAm do TNF- α (SABIO & DAVIS, 2014). Juntamente com o padrão de expressão da p38 α , a sua forte ativação em macrófagos estimulados com LPS permite sugerir que esta isoforma pode ser a principal envolvida na resposta inflamatória (HALE *et al.*, 1999).

Claramente, a MAPK p38 contribui significativamente para o desenvolvimento da AR. Segundo Chabaud-Riou e Firestein (2004), esta enzima quinase está fortemente ativada na membrana sinovial de pacientes com AR, mas o mesmo não é observado em indivíduos com doença degenerativa da articulação.

Um dos aspectos que pode ser destacado sobre a MAPK p38 é a sua capacidade de mediar a quimiotaxia de leucócitos estimulados com o peptídeo bacteriano formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) e evidenciado em análises de *immunoblots* obtidos através da utilização de anticorpo contra a p38 fosforilada (CHANG *et al.*, 2000; HEIT *et al.*, 2008). Ademais, a inibição da MAPK p38 reduz o influxo celular global para o tecido sinovial inflamado (ZWERINA *et al.*, 2006).

Além da participação desta enzima na migração leucocitária e na biossíntese do TNF- α , a literatura evidencia solidamente a sua participação crucial no aumento da expressão de COX-2 e também na ativação da PLA₂, conseqüentemente a oferta de AA para as isoformas da COX (WESTRA *et al.*, 2004). Através do inibidor SB 203580, os autores também constataram a relação da fosforilação de p38 com a expressão de iNOS (BADGER *et al.*, 1998; EA *et al.*, 2005). Naturalmente, a MAPK p38 contribui indiretamente para a produção de PGs e óxido nítrico.

De modo relevante, a ativação da MAPK p38 demonstra ser um fator de sinalização crucial na lesão óssea erosiva já que, em um modelo transgênico de artrite baseado no aumento da expressão de TNF- α , o bloqueio da enzima em questão diminuiu a expressão de IL-1 na articulação, mas principalmente promoveu a melhora dos sinais inflamatórios que foi atribuída pela redução do infiltrado inflamatório sinovial, ou seja, a inibição da p38 ratificou a importância desta enzima não só para a produção de TNF- α , mas também para a ocorrência dos sinais da AR desencadeado pela relação entre a citocina e a enzima (ZWERINA *et al.*, 2006).

No que tange a dor, existem relatos consistentes apontando a inflamação periférica como indutora da ativação da MAPK p38 localizada no DRG em fibras polimodais C aferentes do DRG que, por sua vez, contribui para a ocorrência da hipernocicepção térmica por aumentar a expressão de TRPV1 nos terminais periféricos destas células (JI *et al.*, 2002). Já Mizushima e colaboradores (2005) mostraram que a administração intraplantar da capsaicina induz rapidamente a fosforilação da MAPK p38 no DRG de fibras de pequeno e médio calibres que coexpressam TRPV1, sendo relevante para o aumento da hipernocicepção térmica. De modo conclusivo, o trabalho sugeriu que a via da MAPK p38 pode estar envolvida na transmissão do impulso nervoso durante o desenvolvimento da dor inflamatória.

Ratificando tal hipótese, o inibidor da MAPK p38 (SB 203580) coadministrado com TNF- α na articulação atenuou a resposta nociceptiva mecânica no joelho dos animais através da redução da sensibilização das fibras polimodais C e A δ . A

observação de DRG de neurônios de murinos em cultura indicou que o bloqueio da enzima preveniu o aumento das correntes de Na⁺ incitadas pelo TNF- α (RICHTER *et al.*, 2010). Com isto, estes dados evidentemente apontam para a inibição da MAPK p38 como uma abordagem antinociceptiva aprazível porque possivelmente medeia a interrupção da sinalização incitada pelo TNF- α , bem como, bloqueia a produção de mediadores inflamatórios álgicos.

Neste contexto, a MAPK tem sido considerada um alvo farmacológico ideal para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da AR (PAUNOVIC & HARNETT, 2013).

Atualmente, já existem três gerações de inibidores MAPK p38, sendo que as duas primeiras não lograram êxito a fármacos em virtude das suas interações com várias enzimas quinases. Entretanto, a terceira geração de compostos é altamente seletiva a este alvo (GOLDSTEIN *et al.*, 2010).

Apesar de diversos inibidores de MAPK p38 diminuírem de forma potente a produção de TNF- α , bem como de outras citocinas, de apresentarem efeito anti-hipernociceptivo pronunciado em modelos *in vivo* e serem bem tolerados, nenhum deles foi aprovado como fármaco para o tratamento da AR por não sustentarem seus efeitos anti-inflamatórios além das primeiras semanas dos ensaios clínicos, permitindo sugerir a existência de vias inflamatórias compensatórias a inibição da MAPK p38 (GOLDSTEIN *et al.*, 2010).

Finalmente, alguns trabalhos indicam que a MAPK p38 é um alvo farmacológico atraente para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da AR por causa, não somente da sua clara função pronunciada na produção de TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias, mas também por regular cascatas de sinalizações de receptores de IL-17, IL-1 e TNF- α , além daquelas ativadas pela interação entre o antígeno com receptores de células T (PAUNOVIC & HARNETT, 2013; KONG *et al.*, 2013).

1.2.3 Fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B)

O fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B) é formado por subunidades homo- ou heterodímeras (p65, Rel B, cRel, NF- κ B1 (p50 e seu precursor 105) e NF- κ B2 (p52 e seu precursor p100)) e apresenta homologia em um domínio essencial para a dimerização das subunidades, para a ligação com a proteína inibitória I- κ B e na interação com o DNA. Em grande parte das células, a forma mais comum é o

heterodímero p50/p65 enquanto os homodímeros exibem pouca capacidade de indução gênica (YAMAMOTO & GAYNOR, 2004).

Em um contexto inicial, o NF- κ B é encontrado no citoplasma sob a forma não-ativada por estar acoplado a molécula inibitória I- κ B (BALDWIN, 1996). Após a ação de uma ampla gama de estímulos (radiação ultravioleta, vírus, apresentação de antígenos a células T, LPS, IL-1 e TNF- α , por exemplo), há a indução da ativação da I- κ B quinase (IKK) que, por sua vez, fosforila a subunidade I- κ B, causando a consequente dissociação do NF- κ B. Este conjunto de reações provoca a ativação do NF- κ B e promove sua translocação para o núcleo, onde normalmente interage com a região promotora no DNA para a transcrição de genes de moléculas efetoras da inflamação e proteínas do ciclo celular (Figura 8) (FIRESTEIN & MANNING, 1999; NIEDERBERGER & GEISLINGER, 2008; FAN *et al.*, 2013).

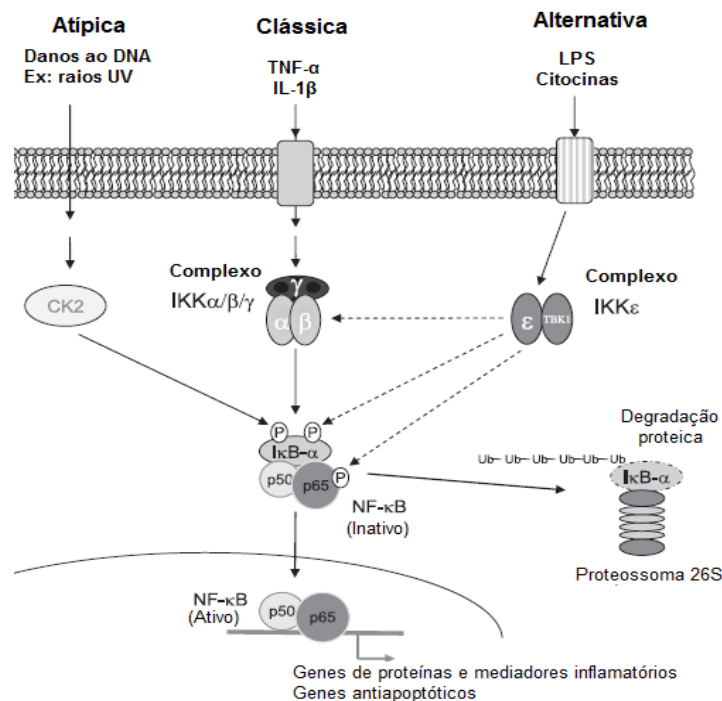


Figura 8: A transcrição gênica de proteínas e mediadores inflamatórios a partir da ativação do NF- κ B (Adaptado de: NIEDERBERGER & GEISLINGER, 2008).

Diversos estudos indicam que a cascata de sinalização que resulta na ativação de NF- κ B tem participação crucial nas respostas imunológicas de doenças autoimunes como a AR (NIEDERBERGER & GEISLINGER, 2008). Em meados da década de 1990, o pioneirismo de Handel e colaboradores mostrou que as

subunidades p50 e p65 podem ser encontradas nas células endoteliais e macrófagos presentes na sinóvia de pacientes com AR (HANDEL *et al.*, 1995). De fato, as vias de sinalização que envolvem a ativação de NF- κ B aumentam a expressão de genes de proteínas importantes no contexto inflamatório, tais como: moléculas de adesão, quimiocinas, COX-2 e citocinas (GM-CSF, IL-1, IL-6 e TNF- α , por exemplo), indicando que o NF- κ B pode contribuir substancialmente para a gênese e desenvolvimento da AR (LI *et al.*, 2000; MÜLLER-LANDNER *et al.*, 2002). Em tempo, vale ressaltar que a ativação de NF- κ B nos macrófagos e em fibroblastos de pacientes com AR pode ser mediada pelo TNF- α que, neste caso, forma uma autorregulação da produção da referida citocina e conseqüentemente amplifica a duração da resposta inflamatória (JOVANOVIC *et al.*, 2001; TRENKMANN *et al.*, 2013).

Pelos fatos já abordados referentes ao processo álgico e em virtude do perfil dos genes cuja transcrição é regulada pela sua ativação, o NF- κ B pode representar um aspecto importante para a ocorrência do processo hipernociceptivo. Por exemplo, há fortes indícios que a administração intraplantar de um determinado agente flogístico provoca o desenvolvimento da hipernocicepção térmica promovida pelo aumento da produção de PGE₂ proveniente da maior expressão de COX-2 que pode ser regulada pelo NF- κ B (DOYLE *et al.*, 2011).

Neste contexto, estímulos nocivos originados de tecidos inflamados aumentam a sensibilização de neurônios do corno dorsal. Recentemente, Luo e colaboradores (2014) mostraram que a inflamação periférica desencadeada por um modelo experimental de AIA induziu um aumento da expressão de NF- κ B em fibras do corno dorsal da medula espinhal. Além do mais, dados consistentes revelam que o silenciamento deste fator de transcrição no SNC atenuou significativamente a expressão de TNF- α , COX-2 e PGE₂ e a hipernocicepção, indicando que o NF- κ B espinhal exerce papel relevante no desenvolvimento da transmissão nociceptiva mediada pela inflamação (LUO *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2004).

Em suma, o conjunto de dados aponta para o NF- κ B como um possível alvo farmacológico para o desenvolvimento de novos protótipos candidatos a fármacos para a redução da dor e do processo inflamatório relacionados a AR.

1.2.4 Janus quinase (JAK)

Uma característica comum ao aumento da expressão de citocinas é a ativação de vias de sinalização que conseqüentemente comprometem uma série de respostas celulares (GADINA, 2013).

Neste contexto, a ativação da via de sinalização que envolve a janus quinase (JAK) e os transdutores de sinais e ativadores de transcrição (do inglês: *signal transducer and activator of transcription*- STAT) é o evento intracelular predominante desencadeado pelas citocinas (KAMINSKA & SWIATEK-MACHADO, 2008).

A família da JAK é composta por quatro isoformas de tirosina quinase (TYK) nomeadas como JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2 que seletivamente são associadas com cadeias intracelulares de receptores de citocinas. Então, após a interação destes mediadores com receptores transmembranares específicos, a JAK, pela qual atua em pares, medeia a sinalização no interior da célula pela fosforilação de resíduos de tirosina nos receptores e em membros da STAT através da autofosforilação. Uma vez ativada, a STAT se dimeriza no citoplasma, transloca para o núcleo e inicia a modulação da expressão de genes alvos (citocinas e receptores de reconhecimento padrão (PRRs)) (Figura 9). Em tempo, a interação destes receptores com seus ligantes correlacionados propicia a ativação de cascatas de sinalização mediadas pelas MAPKs e pelo NF- κ B (AITTOMÄKI & PESU, 2013; JENKINS, 2014).

Vale destacar que ao contrário dos outros membros JAK que estão presentes relativamente em todos os tecidos, a JAK3 é expressa constitutivamente em células T, células B e mieloides, bem como em células do músculo liso vascular e do endotélio (LEONARD & O'SHEA, 1998).

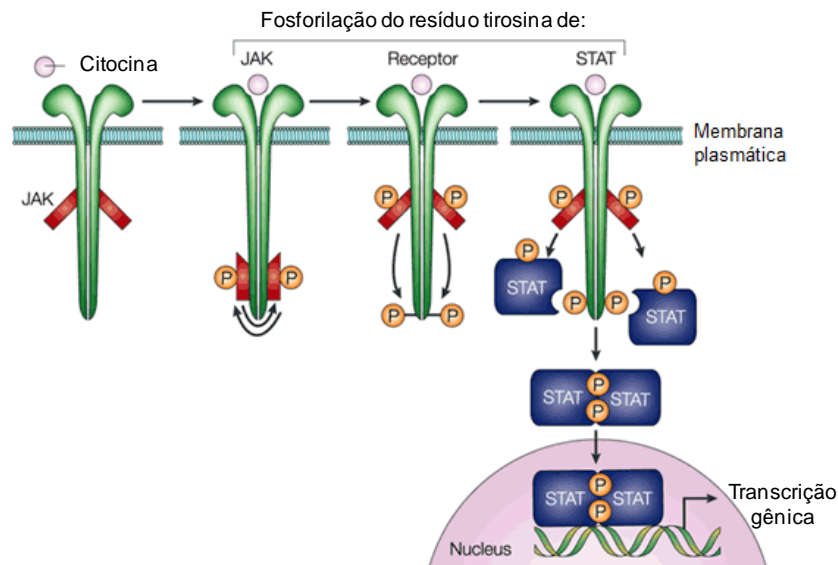


Figura 9: Ativação da via de sinalização intracelular JAK/STAT e a regulação da transcrição gênica induzidas por citocinas (LEVY & DARNELL JR, 2002).

Considerando a natureza biológica diversificada atribuída a via de sinalização JAK/STAT, a sua ativação aumentada tem sido relacionada com inúmeras doenças crônico-inflamatórias (O'SHEA & PLENGE, 2012). Como exemplo, estudos realizados com macrófagos de pacientes com AR mostraram que os inibidores JAK foram capazes de suprimir a ativação e a expressão de STAT1, além da redução da transcrição de genes de mediadores inflamatórios induzidos pelo TNF- α . Adicionalmente, estes compostos diminuíram significativamente a produção de IL-6 e a localização nuclear da subunidade de NF- κ B nas referidas células quando estimuladas pelo TNF- α , mas também naquelas originadas com AR. A partir destes dados, os autores sugeriram que tais efeitos proporcionados pelos inibidores JAK podem suprimir a produção de citocinas induzidas pelo TNF- α (YARILINA *et al.*, 2012). De modo relevante, a ativação da via JAK/STAT permite a diferenciação de células Th nos fenótipos Th1 ou Th2 (KAMINSKA & SWIATEK-MACHADO, 2008).

Portanto, a compreensão da via de sinalização mediada pela JAK associada a trabalhos que mostram os efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores provenientes da sua inibição permitiram o desenvolvimento do tofacitinibe para o tratamento da AR (MIGITA *et al.*, 2013; FLEISHMAN *et al.*, 2012).

1.2.5 Antinocicepção e imunossupressão mediadas pelo sistema canabinoide

A exemplo do Δ^9 -tetraidrocanabinol, os canabinoides são constituintes ativos da *cannabis sativa* que desencadeiam diversos efeitos no organismo, com destaque para as propriedades psicoativas. Contudo, a busca pela compreensão do mecanismo de ação destas substâncias bioativas identificou um sistema complexo que envolve receptores canabinoides transmembranares acoplados a proteínas G inibitórias, denominados CB1 e CB2, bem como seus ligantes endógenos: a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol, também conhecidos como endocanabinoides (LICHTMAN *et al.*, 2010).

Em tempo, as ações catalíticas da monoacilglicerol lipase (MAGL) e a amido hidrolase de ácidos graxos (do inglês: *fatty acid amide hydrolase*- FAAH) podem regular indiretamente os efeitos dos endocanabinoides. Em trabalho recente, Pertwee relatou que a inibição destas enzimas pode elevar a concentração dos ligantes canabinoides endógenos e, portanto, seria uma estratégia farmacológica com potencial aplicação terapêutica (PERTWEE, 2014).

Inicialmente, os receptores CB1 são expressos predominantemente no SNC, principalmente em neurônios do hipocampo, do gânglio da base e axônios de interneurônios gabaérgicos, regulando a transmissão sináptica. As principais consequências relacionadas ao agonismo em CB1 são a analgesia, hipotermia, redução da cognição, catalepsia e a supressão da locomoção (WILEY *et al.*, 2014). A nível periférico, estes receptores também são localizados em neurônios aferentes, em adipócitos, células hepáticas e músculo esquelético, mas limitado nas células T (TANASESCU & CONSTANTINESCU, 2010; BÖRNER *et al.*, 2008).

Já a distribuição dos receptores CB2 pode ser assumida em pequenas populações de neurônios do SNC, mas principalmente nos axônios de neurônios periféricos e em células B, macrófagos, neutrófilos e células T (GRAHAM & ASHTON, 2009). Por estas razões, estes receptores exercem regulações importantes relacionados com a imunossupressão, bem como nos processos inflamatório e algico. Ainda, os receptores CB2 são significativamente mais frequentes que CB1 em células do sistema imunológico (MASSI *et al.*, 2006).

Neste contexto, estudos recentes mostraram que, além da expressão tanto de CB1 quanto de CB2 em tecido sinovial de pacientes com AR, há também níveis

aumentados de AEA e o 2-araquidonoilglicerol no líquido sinovial quando comparados com indivíduos saudáveis (GUI *et al.*, 2014; RICHARDSON *et al.*, 2008).

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado por Massi e colaboradores (2006), a ativação de receptores CB2 pela anandamida pode diminuir o recrutamento de macrófagos e neutrófilos, bem como alterar o número e a proliferação de células T de modo variável conforme a dose. Ademais, os efeitos inibitórios dos endocanabinoides frente à produção de PGE₂, IL-6 e TNF- α de macrófagos estimulados com LPS permitiram sugerir que o sistema de ligantes e receptores canabinoides apresenta funções imunomoduladoras relevantes.

Ainda de modo complementar, a administração de um agonista CB2 na pata de animais estimulados com carragenina foi capaz de reverter a hipernocicepção térmica. Por fim, a literatura relata que agonistas de receptores canabinoides exibem efeito antinociceptivo em diversos modelos experimentais de dor inflamatória (QUARTILHO *et al.*, 2003; PERTWEE, 2001). Em conjunto, os autores demonstram que a hipótese analgésica a partir da ativação destes receptores é verdadeira.

1.3 MODELO DE ARTRITE REUMATOIDE INDUZIDA POR ANTÍGENO (AIA)

A artrite induzida por antígeno (AIA) foi desenvolvida como um modelo de AR humana que utiliza albumina bovina sérica metilada (mBSA) como antígeno. Inicialmente, a AIA foi estabelecida em camundongos pela imunização com mBSA em CFA seguida de única administração intra-articular do antígeno em solução salina para investigar a participação de células imunológicas na indução e persistência da AR experimental. Claramente, o trabalho mostra a ocorrência da artrite grave dependente do antígeno, refletindo uma resposta imunológica mediada por células, e ressalta que a estratégia do modelo induziu a hiperplasia da membrana e da sinóvia, lesões marcadas pela presença de *pannus* que resultou em alterações erosivas da cartilagem e do osso subcondral, além da infiltração pronunciada de linfócitos e macrófagos. Inequivocamente, a AIA perdurou por mais de 24 semanas, indicando a cronicidade do modelo. Entretanto, estudos sugerem que a reação imune ao antígeno no referido modelo seja reversível (BRACKERTZ *et al.*, 1977a, CUNHA *et al.*, 2008b).

Neste modelo há fortes indícios da presença da resposta humoral ao mBSA e significativa atividade de células T CD4⁺ e CD8⁺ que contribui para a indução e persistência da AIA, além da resposta inflamatória (KLASEN *et al.*, 1987; KLASEN *et al.*, 1989). De acordo com o exposto na literatura, animais de linhagem atímica ou

submetidos à transferência celular não apresentaram artrite induzida por mBSA, sugerindo que este modelo parece ser dependente de células T. A realização do teste de hipersensibilidade do tipo tardio em camundongos de ambos os sexos mostrou de modo destacável que a resposta ao mBSA foi maior nas fêmeas (BRACKERTZ *et al.*, 1977b; BRACKERTZ *et al.*, 1977c; KLASSEN *et al.*, 1986).

A administração de mBSA em animais previamente imunizados induziu a migração de neutrófilos para o local da inflamação durante as 24 h iniciais da artrite experimental, também chamada de fase aguda. De modo complementar, os pesquisadores averiguaram que o aumento do influxo de neutrófilos pode ser intermediado por citocinas (TNF- α e IL-1 β) que são liberadas a partir da ação de IL-33 produzida por fibroblastos e macrófagos após a resposta imune adaptativa (a indução de IL-33 é desconhecida, mas provavelmente envolve citocinas pró-inflamatórias originadas de células T e macrófagos depois do estímulo com o antígeno específico). Por fim, a IL-33 também provocou a produção de TNF- α pelo tecido sinovial, induziu a liberação dos mesmos mediadores citados anteriormente por macrófagos e diretamente recrutou neutrófilos (VERRI JR *et al.*, 2010).

Ainda com relação aos mediadores inflamatórios envolvidos no modelo em questão, a IL-17 parece ter papel crucial na gênese da AR já que a inibição ou deficiência desta citocina causa maior resistência à indução da artrite e atenua a lesão do osso e da cartilagem (LUBBERTS *et al.*, 2005; BUSH *et al.*, 2002). Ademais, há eventos na origem da hipernocicepção articular no modelo de AIA que são desempenhados de modo relevante pela IL-17. Em 2010, Pinto e colaboradores observaram que a produção de IL-17 em articulações durante a AIA provoca o recrutamento de neutrófilos e ocasiona uma resposta hipernociceptiva dependente deste tipo celular, bem como de TNF- α e IL1 β , nas primeiras horas do modelo, dita fase aguda. Da mesma forma, os autores sugerem que a PGE₂ e aminas simpáticas contribuem com ações hipernociceptivas da IL-17 no modelo em questão.

Em estudos realizados por Cunha e colaboradores (2008b) para investigar a origem da hipernocicepção mecânica em camundongos estimulados com mBSA foi observado que os animais desafiados com o antígeno em questão previamente imunizados com CFA e mBSA apresentaram uma sequência de liberação de mediadores inflamatórios. Segundo os autores, o aumento nos níveis de TNF- α precede a elevação das concentrações de IL-1 β e KC/CXCL1 (IL-8). Vale ressaltar

que a liberação destes dois últimos mediadores foi dependente da produção de TNF- α .

Ademais, a caracterização do modelo mostrou que a hipernociceção induzida por IL-1 β nos animais submetidos a AIA foi dependente de prostanoídes e aminas simpáticas. Logo, estes resultados permitem sugerir que há a intermediação do processo hipernociceptivo por prostaglandinas e aminas simpáticas após a liberação das citocinas mencionadas cujas liberações são dependentes da produção inicial de TNF- α . Este fato indica a existência de uma cascata de mediadores inflamatórios no modelo de hipernociceção mecânica induzida pelo mBSA (Figura 10) (CUNHA *et al.*, 2008b).

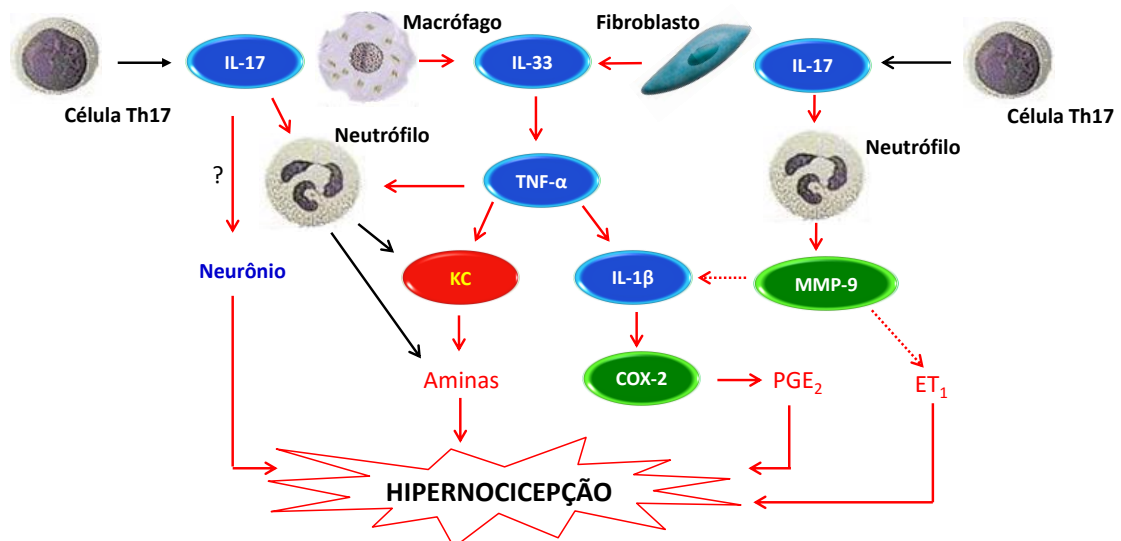


Figura 10: Cascata de eventos que desencadeia a hipernociceção em animais com artrite induzida por BSA (PINTO *et al.*, 2010; VERRI JR *et al.*, 2010; CUNHA *et al.*, 2008b) (CRIADO POR: Ewerton A. Portela dos Santos, 2015).

1.4 FARMACOTERAPIA DA AR

Mundialmente, o paradigma contemporâneo para o tratamento da AR preconiza a intervenção terapêutica intensa e agressiva no início da manifestação da doença com o objetivo de alcançar o menor estado ativo dos seus sinais e sintomas pelo maior período possível, prevenindo os danos estruturais à articulação (SMOLEN *et al.*, 2010; RUOFF, 2014). Caso não seja tratada adequadamente, os pacientes sofrem com dores crônicas, inflamação persistente, progressão dos danos à cartilagem e ossos,

aumento da incapacidade física e, finalmente, diminuição da qualidade e da expectativa de vida do paciente (MODY & CARDIEL, 2008; AGARWAL, 2011).

O tratamento mais adequado de pacientes com AR requer estratégias individualizadas e o estabelecimento de um diálogo contínuo entre médico e paciente para o acompanhamento da eficácia clínica da terapia. Tal abordagem pode facilitar a adesão do paciente ao tratamento, o que é essencial para a evolução ideal da terapêutica de doenças crônicas. Apesar de a eficácia clínica ser um fator crucial para a determinação da terapia, seus custos, complicações e suas comorbidades, além da conveniência do uso dos medicamentos (fator pelo qual pode influenciar na adesão do paciente) também são aspectos importantes que afetam a escolha do tratamento (KAVANAUGH, 2010).

A terapia corrente da AR envolve uma ampla variedade de agentes que exercem seus efeitos anti-inflamatórios ou imunomoduladores. Estes medicamentos podem ser micromoléculas, no caso dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), dos anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) e dos medicamentos antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs), ou macromoléculas que incluem anticorpos e receptores solúveis. Vale ressaltar que os referidos medicamentos são indicados por atenuar os sinais e os sintomas da AR. À exceção dos AINEs, a terapêutica atual pode retardar a progressão da lesão óssea e o estreitamento da cavidade articular e, conseqüentemente, a evolução da doença (PISETSKY & WARD, 2012).

Por fim, o tratamento que inclui a associação de fármacos pode ser mais apropriado por atuar em diferentes mecanismos envolvidos na geração da dor, favorecendo o sinergismo entre os efeitos dos fármacos (VAN DER LAAR *et al.*, 2012).

1.4.1 Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs)

Os AINEs podem ser indicados para o tratamento farmacológico de pacientes com AR por causar um efeito analgésico mais imediato comparado a outros fármacos (RUOFF, 2014).

O mecanismo de ação dos AINEs tradicionais consiste na inibição não-seletiva das isoformas da enzima COX-1 e COX-2. No entanto, apesar da sua eficácia terapêutica incontestável, o tratamento prolongado com AINEs acarreta no surgimento de efeitos gastrointestinais indesejáveis, como gastrite erosiva, úlcera péptica e complicações ulcerativas que justificam a descontinuidade da terapia em grande parte

dos pacientes. Ainda, o uso de AINEs em indivíduos suscetíveis a manifestação destes efeitos colaterais é fortemente desencorajado (RAO & KNAUS, 2008).

Os inibidores seletivos de COX-2 foram desenvolvidos na expectativa de reduzir o surgimento dos efeitos colaterais gástricos associados à inibição não-seletiva da enzima COX. Deste modo, a Searle e a Pfizer, atualmente Pfizer Inc., desenvolveu o celecoxibe (Celebra[®]), seguido pelo rofecoxibe (Vioxx[®]) da Merck. Entretanto, estudos conclusivos demonstraram que o uso de inibidores seletivos da COX-2 provoca um desequilíbrio entre as concentrações naturais do eicosanoide protrombótico TXA₂, proveniente das plaquetas, e da PGI₂ (antiagregante/antitrombótico) originada das células endoteliais, potencializando o surgimento de problemas cardiovasculares como o infarto agudo do miocárdio, justificando a suspensão da comercialização do Vioxx[®] (RUOFF & LEMA, 2003).

Contudo, os inibidores COX-2 ainda são considerados fármacos analgésicos e anti-inflamatórios importantes para o tratamento de milhões de pacientes. Nunca é demasiado afirmar que os AINEs constituem um vasto arsenal de opções farmacológicas para o tratamento anti-inflamatório de diversas doenças, inclusive para a AR (ABRAMSON, 2011).

Apesar de cerca de 10 milhões de pessoas no mundo serem tratadas diariamente com AINEs, a obtenção do equilíbrio entre seus benefícios e os riscos existentes continua um desafio a ser superado (ABRAMSON, 2011).

1.4.2 Glicocorticoides

Historicamente, os glicocorticoides são empregados para o tratamento da AR desde 1948 graças às observações de Philip Hench sobre a administração de cortisona na rápida remissão dos sintomas da doença (HENCH, 1950).

Extensamente indicado em todo o mundo, os glicocorticoides são amplamente utilizados no tratamento da AR em virtude dos seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores e, por isto, constituem a abordagem padrão em administração associada a algum DMARD (STAHN *et al.*, 2007).

Atualmente, cerca de 55% dos pacientes com AR nos países desenvolvidos usam estes fármacos enquanto que nos países em desenvolvimento esta taxa pode ser maior por, invariavelmente, disponibilizar menos recursos e principalmente porque com frequência os glicocorticoides estão disponíveis sem prescrição médica (WOLFE *et al.*, 2006; KALLA & TIKLY, 2003).

A indicação dos glicocorticoides para o tratamento da AR é embasada a partir de evidências convincentes (KIRWAN *et al.*, 2007; KIRWAN, 1995). Além de os glicocorticoides induzirem efeitos modificadores da doença (inibem danos articulares observados por radiografia) nos primeiros anos de tratamento, estes fármacos também são indicados para a terapia da AR por cobrir o início tardio da manifestação dos efeitos terapêuticos dos DMARDs que pode ser de semanas a meses (HUSCHER *et al.*, 2009; HOES *et al.*, 2010; VAN EVERDINGEN *et al.*, 2002).

Ainda, melhores resultados obtidos com o emprego de glicocorticoides tem sido documentado com relação a todos os parâmetros clínicos, incluindo a fadiga, rigidez articular matinal e a dor. De um modo geral, apesar de os efeitos benéficos diminuïrem após seis meses do início da terapia, alguns médicos reportam que os pacientes sofrem agravamento dos sintomas da doença com a interrupção do tratamento (SPIES *et al.*, 2009).

Mesmo que os glicocorticoides exerçam seus efeitos por múltiplos mecanismos que não foram completamente compreendidos, diversos estudos indicam que os AIEs suprimem a inflamação por inúmeros fatores dos quais podem ser citados: a inibição da produção de mediadores inflamatórios, como o TNF- α e as prostaglandinas, e a redução na migração leucocitária para a área da lesão (BARNES, 2006).

De um modo geral, os glicocorticoides promovem alterações difundidas pelo organismo. Seus efeitos acontecem a partir da interação e ativação do receptor de glicocorticoide localizado no citoplasma, induzindo sua translocação para o núcleo. Em seguida, o complexo formado (receptor-fármaco) se liga em regiões específicas de fatores de transcrição gênica, como AP-1 e NF- κ B. Conseqüentemente, há a supressão da expressão de genes codificadores de moléculas de adesão e de diversas citocinas, tais como: IL-1, IL-6 e o já citado TNF- α . De modo complementar, os glicocorticoides regulam negativamente os genes da iNOS e COX-2 e assim contribuem respectivamente para a redução da produção de óxido nítrico e PGE₂ nos tecidos inflamados (SCHIMMER & PARKER, 2006).

Claramente, grande parte dos autores foca nos efeitos terapêuticos dos glicocorticoides e não no monitoramento da terapia. Tal conduta possivelmente prejudica a identificação dos efeitos adversos que podem ser relevantes na prática clínica diária. Mesmo assim, os efeitos indesejáveis destes fármacos são amplamente descritos (VAN DER GOES *et al.*, 2010).

Mesmo a administração de doses inferiores a 7,5 mg de prednisolona ou corticoide equivalente resulta em efeitos indesejáveis, incluindo: hiperglicemia, cataratas e glaucoma, além da possibilidade de alguns casos de osteoporose e disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal que pode contribuir para os distúrbios apresentados pela interrupção abrupta do tratamento (CADWELL & FURST, 1991; BARNES & ADCOCK, 2009). Ademais, Saang e colaboradores (1994) definiram que estas baixas doses de glicocorticoides administrados por aproximadamente cinco anos ocasionam o desenvolvimento de fraturas, sangramento ou formação de úlceras no TGI, além do aumento do risco de infecções graves, como pneumonia (STUCK *et al.*, 1989; WOLFE *et al.*, 2006).

Adicionalmente, a terapêutica de associação do glicocorticoide com um DMARD está intimamente relacionada com maior incidência de efeitos adversos, ainda que esta conduta seja preconizada ou que prolongue os efeitos promovidos pelo metotrexato (MALYSHEVA *et al.*, 2008).

Apesar dos constantes e prováveis efeitos colaterais provenientes do uso de glicocorticoides, a diversidade de fármacos desta classe e dos regimes disponíveis para o tratamento associados ao seu baixo custo também os tornam uma opção atrativa na terapêutica em associação com DMARDs.

1.4.3 Medicamentos antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs)

Até meados dos anos 90, os reumatologistas consideravam os medicamentos antirreumáticos modificadores da doença (do inglês: *Disease Modifying Antirheumatic Drugs*- DMARDs) como a principal opção farmacológica para o tratamento de pacientes com AR. Esta classe de medicamentos é composta por fármacos estruturalmente diversificados que incluem o ouro, a sulfassalazina, a hidroxiclороquina, a cloroquina, a ciclosporina, a azatioprina, a D-penicilamina, o auranofin e o metotrexato, que é mais efetivo e menos tóxico que os outros. Estes fármacos são capazes de reduzir o edema e a dor, além de limitar os danos progressivos às articulações e melhorar suas funções (SMITH *et al.*, 2011).

Indicado inicialmente para a terapêutica da leucemia (1948), o metotrexato foi testado em pacientes com AR apenas em 1962. Contudo, somente após os resultados publicados por Hoffmeister (1983) e a aprovação do FDA em 1988 que os reumatologistas incluíram gradativamente o metotrexato no arsenal terapêutico contra

a AR. Atualmente, este fármaco é considerado o principal componente do tratamento de indivíduos com a referida doença autoimune (WEINBLATT, 2013).

Mais ainda, um estudo realizado por Krause e colaboradores (2000) mostrou que a eficácia terapêutica do metotrexato está associada à redução da mortalidade dos pacientes com AR grave, indicando um prognóstico melhor para estes indivíduos. Todavia, as pessoas tratadas com o metotrexato continuamente tendem a ser refratários à terapia e com efeitos colaterais significativos (VAN VOLLENHOVEN & CHATZIDIONYSIOU, 2013).

Sabendo que o metotrexato inibe a diidrofolato redutase, uma enzima importante na formação do cofator essencial para a síntese de precursores de DNA, o tetraidrofolato (FH₄), os principais efeitos tóxicos provocados pelo metotrexato podem ser observados em células em rápida divisão da medula óssea e do epitélio do trato gastrointestinal, resultando em mucosite, mielossupressão e trombocitopenia. Outrossim, a fibrose e a cirrose hepática constituem outros efeitos colaterais de importância particular na administração ininterrupta do metotrexato. Vale destacar que o aumento da fibrose portal do fígado é detectado frequentemente e exige a suspensão da administração do fármaco (CHABNER *et al.*, 2006).

Em suma, a redução da eficácia e o advento de efeitos colaterais potencialmente graves que justificam a interrupção do tratamento são fatores que certamente prejudicam o controle adequado da evolução da AR.

1.4.3.1 Inibidor JAK3

Desde a descoberta do papel da JAK como uma das principais vias de sinalização envolvendo a síntese de citocinas, há esforços significativos na obtenção de um fármaco inibidor da JAK e, portanto, com potencial efeito imunomodulador.

Inicialmente conhecido como tasocitinibe e CP-690550, o tofacitinibe (figura 11) é um inibidor da enzima JAK3 desenvolvido pela Pfizer que regula negativamente a resposta inflamatória. Em 06 de Novembro de 2011, este fármaco foi aprovado pela agência americana de saúde e serviços humanos, FDA (do inglês: *Food and Drug Administration*), para o tratamento da AR moderada à severa em adultos com resposta inadequada ou com intolerância ao metotrexato. O tofacitinibe é o primeiro fármaco classificado como DMARD a atingir o mercado em mais de 10 anos e um imunomodulador vantajoso por ser administrado por via oral (NEWS IN BRIEF, 2012).

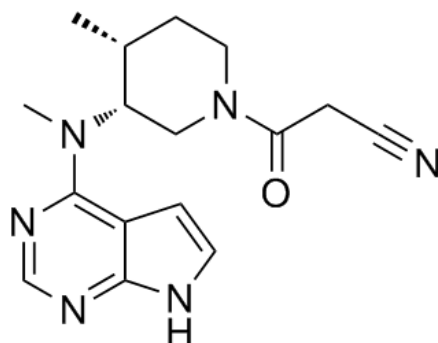


Figura 11: Tofacitinibe é um inibidor JAK3 administrado por via oral indicado para o tratamento da AR.

Estudos clínicos de fase III que foram relevantes para a aprovação do inibidor JAK para o tratamento da AR pelo FDA mostraram que a monoterapia com tofacitinibe a 5 ou 10 mg por 2 vezes ao dia por via oral exibiu significativa redução nos sinais e sintomas da referida doença, bem como a melhora da função física dos pacientes comparados ao placebo (FLEISHMAN *et al.*, 2012). Após 6 meses de tratamento, o fármaco em questão também apresentou eficácia clínica, que perdurou por 12 meses, similar ao adalimumabe, um anticorpo anti-TNF- α (VAN VOLLENHOVEN, 2012). Vale ressaltar que o tofacitinibe foi efetivo na terapia de pacientes com AR ativa e não-responsivos à DMARD (KREMER *et al.*, 2012; FLEISHMAN *et al.*, 2012b).

Apesar de a efetividade pronunciada do tofacitinibe não ser diferente entre as doses empregadas, o tratamento com doses de 10 mg do fármaco por 12 meses provocou eventos adversos mais frequentes comparados ao placebo. Ademais, o uso do tofacitinibe foi associado com a redução do número de neutrófilos, o aumento dos níveis de LDL e HDL, efeitos gastrointestinais e cardíacos indesejáveis. Ainda, os autores reportaram o desenvolvimento de tuberculose sem, contudo, haver a manifestação de outras infecções oportunistas e sugeriram o monitoramento médico para cada evento (VAN VOLLENHOVEN, 2012).

Além de fornecer uma nova opção terapêutica para o tratamento da AR, a aprovação do tofacitinibe impulsiona a promessa de micromoléculas como imunomoduladores. Ainda, dentre outros inibidores JAK que estão em

desenvolvimento para a terapia farmacológica da AR, o baricitinibe (INCB28050 e LY3009104) da Lilly é o mais avançado nas pesquisas de fase clínica (DOLGIN, 2011).

1.4.4 Fármacos biotecnológicos

Há aproximadamente dez anos, a introdução da terapia biológica revolucionou o tratamento da AR por melhorar notavelmente os seus sintomas e por proporcionar um controle mais adequado do desenvolvimento da doença (CAÑETE & PABLOS, 2013). Os fármacos biotecnológicos diferem dos DMARDs convencionais por serem proteínas associadas ou anticorpos monoclonais produzidos a partir de técnicas de engenharia genética e obtidos em culturas de células eucariontes (SMOLEN *et al.*, 2007).

Sabendo que a etiologia da AR envolve aspectos multifatoriais com a participação de diversas citocinas fundamentais tanto para a gênese quanto para a sua manutenção, alguns estudos pioneiros evidenciaram resultados relevantes sobre a evolução dos sinais e sintomas da AR a partir da neutralização do TNF- α . Com este trabalho, houve de fato um novo direcionamento nas estratégias de tratamento da referida doença autoimune (ELLIOTT *et al.*, 1994).

Atualmente, o bloqueio de TNF- α é amplamente considerado na terapêutica de pacientes com AR em virtude da rápida e eficiente neutralização da inflamação articular baseada na descontinuidade da cascata de citocinas. Alguns anticorpos e receptores solúveis que neutralizam estes mediadores tem sido amplamente desenvolvidos e mudam significativamente o curso desta doença, apesar de serem utilizados em associação com metotrexato e indicado após o paciente não responder ao tratamento somente com DMARD (Quadro 1) (SHETTY *et al.*, 2014; CAÑETE & PABLOS, 2013; AGARWAL, 2011).

Como exemplo da eficácia destes fármacos, estudos experimentais demonstram que a administração intra-articular de etanercepte ou infliximabe previne a sensibilização de fibras polimodais C induzida pelo TNF- α em articulações inflamadas que conseqüentemente reduziu a condução de impulsos nervosos, atenuou os comportamentos associados à dor e melhorou a locomoção dos animais no modelo de AIA. Segundo König e colaboradores (2014), o tratamento com etanercepte também diminui a excitabilidade de neurônios da medula espinhal. Há a importância de mencionar que a administração de etanercepte em articulações normais não altera o limiar de ativação das fibras polimodais C em animais selvagens.

Assim, a neutralização do TNF- α em joelhos inflamados diminui consideravelmente a hipernocicepção mecânica induzida tanto por estímulos inócuos quanto nocivos (SCHAIBLE *et al.*, 2010; RICHTER *et al.*, 2010; BOETTGER *et al.*, 2008).

Quadro 1: Fármacos biotecnológicos indicados para o tratamento da AR (CRIADO por: Ewerton A. Portela dos Santos, 2015).

Fármaco biotecnológico	Características	Alvo	Via de administração	Esquema terapêutico	Indicação	Apresentação/ PMC*
Etanercepte (Enbrel®)	Fusão entre receptor p75 com fragmento IgG humano	TNF- α	Subcutânea	50mg/semana	Pacientes refratários aos DMARDs	25mg sol. Injetável/ R\$ 4.138,93
Infliximabe (Remicade®)	Anticorpo quimérico 75% humano/25% murino	TNF- α	Subcutânea	3-10mg/kg a cada 4-8 semanas	Associação com metotrexato	10mg/ml-10ml/ R\$ 1.930,15
Adalimumabe (Humira®)	Anticorpo humano	TNF- α	Subcutânea	40mg a cada 2 semanas	Pacientes refratários aos DMARDs	40mg sol. Injetável/ R\$ 8.796,74
Certolizumabe Pergol (Cimzia®)	Fragmento do anticorpo humano ligado a subunidade polietilenoglicol	TNF- α	Subcutânea	400mg/mês	Pacientes refratários aos DMARDs	200mg/ml-1ml/ R\$ 2.228,22
Golimumabe (Symponi®)	Anticorpo humano	TNF- α	Subcutânea	50mg/semana	Pacientes refratários aos DMARDs	50mg sol. Injetável/ R\$ 4.243,94
Abatacepte (Orencia®)	Fusão entre domínio extracelular de receptores e fração de IgG	Bloqueia ativação de células T	Intravenoso	0,5-1,0g em 2 semanas a cada 6 meses	AR moderada/severa e refratários ao MTX	125mg/ml/ R\$ 1.566,49
Rituximabe (Mabthera®)	Anticorpo quimérico murino/humano	Células B CD20 ⁺	Intravenoso	2,0g em 2 semanas/6 meses	AR moderada/severa e refratários ao MTX	10mg/ml- 50ml/ R\$ 5.356,74
Tocilizumabe (Actemra®)	Anticorpo humanizado	Receptor IL-6	Intravenoso	4-8mg/kg a cada 4 semanas	AR moderada/severa refratários ao MTX; resistentes aos anti-TNF- α	20mg/ml- 20ml/ R\$ 3.545,47
Anakinra (Kineret®)	Antagonista do receptor IL-1	Receptor IL-1	Subcutânea	100mg/dia	Associação com metotrexato	_____ #

*PMC (Preço Máximo ao Consumidor) - estabelecido pela Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos (CMED- ANVISA). Atualizada em: 22/09/14.

Preço Máximo ao Consumidor- preço praticado pelo comércio varejista de medicamentos que contempla tanto a margem de lucro como os impostos inerentes a este tipo de comércio;

O valor praticado pelas empresas produtoras ou importadoras do produto não está contemplado na lista de preços de medicamentos. Não há registro do medicamento na ANVISA.

http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2621c90045918c4d9ffedf218296bdf2/LISTA+CONFORMIDADE_2014-09-22.pdf?MOD=AJPERES

Clinicamente, o bloqueio do TNF- α propiciado pelo infliximabe melhora rapidamente as condições de dor dos pacientes com AR, antes mesmo de atingir os efeitos anti-inflamatórios na articulação. Em 2011, Hess e colaboradores mostraram que a administração deste fármaco biotecnológico promoveu uma ação anti-hipernociceptiva extremamente significativa possivelmente pela modulação negativa de interações cerebrais, o que preveniu o fluxo de sinais nociceptivos aumentados para estruturas superiores do SNC, como o córtex e o tálamo (HESS *et al.*, 2011).

Ao nível celular, Szalay e colaboradores (2014) determinaram a prevalência dos principais subtipos de células T responsáveis pela regulação da resposta inflamatória na AR sob influência da terapia com inibidores de TNF- α . Apesar de algumas diferenças proporcionadas pelo tratamento, todos os agentes biológicos anti-TNF- α testados aumentaram a prevalência de células Treg. Também, a literatura claramente aponta que a redução terapêutica de TNF- α inibe diretamente a geração de células Th17 e conseqüentemente os níveis de IL-17 (YUE *et al.*, 2010; VAN DEN BERG & MIOSSEC, 2009). Em conjunto, tais dados permitem sugerir que o deslocamento do equilíbrio dinâmico de células pró-inflamatórias para o perfil de células anti-inflamatórias é crucial para a tentativa de reestabelecer a homeostasia do sistema imune e colaborar para a melhora do paciente com AR (SZALAY *et al.*, 2014). Em virtude destas informações, futuramente nós determinaremos a influência do tratamento com as substâncias-teste deste trabalho sobre a quantidade de células Treg na articulação.

Apesar de os fármacos biotecnológicos aprovados para o tratamento da AR proporcionarem os efeitos benéficos supracitados, melhorarem rapidamente os sinais e sintomas desta doença por retardarem as lesões ósseas e cartilaginosa e reduzirem a sua evolução, estes medicamentos causam reações indesejáveis no local da administração e devem ser utilizados de modo criterioso porque aumentam consideravelmente o risco de infecções oportunistas, como pneumonia e tuberculose. Portanto, os referidos biofármacos não devem ser associados entre si (AGARWAL, 2011).

Enquanto os fármacos biotecnológicos são de alto peso molecular e regulam sinalizações intercelulares pelas interações com moléculas de superfície ou proteínas secretadas, as substâncias de baixo peso molecular administradas por via oral que sejam capazes de atuar seletivamente em um alvo essencial para o desenvolvimento e a manutenção da AR são pensadas e buscadas incessantemente porque poderiam

regular direta e efetivamente múltiplas vias de sinalizações intracelulares relevantes para a síntese do TNF- α e para ocorrência da doença em questão (TANAKA & YAMAOKA, 2013).

2. JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Como uma doença crônica e debilitante, as consequências da AR estão intensamente relacionadas com problemas socioeconômicos graves em diferentes níveis. Dentre eles, podemos mencionar que os custos intangíveis são impulsionados principalmente por três aspectos: o primeiro é a perda da qualidade de vida, caracterizada pela maior ocorrência de depressão, insônia e ansiedade, além da própria incapacidade física e a dor, o outro é marcado pelas comorbidades associadas à doença, como o câncer, osteoporose, riscos aumentados de fraturas e eventos cardiovasculares (vasculite, hipertensão, miocardite, pericardite e infarto agudo do miocárdio) e finalmente a morte precoce dos indivíduos (Tabela 1) (UHLIG *et al.*, 2014; RUSSEL *et al.*, 2011; KARSDAL *et al.*, 2011; van ZONNEVELD *et al.*, 2012). A ocorrência destas manifestações sistêmicas extra-articulares é o principal preditor para a redução da expectativa de vida destas pessoas (MIELANTS & DEN BOSCH, 2009).

Ainda, a AR proporciona um ônus econômico bastante significativo. Segundo um estudo prospectivo realizado em 2011, até 40% dos pacientes acometidos por esta doença autoimune são incapazes de trabalhar em 5 ou 10 anos após o diagnóstico da doença e cerca de 30% ficam incapacitados permanentemente (Tabela 1) (JACOB *et al.*, 2011; OMS, 2004). Estes indivíduos geram uma perda de produtividade significativa para o país equivalente a 32% dos custos relacionados a AR. Vale destacar que, como outras doenças crônicas progressivas, os custos da AR aumentam conforme a gravidade da doença, particularmente em virtude da incapacidade funcional (LUNDKVIST *et al.*, 2008). Como resultado, muitos se tornam dependentes do Estado para os serviços de saúde e suporte social (MODY & CARDIEL, 2008).

Tabela 1: Características socioeconômicas associadas com a AR.

Incidência: 1% da população mundial
Anualmente: 20- 50 novos casos/100.000 habitantes
Ápice de incidência aos 70 anos do indivíduo
Multifatorial: Fatores de risco hereditários e ambientais
Até 40% dos pacientes incapacitados para trabalhar
Cerca de 30% incapacitados permanentemente
Menor qualidade de vida
Redução da expectativa de vida

De acordo com Lundkvist e colaboradores (2008), os custos totais provocados por esta doença na Europa foram estimados em € 42 bilhões no ano de 2006. Para exemplificar, um estudo realizado na Suíça mostrou que o custo anual com pacientes diagnosticado com AR é cerca de duas a três vezes maior comparado com indivíduos saudáveis e este valor pode ser superior a € 23.000,00, semelhante aos EUA (ERIKSSON et al., 2013).

No Brasil, os gastos anuais diretos com o tratamento da AR atingem aproximadamente US\$ 3.153,00 por paciente (valor projetado/corrigido para o câmbio atual), onde não estão incluídos os fármacos biotecnológicos (CHERMONT *et al.*, 2008- US\$ 1,00= R\$ 2,66). De acordo com o relatório de estatística de compras de medicamentos de 2009 provenientes do Ministério da Saúde, o governo federal gastou em torno de R\$ 30 bilhões com a compra de somente dois dos principais fármacos desta classe que podem ser indicados para o tratamento da AR.

Segundo levantamento bibliográfico, além do custo elevado, o tratamento com fármacos biotecnológicos também é caracterizado pela administração exclusiva por vias parenterais e por apresentar uma taxa de ineficácia em cerca de 30% dos indivíduos submetidos a esta terapia (HANDA & SHANKAR, 2004). A causa fundamental para a ocorrência desta desvantagem pode ser explicada pela geração de anticorpos contra o fármaco biológico, mas não por falhas relacionadas ao alvo terapêutico em si (VINCENT *et al.*, 2013).

2.1 DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS INDÓLICOS

Esta série foi desenvolvida a partir da inserção de dois grupamentos metileno (*bis*-homologação) entre as subunidades indólica e a *N*-acilidrazona (NAH), tendo como protótipo o LASSBio-651. Este composto apresentou perfil antinociceptivo destacável e capacidade de reduzir a produção de PGE₂ em aproximadamente 65% no modelo de *air pouch* e diminuiu TXB₂ em 99,5% a 100 μM no ensaio realizado em plaquetas estimuladas com colágeno (Resultados não-publicados).

Dentro de uma série de derivados NAH indólicos *bis*-homologados, LASSBio-1247 e LASSBio1248 (Figura 12) se destacaram por serem seguros quanto à toxicidade gástrica em experimento de administração única, além de apresentarem efeitos pronunciados nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético apresentando dose eficaz para 50% do efeito máximo (DE₅₀) equivalente a 6,6 e 7,7 μmol/kg, respectivamente. Ademais, LASSBio-1247 e o LASSBio-1248 administrados na dose de 100 μmol/kg apresentaram atividade anti-hipernociceptiva semelhante ao protótipo LASSBio-651 e a indometacina no modelo hipernocicepção térmica induzida por carragenina e também reduziram significativamente a migração de neutrófilos no mesmo modelo inflamatório. Por fim, na concentração de 100 μM, ambos diminuíram significativamente a produção de TNF-α proveniente de macrófagos estimulados por LPS (SANTOS, 2009).

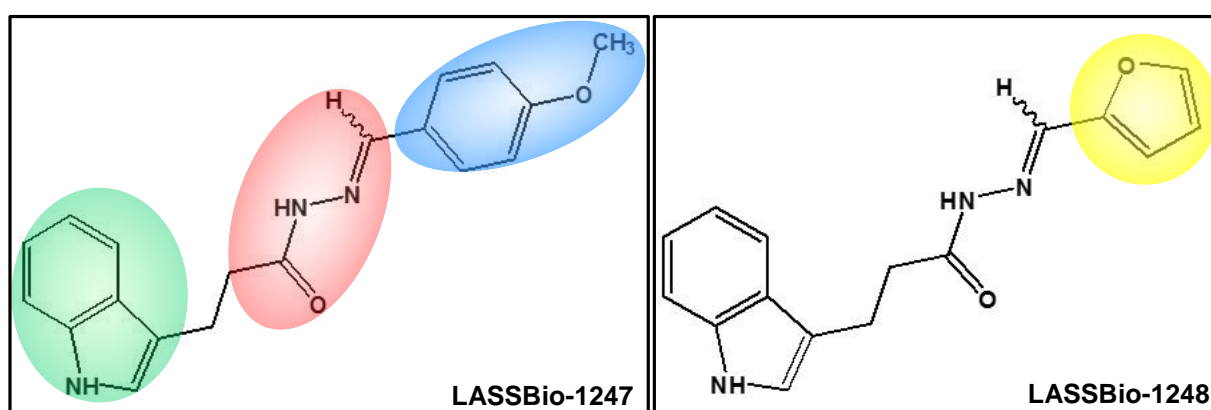


Figura 12: Estrutura dos derivados *N*-acilidrazônicos indólicos LASSBio-1247 e LASSBio-1248 (Grupamento indólico- verde; grupamento NAH- vermelho; grupamento *p*-metoxifenila- azul; grupamento 2-furila- amarelo).

Portanto, diante da redução da qualidade de vida, dos consideráveis ônus econômico propiciado pela AR e dos efeitos colaterais extremamente danosos dos medicamentos indicados aos pacientes, associados a protótipos anti-inflamatórios e anti-hipernociceptivos administrados por via oral que reduzem a produção de TNF- α , há a oportunidade do desenvolvimento de novos fármacos que possam contribuir primeiramente para a redução da dor, bem como melhorar a qualidade de vida dos pacientes e os impactos sociais e econômicos proporcionado pela AR.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

A triagem farmacológica dos compostos NAH indólicos *bis*-homologados mostrou que LASSBio-1247 e LASSBio-1248 são os mais promissores da série em virtude da ausência de ulcerações gástricas e fundamentalmente pela atividade inibitória sobre a hipernocicepção e a migração de neutrófilos *in vivo* no modelo inflamatório induzido por carragenina, bem como pela redução pronunciada da produção de TNF- α proveniente de macrófagos estimulados por LPS (SANTOS, 2009).

Com isto, o objetivo principal deste trabalho consiste em buscar protótipos candidatos a fármaco para o tratamento da AR a partir da investigação dos mecanismos de ação das atividades anti-inflamatória e analgésica dos derivados *N*-acilidrazônicos indólicos LASSBio-1247 e LASSBio-1248.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dentre os objetivos específicos pretende-se:

- Determinar a potência inibitória dos derivados sobre a produção de TNF- α *in vitro*;
- Verificar se os derivados NAH indólicos alteram a viabilidade celular;
- Avaliar se as substâncias-teste apresentam atividade anti-hipernociceptiva em modelos experimentais cuja resposta álgica seja mediada por citocinas e vias de sinalização envolvidas com a fisiopatologia da AR;
- Aferir se os efeitos antinociceptivos de LASSBio-1247 e LASSBio-1248 podem ocorrer em componentes neurogênicos e inflamatórios, bem como avaliar a participação de alvos importantes associados à dor inflamatória: receptores canabinoides;
- Determinar o potencial antiquimiotático dos derivados NAH indólicos;
- Determinar não só o efeito anti-hipernociceptivo de LASSBio-1247 e LASSBio-1248 em um modelo de AIA, mas também estudar seus papéis sobre a quantidade de leucócitos totais e de mediadores inflamatórios que são relevantes na ocorrência da hipernocicepção do experimento em questão;

- Observar se o tratamento contínuo com LASSBio-1247 ou LASSBio-1248 é capaz de provocar irritabilidade gástrica;
- Investigar se LASSBio-1247 pode atuar na cascata do AA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Agregômetro	Chronolog
Fluxo de ar	Filtracom
Membrana de nitrocelulose.....	BIO-RAD
Membrana policarbonato (migração)	Neuroprobe
Placas de cultura de células	TPP
Placa quente	Socrel
Placa para dosagem de TNF- α	NUNc
Von Frey eletrônico.....	INSIGHT

4.1.1 Animais

Camundongos *swiss* e *balb-C* (18- 30 g) e ratos *wistar* (150- 200 g) utilizados neste trabalho foram provenientes do biotério da Faculdade de Farmácia, localizado no Centro de Ciências e Saúde (CCS) na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da FIOCRUZ. Todos os animais foram criados com livre acesso a água e comida, em condições de temperatura ambiente variando de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, com ciclo de claro e escuro de 12 horas. Antes do início de cada experimento, os animais foram submetidos ao jejum de 8 h para a administração por v.o das substâncias, exceto nos dias de tratamento contínuo exigido pelo modelo de AIA.

Todos os experimentos obedeceram aos princípios éticos da manipulação animal conforme as normas e princípios do uso de animais de experimentação em pesquisa e foram aprovados pelo Comitê de Ética para utilização de animais de experimentação da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEUA-UFRJ), sob o registro FARMÁCIA02.

4.1.2 Reagentes

2-mercaptoetanol.....	BIO-RAD
3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-brometo de difeniltetrazólico (MTT)	SIGMA
Ácido clorídrico	GRUPO QUÍMICA
Adjuvante completo de Freund (CFA)	SIGMA
Albumina sérica bovina (BSA)	SIGMA
Albumina sérica bovina metilada (mBSA)	SIGMA

AM281	TOCRIS
AM630	TOCRIS
Azul de Evans.....	VETEC
Capsaicina	SIGMA
Cloreto de sódio.....	REAGEN
Cloreto de potássio	REAGEN
Dimetilsulfóxido (DMSO)	SIGMA
EDTA	SIGMA
FLIPR 5.....	MOLECULAR DEVICE
Formaldeído.....	REAGEN
Fosfato de potássio monobásico	REAGEN
Fosfato de potássio bibásico	GRUPO QUÍMICA
Goma arábica	SIGMA
Hanks.....	SIGMA
Indometacina	SIGMA
LASSBio-1247	LASSBio
LASSBio-1248	LASSBio
LPS.....	SIGMA
Metanol.....	TEDIA
n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP)	SIGMA
Percoll.....	SIGMA
RPMI.....	SIGMA
Solução sulfato de Cobre II.....	SIGMA
Solução de ácido bicinconínico (BCA)	SIGMA
Soro fetal bovino inativado.....	GIBCO
SB203580	TOCRIS
Talidomida	SIGMA
Tioglicolato de sódio	SIGMA
TMB	BD Biosciences
Triton.....	SIGMA
Tween 20	J.T.Baker
Win55.212-2	TOCRIS

4.1.3 Soluções

4.1.3.1 Solução Salina 0,9%

NaCl	0,9 g
Água destilada	q.s.p. 100 mL

4.1.3.2 Solução de Goma Arábica 5%

Goma arábica	5 g
Água destilada	q.s.p. 100 mL

4.1.3.3 Solução PBS

Fosfato de sódio monobásico	0,83 g
Fosfato de sódio bibásico	1,8 g
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Água milli-Q	q.s.p. 1,0 L

O pH da solução deve ser ajustado para 7,4.

4.1.3.4 Solução de formalina 2,5%

Formaldeído 37%	2,5 mL
Solução salina 0,9%	q.s.p 100 mL

4.1.3.5 Solução de dosagem de proteína

BCA	50 partes
Solução de sulfato de Cobre II	1 parte

4.1.3.6 Solução de capsaicina

Capsaicina	16 µg
Salina	100 µL

4.1.3.7 Solução de azul de Evans

Azul de Evans	1 g
Água destilada	q.s.p 100 mL

4.2 DOSAGEM DE TNF- α EM CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS ESTIMULADOS POR LPS (Adaptado de: POSADAS *et al.*, 2004)

Inicialmente, 1 mL de solução de tioglicolato de Na 3% foi administrada por via intraperitoneal (I.P) em camundongos balb-c. Depois de 3 dias, os macrófagos foram coletados por lavagem do peritônio com 5 mL de RPMI estéril, para posterior contagem em câmara de Neubauer e ajuste da concentração celular para 100.000 células/mL. Em seguida, 300 μ L desta suspensão de células foram semeados em placa de 96 poços e incubados por 1 h em estufa de CO₂ (5% CO₂, temperatura 37°C, umidade 80- 90%) para permitir a adesão dos macrófagos à superfície dos poços. Após este período, os poços foram lavados por 2 vezes com PBS para a retirada das células que não aderiram. Em seguida, 300 μ L de RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, estreptomicina e penicilina (50 U/mL) foram adicionados aos poços onde o DMSO ou as substâncias-teste foram incubadas por 1 h antes do estímulo com LPS por 24 h.

Após este tempo de estímulo, o sobrenadante foi coletado e o TNF- α dosado por ensaio imunoenzimático de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.1 Determinação da potência inibitória (CI₅₀) sobre a produção da citocina TNF- α

A potência inibitória dos derivados NAH indólicos LASSBio-1247 e LASSBio-1248 sobre a produção de TNF- α foi determinada a partir da utilização de concentrações diferentes dos derivados que variaram de 0,1-300 μ M em cultura de macrófagos estimulados por LPS.

As curvas logarítmicas das respostas em função das concentrações foram realizadas através de regressão não-linear com inclinação variável no programa *GraphPad Prism v. 5.0*[®].

4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR (Adaptado de MOSMANN *et al.*, 1983)

A viabilidade celular é um ensaio colorimétrico avaliado com base na capacidade das desidrogenases mitocondriais de células vivas clivarem o anel tetrazólico do MTT (3,-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólico), reduzindo-o em cristais violetas de formazam que são insolúveis em meio aquoso. A

formação deste produto é proporcional às mitocôndrias funcionais na célula (EIDI *et al.*, 2010).

Inicialmente, 1 mL de solução de tioglicolato de Na 3% foi administrada por via intraperitoneal (I.P) em camundongos balb-c. Depois de 3 dias, os macrófagos foram coletados por lavagem do peritônio com 5 mL de RPMI estéril, para posterior contagem em câmara de Neubauer e ajuste da concentração celular para 300.000 células/mL. Uma alíquota de 300 µL desta suspensão de células é plaqueada por 1 h em estufa de CO₂ (5% CO₂; 37°C; umidade 80-90%) em placa de 96 poços para permitir a adesão dos macrófagos à superfície dos poços. Após este período, os poços foram lavados por 2 vezes com PBS para a retirada das células que não aderiram. Em seguida, 300 µL de RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, estreptomicina e penicilina (50 U/mL) foram adicionados aos poços onde o DMSO ou as substâncias-teste foram incubadas. Após 18 h, adicionou-se 20 µL de solução de MTT à cultura de macrófagos seguida pela incubação por mais 4 h a 37°C. Ao final deste tempo, foram adicionados 200 µL de DMSO para a solubilização dos cristais de formazan precipitados.

A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplaca a 490 nm.

4.4 ENSAIO DE HIPERNOCICEPÇÃO TÉRMICA INDUZIDA POR LPS OU CAPSAICINA (VAJJA *et al.*, 2004; MIZUSHIMA *et al.*, 2005)

Estes ensaios farmacológicos consistem em verificar a atividade anti-hipernociceptiva dos compostos NAH indólicos a partir da latência de resposta da retirada de pata que é obtida pela diferença entre as respostas aferidas no tempo 0 h (administração de LPS ou capsaicina) com as respostas de cada tempo seguinte. Os resultados foram expressos em variação (Δ) de latência da resposta hipernociceptiva em segundos.

Ratos *Wistar* são colocados individualmente em uma placa quente com a temperatura ajustada a $52 \pm 0,1^\circ\text{C}$. A primeira leitura é aferida 30 min antes da administração do composto para que haja a adaptação do animal ao estímulo térmico (esta etapa não está incluída nas figuras 13 e 14). A segunda leitura é realizada antes da administração por via oral da substância. Uma hora depois (denominada como leitura de tempo 0 h), o agente flogístico LPS é administrado pela via intraplantar e a resposta hipernociceptiva é avaliada 1, 2 e 3 h após esta etapa (Figura 13).

A diferença para o modelo de hipernocicepção induzida por capsaicina comparado com a indução por LPS é que as leituras são realizadas nos tempos de 2, 5, 10, 30 e 60 min após a administração intraplantar da capsaicina (Figura 14). Ainda, os resultados são expressos em variação do tempo de latência (variação do tempo de latência= tempo 0h- tempos posteriores a administração).

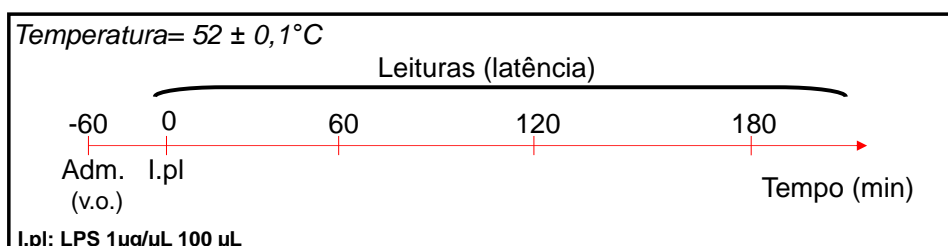


Figura 13: Esquema representativo do ensaio de hipernocicepção térmica induzida por LPS.

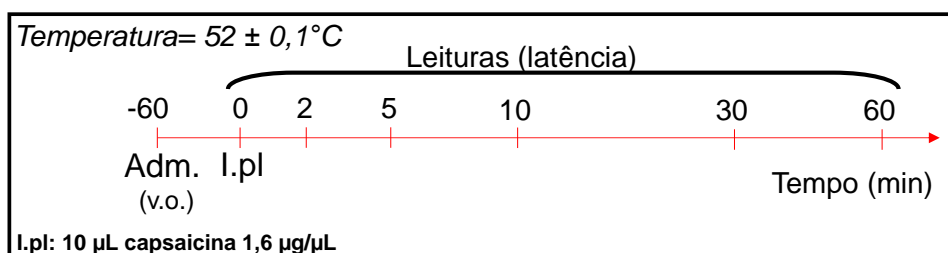


Figura 14: Esquema representativo do ensaio de hipernocicepção térmica induzida por capsaicina.

Vale ressaltar que a administração das substâncias LASSBio, do SB203580 e da talidomida foi realizada por v.o na dose de $100\mu\text{mol}/\text{kg}$ em uma suspensão de goma arábica 5%. Esta dose é amplamente adotada pelo grupo para os experimentos de triagem farmacológica.

4.5 INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRPV1: ESTUDOS DE IMAGEAMENTO DE CÁLCIO EM CÉLULAS HEK-293.

Foram utilizadas células HEK-293 expressando o receptor TRPV1 humano. Estas células foram lavadas com DMEM e centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min (procedimento realizado duas vezes). Após esta etapa, as células foram ressuspensas em DMEM, adicionadas a placas de 384 poços na concentração de 20.000 células/poço e incubadas para adesão à superfície da placa por 24 h.

Para os estudos de imageamento de cálcio, as células foram incubadas por 1 h com 20 μL do corante FLIPR 5. Após este período, elas foram submetidas ao imageamento de cálcio utilizando o equipamento para leitura de fluorescência *Hamamatsu Functional Drug Screening 700* (HAMAMATSU). Depois desta etapa, as células foram incubadas com o veículo (HBSS), as substâncias-teste ou o antagonista (AMG9810) na concentração de 10 μM por 10 min, foi estabelecida a linha de base no primeiro minuto e então se adicionou o agonista do receptor TRPV1, a capsaicina (300 nM). A leitura da fluorescência referente ao influxo de Ca^{+2} foi obtida por excitação dual a 340 nm e 380 nm e a detecção da emissão a 510 nm por 5 min.

4.6 MODELO DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 2,5%

Este ensaio farmacológico é caracterizado pela manifestação de uma fase neurogênica e a outra inflamatória. O modelo foi realizado com o intuito de avaliar a atividade antinociceptiva dos derivados frente a um estímulo químico cuja resposta inflamatória é mediada por aminas, prostaglandinas e TNF- α (SHIBATA *et al.*, 1989; YASHPAL & CODERRE, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2000).

Neste experimento, camundongos *swiss* foram colocados em um recipiente de vidro situado acima de um espelho para que o reflexo nociceptivo provocado pelo estímulo químico inflamatório fosse visualizado adequadamente.

Inicialmente, os camundongos foram tratados com as substâncias-teste por v.o na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ em uma suspensão de goma arábica a 5%. Uma hora depois, 20 μL de formalina a 2,5% foi administrada pela via intraplantar na pata traseira direita do animal, que imediatamente foi colocado no recipiente de vidro para que o reflexo nociceptivo fosse contabilizado (Figura 15).

Durante os cinco primeiros minutos, o tempo total em que o camundongo lambeu a pata foi cronometrado para analisar um possível efeito antinociceptivo neurogênico dos compostos testados. Após 10 min do final desta primeira fase, o comportamento dos animais é observado por mais 15 min para que o efeito antinociceptivo na fase inflamatória do modelo fosse quantificado (Figura 15).

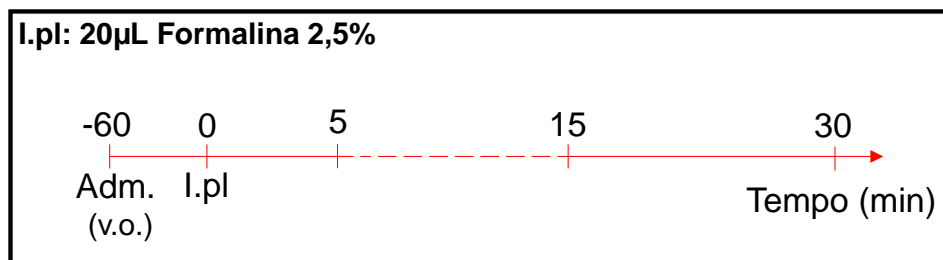


Figura 15: Esquema representativo do ensaio de nociceção induzida por formalina 2,5%.

Vale ressaltar que somente a lambida da pata afetada foi considerada como resposta nociceptiva e os resultados são expressos em tempo de lambida em segundos.

4.6.1 Modelo de nociceção induzida por formalina 2,5%: uso de antagonistas canabinoides

Este mesmo modelo adicionado a conhecidas ferramentas farmacológicas foi utilizado para avaliar uma possível participação dos receptores canabinoides na atividade antinociceptiva dos derivados NAH indólicos.

A validação do referido estudo funcional consistiu na administração pela via intraperitoneal dos antagonistas CB1 (AM281) na dose de 0,9 µmol/kg ou CB2 (AM630) na dose de 1,9 µmol/kg 45 min antes da administração intraplantar da formalina a 2,5% (Figura 16). Já o agonista canabinoide não-seletivo para os dois subtipos de receptores canabinoides (Win55.212-2) também foi administrado pela via intraperitoneal na dose equivalente a 5,7 µmol/kg 30 min antes da formalina (Figura 16) (MALAN *et al.*, 2001; HAN *et al.*, 2013). Vale ressaltar que o Win55.212-2 foi utilizado somente para a validação do experimento, ou seja, quando não houve a administração dos derivados NAH indólicos.

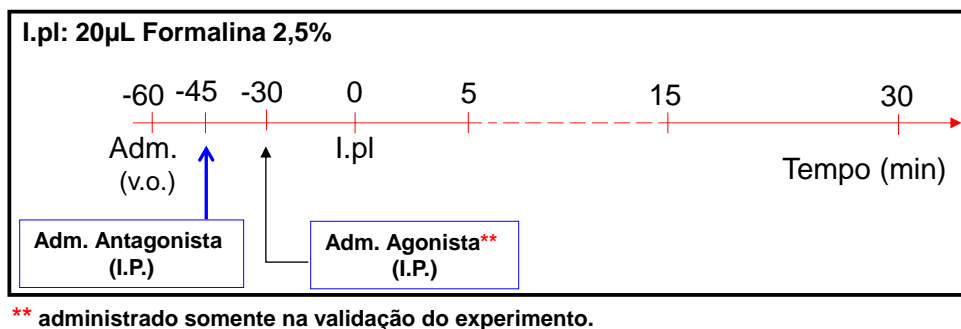


Figura 16: Esquema representativo do ensaio de nociceção induzida por formalina 2,5%: avaliação do sistema canabinoide.

Os derivados LASSBio-1247 e LASSBio-1248 foram administrados por v.o. a 100 µmol/kg e 15 min depois, os animais foram tratados com um dos antagonistas descritos previamente. A formalina foi injetada 60 min ao término da gavagem dos animais com os derivados NAH indólicos (Figura 16). A análise da resposta foi realizada do modo descrito na seção anterior (4.6).

4.7 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL (COTA *et al.*, 2010)

A termorregulação do corpo de mamíferos é estritamente controlada por estruturas hipotalâmicas (BAINHA *et al.*, 2015). Notoriamente, trabalhos científicos recentes apontam que há alteração na regulação da temperatura corporal a partir da administração de antagonistas TRPV1 ou de agonistas CB1, causando hipertermia e hipotermia, respectivamente (ROWBOTHAM *et al.*, 2011; GAVVA *et al.*, 2008; RAWLS *et al.*, 2002).

Neste contexto, camundongos *Swiss* de ambos os sexos foram utilizados para o teste da temperatura corporal. Assim, a primeira avaliação foi realizada para a observação da temperatura corporal inicial dos animais. Trinta minutos depois, a leitura denominada tempo 0 min foi aferida e em seguida houve a administração de goma arábica 5% ou os derivados NAH indólicos a 100 µmol/kg pela v.o. As etapas seguintes consistiram na verificação da temperatura corporal dos camundongos nos tempos de 30, 60, 90, 120, 180 e 240 min, tendo como referência o tempo 0 min.

Vale ressaltar que os resultados do experimento foram obtidos através do uso de um termômetro retal digital inserido a uma profundidade constante de 1,5 cm com auxílio de vaselina líquida. Os resultados são expressos em variação da temperatura corporal em grau Celsius (°C).

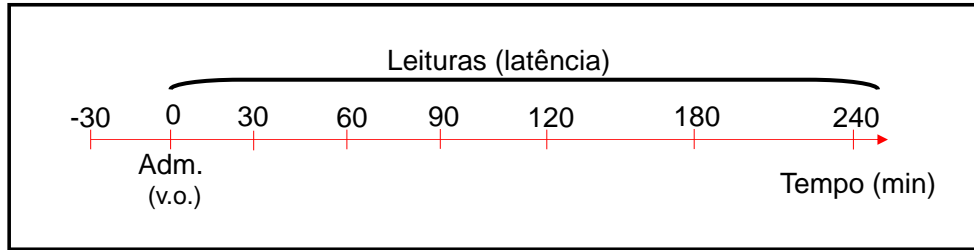


Figura 17: Esquema representativo da avaliação da temperatura corporal de camundongos.

4.8 ENSAIO DE HIPERNOCICEPÇÃO MECÂNICA INDUZIDO POR BSAm (CUNHA *et al.*, 2008b)

Brevemente, camundongos *swiss* fêmeas foram imunizadas com a administração subcutânea na região dorsal de BSAm (500 µg/ 200 µL) emulsificado em CFA (1 mg/mL), sendo considerado o dia 1 do experimento. Sete dias após esta etapa, os mesmos animais receberam um reforço na imunização com a solução de mBSA em CFA. Vinte e um dias após o início do experimento (dia 1), 90 µg de BSAm em solução salina foram administrada na articulação da pata direita do animal em um volume igual a 10 µL (Figura 17). Uma hora depois, o estabelecimento da hipernocicepção foi aferida a partir do uso de um transdutor de força adaptado com uma ponteira de polipropileno de 0,5 mm², sendo seguida pela administração por via oral dos derivados NAH indólicos a 100 µmol/kg e da indometacina na dose de 8,4 µmol/kg (Figura 18). Em tempo, os animais do grupo *sham* foram submetidos ao mesmo protocolo. Contudo, as etapas de imunização foram realizadas com CFA sem mBSA.

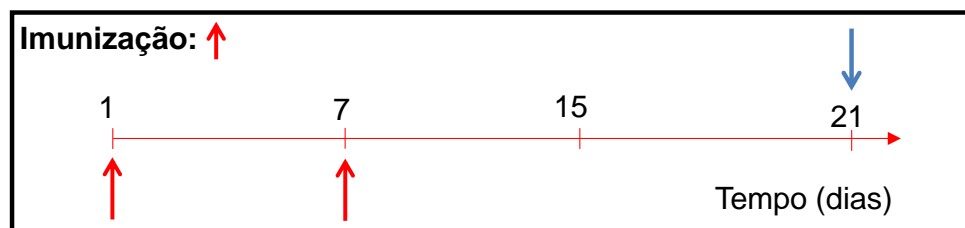


Figura 18: Esquema de imunização dos animais e indução de AIA (setas vermelhas indicam a administração da emulsão de CFA com BSAm (grupo *sham*: somente CFA) seta azul indica a administração intra-articular da solução de BSAm em salina).

Para a averiguação da redução da hipernocicepção, os camundongos foram colocados em uma caixa sobre uma superfície vazada 15 min antes de cada avaliação para que houvesse a adaptação ao ambiente. O teste consiste em aplicar uma força

gradual e crescente na base da pata traseira do murino, provocando uma flexão da articulação que, conseqüentemente, evoca o reflexo do animal de retirada de pata. Depois da manifestação deste fenômeno, a intensidade da força em gramas é obtida automaticamente pelo aparelho.

A resposta hipernociceptiva foi medida uma, duas, três, quatro, seis e vinte e quatro horas após a administração por via oral das substâncias. Durante esta etapa, os derivados foram novamente administrados por via oral na mesma dose citada anteriormente. Ainda, em virtude da característica crônica da dor e da inflamação manifestada na artrite, há a necessidade da aferição diária da resposta reflexa hipernociceptiva por um período total de 97 h (Figura 18).

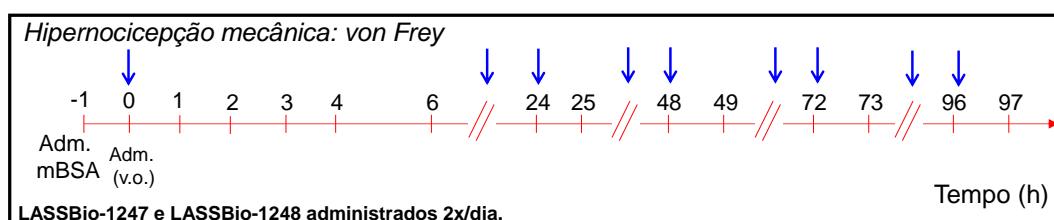


Figura 19: Utilização do von Frey eletrônico para a avaliação da resposta hipernociceptiva no modelo de AIA (a seta azul indica o momento de administração por via oral dos derivados NAH indólicos).

Após o quinto dia de experimento, a microscopia ótica foi utilizada para a contagem dos leucócitos totais proveniente do lavado articular de joelhos estimulados com BSA_m (aumento de 40 vezes). Ao final do experimento, a cavidade articular foi exposta e lavada com solução de PBS com EDTA 1mM para a obtenção do lavado articular.

Ainda, este material também foi utilizado como amostra para dosagem de TNF- α e PGE₂ por ensaio imunoenzimático.

4.9 POTENCIAL ULCEROGÊNICO

O potencial ulcerogênico foi avaliado através da dissecação dos estômagos dos camundongos utilizados no ensaio de artrite induzida por mBSA. Os estômagos foram abertos ao longo de sua curvatura maior. Logo depois, a mucosa gástrica foi lavada com solução fisiológica e examinada macroscopicamente para identificar lesões pontuais ou francas hemorragias.

4.10 SEPARAÇÃO DE NEUTRÓFILOS POLIMORFONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA DE RATOS POR GRADIENTE DE PERCOLL: MIGRAÇÃO CELULAR (FIERRO *et al.*, 2003)

O fêmur e a tíbia do rato *wistar* são retirados após a eutanásia do animal e, com o auxílio de uma seringa, os ossos são lavados com solução salina de Hank. Com uma pipeta do tipo Pasteur, o sedimento gerado foi homogeneizado para que as células fossem lavadas com Hanks 1X em centrifugação a 400 g por 8 min (20°C). Em seguida, as células foram ressuspensas em 2 mL de solução salina de Hank, acrescentadas sobre o gradiente de 65% (3 mL) e 72% (3 mL) de Percoll e posterior centrifugação do gradiente a 1200 g por 32 min na temperatura de 20°C. Vale ressaltar que os neutrófilos são encontrados entre as duas fases dos gradientes de concentração.

Em seguida, os neutrófilos são retirados e colocados em outro tubo para a primeira lavagem com solução de lise. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas mais uma vez com solução salina de Hank, sendo centrifugado novamente a 400 g por 8 min e 20°C. O sedimento de neutrófilos foi ressuspensão com RPMI para que a contagem das células na câmara de Neubauer fosse realizada e a concentração da suspensão ajustada para 1×10^6 neutrófilos/mL.

Uma pré-incubação da suspensão de neutrófilos deve ser realizada por 1 h com o SB203580 e os derivados NAH nas concentrações de 50 e 100 μ M, respectivamente. A parte inferior da câmara de Boyden é preenchida com solução do agente quimiotático n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) na concentração 10 nM e posteriormente a membrana de policarbonato com porosidade de 5 μ M é inserida na região intermediária da câmara seguida pela borracha de vedação.

Após o fechamento da câmara, os poços na parte superior são preenchidos com 50 μ L da suspensão de neutrófilos pré-incubados com as substâncias-teste e incubados por mais 1 h a 37°C. Finalmente, a membrana é lavada em solução de PBS e, depois desta etapa, os neutrófilos são corados e quantificados por microscopia ótica (aumento de 40 vezes).

4.11 DOSAGEM DE PROTEÍNAS (SMITH *et al.*, 1985)

A dosagem de proteínas totais foi realizada por um método colorimétrico de alta sensibilidade e baixa variabilidade com o intuito de relacionar a concentração de TNF- α proveniente de tecido e do soro plasmático com a quantidade de proteínas totais presente nas amostras.

Brevemente, este protocolo é baseado nos princípios da reação de biureto, onde há a formação da coloração violeta que é proporcionada pela redução do átomo de Cu^{+2} a Cu^{+1} promovida pela interação com ligações peptídicas de proteínas em um sistema alcalino. A teoria sugere que o ácido bicinconínico (BCA) é sensível, estável e altamente específico ao Cu^{+1} . Vale ressaltar que neste experimento, soluções aquosas de diferentes concentrações de albumina foram utilizadas para estabelecer a curva-padrão de proteínas.

Para a acurácia no processo de desenvolvimento de coloração da reação, 25 μL de amostra adicionados a 200 μL da solução de sulfato de cobre II em BCA (proporção 1:49) foram incubados à 37°C em 95% de umidade e após 15 min a concentração de proteínas foi determinada por espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados de densidade ótica das amostras foram interpolados com os valores de densidade ótica (D.O.) da curva-padrão de albumina.

4.12 OBTENÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) E DE PLASMA POBRE EM PLAQUETAS (PPP) (CAZENAVE *et al.*, 1979)

Inicialmente, o sangue foi obtido através de punção da artéria central da orelha de coelhas albinas pesando entre 2- 3 kg e condicionado em tubos contendo solução de citrato trissódico 3,8% na proporção de 9:1. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 500 g por 10 min em temperatura ambiente para a obtenção de PRP. Para a etapa posterior, houve a centrifugação do material sem o PRP a 2000 g também por 10 min a temperatura ambiente e, deste modo, o PPP é obtido.

Vale ressaltar que o PRP deve ser utilizado em um tempo máximo de 3 h, porque as plaquetas podem perder gradativamente sua capacidade de agregação em períodos de tempo superiores.

4.13 ENSAIO DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR AA (CUNHA *et al.*, 2003)

A conversão do AA intermediada pela COX-1 expressa constitutivamente na plaqueta permite a formação de TXA₂. O modelo em questão foi utilizado para observar o efeito de LASSBio-1247 sobre a agregação plaquetária monitorada pelo método turbidimétrico no agregômetro. Este ensaio permite inferir uma possível ação na cascata do AA.

Este aparelho registra a transmitância de luz pela suspensão de plaquetas, sendo a suspensão de PRP calibrado como referência de 0% de passagem de luz e o PPP equivalente a 100% (LACERDA, 2006). Quanto mais opaco é a suspensão menor será a transmitância de luz (CAZENAVE *et al.*, 1979).

Brevemente, 300 µL de PRP foi incubado à 37°C por 1 min em agitação contínua de 900 rpm. Posteriormente, o derivado LASSBio-1247, a indometacina ou o DMSO foram incubados por 5 min antes da adição do AA na concentração de 200 µM. A agregação foi avaliada até um dos eventos acontecer: tempo de 5 min após a adição do AA ou até o ponto máximo de agregação.

Ainda, os resultados são expressos em porcentagem de agregação plaquetária.

4.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

No presente trabalho, os resultados obtidos são expressos em média ± erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados por ANOVA *oneway* quando houve apenas uma variável para comparação ou *twoway* para aqueles com duas variações seguido pelo teste de Bonferroni e considerados estatisticamente significativo para * $p < 0,05$.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa *GraphPad Prism 5.0*[®].

5. RESULTADOS

5.1 DOSAGEM DA PRODUÇÃO DE TNF- α EM CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS ESTIMULADOS COM LPS

Segundo levantamento bibliográfico realizado por Kinne e colaboradores (2000), o TNF- α é uma potente citocina pró-inflamatória produzida em quantidade significativa por neutrófilos, macrófagos e células T.

Diante do papel relevante do TNF- α na gênese da AR, os derivados LASSBio-1247 e LASSBio-1248 foram avaliados no modelo *in vitro* de cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS para dosar a produção desta citocina.

Nas condições experimentais estabelecidas, o derivado LASSBio-1247 não reduziu a produção de TNF- α nas concentrações de 0,1 e 1 μ M. Entretanto, na concentração de 10 μ M, o efeito inibitório sobre a produção da referida citocina foi de aproximadamente 42%. Ainda, este mesmo derivado NAH indólico causou uma diminuição destacável na produção de TNF- α de 75 e 81% nas concentrações de 30 e 60 μ M, respectivamente. O efeito inibitório mais pronunciado ocorreu na concentração de 100 μ M, sendo equivalente a 95% quando comparado às células tratadas com o veículo DMSO. Este resultado foi cerca de 20% superior àquele apresentado pela talidomida testada à 300 μ M (Gráfico 1).

O modelo *in vitro* de dosagem de TNF- α de macrófagos mostrou que o derivado LASSBio-1248 não apresentou atividade inibitória relevante nas concentrações de 1 e 10 μ M. Ademais, à 30 μ M o composto reduziu a quantidade de TNF- α em 21%, mas tal efeito não foi estatisticamente significativo (Gráfico 2). Não obstante, o emprego de concentrações superiores revelou que LASSBio-1248 à 100 μ M diminuiu a produção de TNF- α em aproximadamente 86% enquanto que à 300 μ M, o derivado mantém o efeito inibitório na mesma magnitude que na concentração anterior (92%) (Gráfico 2).

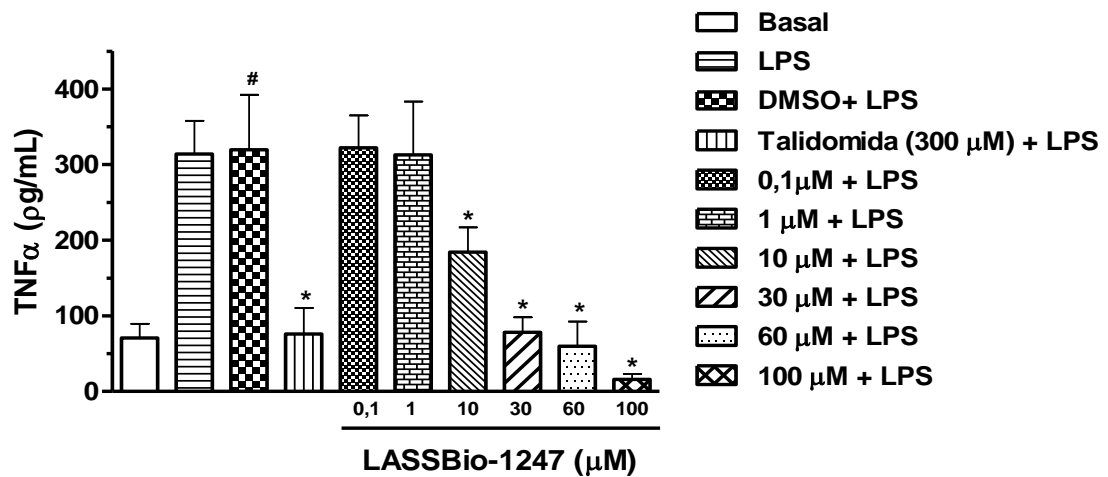


Gráfico 1: Efeito inibitório de LASSBio-1247 sobre a produção de TNF- α é dependente da concentração.

Os macrófagos foram obtidos após lavado peritoneal de camundongos balb-C estimulados com tioglicolato de Na 3% e plaqueadas em 300 μ L de RPMI na concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL (ajuste realizado por contagem em câmara de Neubauer). Depois de 1 h, os macrófagos foram incubados com DMSO, talidomida (300 μ M) ou LASSBio-1247 (1- 100 μ M) por 1 h. A etapa seguinte consistiu em estimular as células com LPS a 3 ng/mL por 24 h. Número de animais (n) = 2- 3; #p<0,05 em comparação ao basal e *p<0,05 em comparação ao grupo DMSO (ANOVA-Oneway). Os resultados são expressos pg/mL \pm EPM.

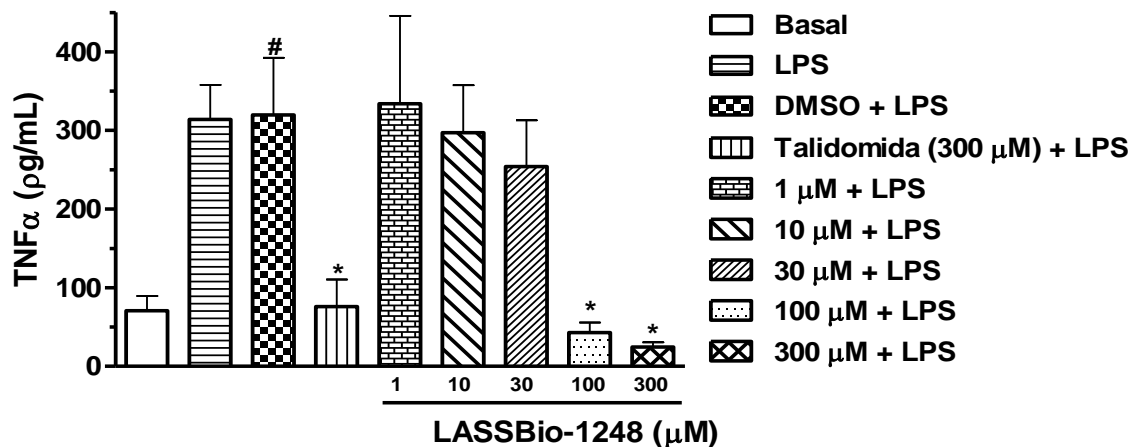


Gráfico 2: Efeito inibitório de LASSBio-1248 sobre a produção de TNF- α é dependente da concentração.

Os macrófagos foram obtidos após lavado peritoneal de camundongos balb-C estimulados com tioglicolato de Na 3% e plaqueadas em 300 μ L de RPMI na concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL (ajuste realizado por contagem em câmara de Neubauer). Depois de 1 h, os macrófagos foram incubados com DMSO, talidomida (300 μ M) ou LASSBio-1248 (1- 300 μ M) por 1 h. A etapa seguinte consistiu em estimular as células com LPS a 3 ng/mL por 24 h. Os resultados são expressos pg/mL \pm EPM, número de animais (n) = 3; #p<0,05 em comparação ao basal e *p<0,05 em comparação ao grupo DMSO (ANOVA-Oneway).

Neste contexto, as concentrações inibitórias para 50% do efeito máximo (CI_{50}) sobre a produção de $TNF-\alpha$ dos derivados LASSBio-1247 e LASSBio-1248 foram estabelecidas. Com isto, LASSBio-1247 apresentou uma CI_{50} de 12,9 μM (Tabela 2; Gráfico 3), enquanto LASSBio-1248 exibiu uma CI_{50} igual a 45 μM (Tabela 3; Gráfico 4).

Tabela 2: Efeito inibitório de LASSBio-1247 sobre a produção de $TNF-\alpha$ proveniente de macrófagos peritoneais estimulados por LPS.

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (μM)	n	$TNF-\alpha$ (pg/ml)	%INIBIÇÃO
LASSBio-1247	0,1	3	322,2 \pm 42,9	0
LASSBio-1247	1	3	312,8 \pm 70,8	0
LASSBio-1247	10	2	184,4 \pm 32,6	42,3
LASSBio-1247	30	2	78,1 \pm 20,1	75,6
LASSBio-1247	60	3	59,6 \pm 32,9	81,3
LASSBio-1247	100	3	16,0 \pm 7,1	95,0

Os resultados são expressos em média \pm erro padrão; n = animais/grupo.

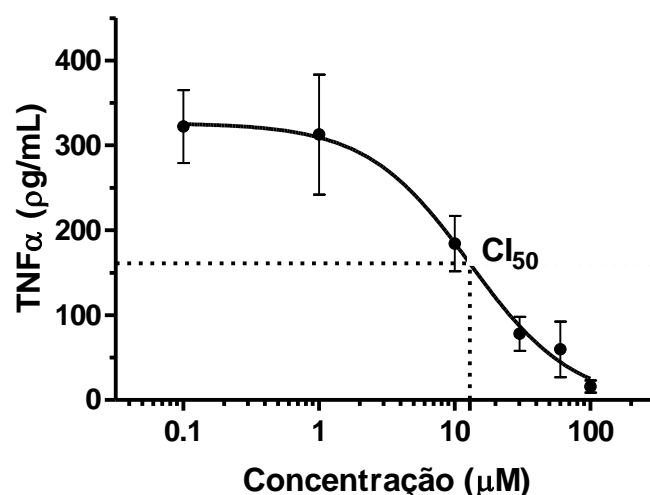


Gráfico 3: Curva concentração-resposta do derivado LASSBio-1247 no modelo de dosagem de $TNF-\alpha$ proveniente de macrófagos peritoneais estimulados por LPS.

Os macrófagos foram obtidos após lavado peritoneal de camundongos balb-C estimulados com tioglicolato de Na 3% e plaqueadas em 300 μL de RPMI na concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL (ajuste realizado por contagem em câmara de Neubauer). Depois de 1 h, os macrófagos foram incubados com LASSBio-1247 (0,1- 100 μM) por 1 h. A etapa seguinte consistiu em estimular as células com LPS a 3 ng/mL por 24 h. Os resultados são expressos pg/mL \pm EPM, número de animais (n) = 2- 3; # $p < 0,05$ em comparação ao basal e * $p < 0,05$ em comparação ao grupo DMSO (ANOVA-Oneway). Curva sigmoide com inclinação variável obtida por regressão não-linear ($R^2 = 0,8302$).

Tabela 3: Efeito inibitório de LASSBio-1248 sobre a produção de TNF- α proveniente de macrófagos peritoneais estimulados por LPS.

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (μ M)	n	TNF- α (pg/ml)	%INIBIÇÃO
LASSBio-1248	1	3	334,1 \pm 111,7	0
LASSBio-1248	10	3	297,2 \pm 60,3	7,1
LASSBio-1248	30	3	253,9 \pm 59,0	20,6
LASSBio-1248	100	3	42,8 \pm 12,8	86,6
LASSBio-1248	300	3	24,5 \pm 6,2	92,3

Os resultados são expressos em média \pm erro padrão; n = animais/grupo.

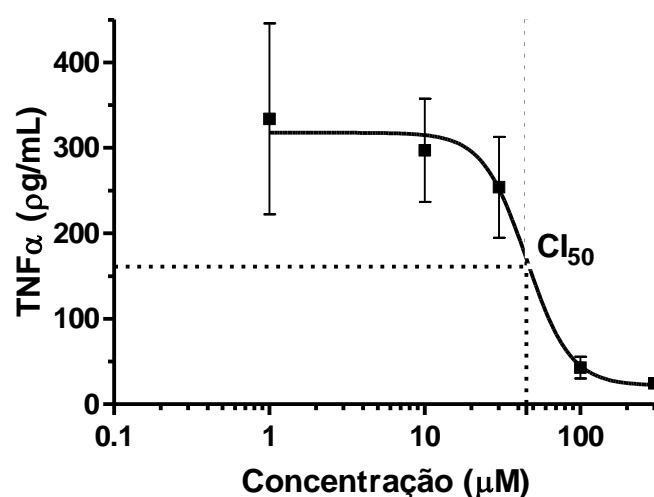


Gráfico 4: Curva concentração-resposta do derivado LASSBio-1248 no modelo de dosagem de TNF- α proveniente de macrófagos peritoneais estimulados por LPS.

Os macrófagos foram obtidos após lavado peritoneal de camundongos balb-C estimulados com tioglicolato de Na 3% e plaqueadas em 300 μ L de RPMI na concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL (ajuste realizado por contagem em câmara de Neubauer). Depois de 1 h, os macrófagos foram incubados com LASSBio-1248 (1- 300 μ M) por 1 h. A etapa seguinte consistiu em estimular as células com LPS a 3 ng/mL por 24 h. Os resultados são expressos pg/mL \pm EPM, número de animais (n) = 3; #p<0,05 em comparação ao basal e *p<0,05 em comparação ao grupo DMSO (ANOVA-Oneway). Curva sigmoide com inclinação variável obtida por regressão não-linear ($R^2 = 0,6784$).

5.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

O ensaio com MTT é amplamente aplicado para verificar a viabilidade celular. A ação de desidrogenases mitocondriais reduz o MTT, resultando na formação de cristais violetas de formazam (EIDI *et al.*, 2010).

O tratamento de macrófagos com o LASSBio-1247 mostrou que, nas concentrações de 30 e 60 μM , o derivado não alterou significativamente a viabilidade destas células comparadas com o grupo tratado com DMSO. Contudo, a concentração de 100 μM reduziu a viabilidade dos macrófagos para aproximadamente 70% (Gráfico 5). A talidomida avaliada a 300 μM não causou morte celular de modo estatisticamente significativo no referido modelo (Gráfico 5).

Já o derivado NAH indólico LASSBio-1248 não alterou a viabilidade das células em nenhuma das concentrações avaliadas, inclusive a 300 μM (Gráfico 5).

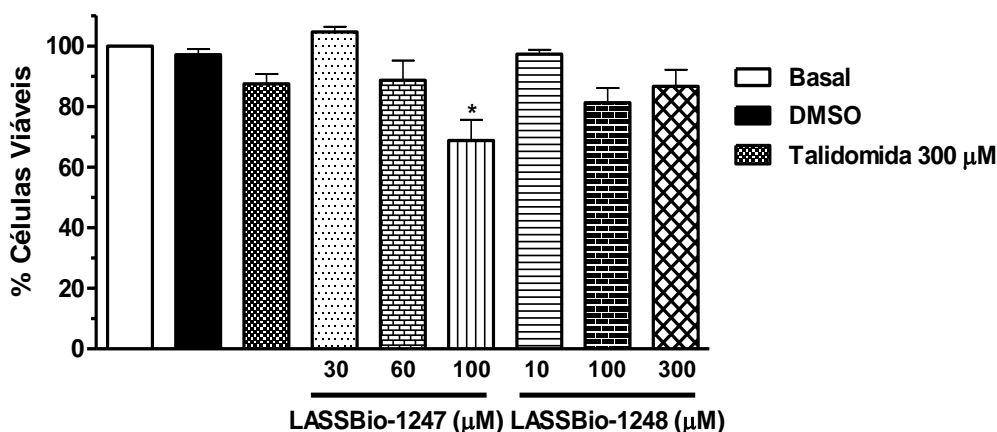


Gráfico 5: Efeito de LASSBio-1247, LASSBio-1248 e da talidomida sobre a viabilidade celular no ensaio de MTT.

Os macrófagos foram obtidos após lavado peritoneal de camundongos balb-C estimulados com tioglicolato de Na 3% e plaqueadas em 300 μL de RPMI na concentração de $3,0 \times 10^5$ células/mL (ajuste realizado por contagem em câmara de Neubauer). Depois de 1 h, os macrófagos foram incubados com DMSO (veículo das substâncias), talidomida (300 μM), LASSBio-1247 (30- 100 μM) ou LASSBio-1248 (10- 300 μM) por 18 h. A etapa seguinte consistiu em adicionar 20 μL de solução de MTT e 4 h depois foi acrescentado 200 μL de DMSO. Os resultados são expressos em porcentagem de células viáveis \pm EPM para número de animais (n) = 2- 4; * $p < 0,05$ em relação ao DMSO (ANOVA-Oneway).

5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERNOCICEPTIVO INDUZIDO POR LPS.

Segundo Vajja e colaboradores (2004), o fenômeno hipernociceptivo induzido por LPS é mediado, principalmente, por citocinas pró-inflamatórias: IL-1 β , IL-6 e o TNF- α , cujas participações são relevantes no desenvolvimento e na manutenção da AR.

Neste contexto, ambos os derivados NAH indólicos apresentaram efeitos pronunciados em todos os tempos estudados após a administração de LPS associada à temperatura. Inicialmente, LASSBio-1247 a 100 $\mu\text{mol/kg}$ reduziu a resposta hipernociceptiva em 54% comparado ao grupo tratado com o veículo (goma arábica 5%). Já nas avaliações durante a segunda e a terceira hora, este derivado continuou exibindo efeito importante de 57 e 53%, sendo da mesma magnitude da talidomida que também foi administrada a 100 $\mu\text{mol/kg}$ (Gráfico 6).

Já o derivado LASSBio-1248 na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ mostrou atividade anti-hipernociceptiva estatisticamente significativa de 42% na primeira hora após a administração intraplantar de LPS, semelhante ao efeito da talidomida. Ademais, LASSBio-1248 manteve o efeito anti-hipernociceptivo expressivo de aproximadamente 50% nos demais momentos observados (Gráfico 6).

Diante do exposto, o efeito anti-hipernociceptivo global que consiste no cálculo da área sob a curva (Sistema Internacional: *Area Under the Curve*- AUC) a partir das leituras da resposta hipernociceptiva foi obtido. Por ser uma avaliação total, este procedimento permite ratificar a relevância do efeito anti-hipernociceptivo das substâncias testadas. Deste modo, observamos que tanto LASSBio-1247 quanto LASSBio-1248 tiveram atividade destacável, sendo equivalente a 55 e 45%, respectivamente (Gráfico 7).

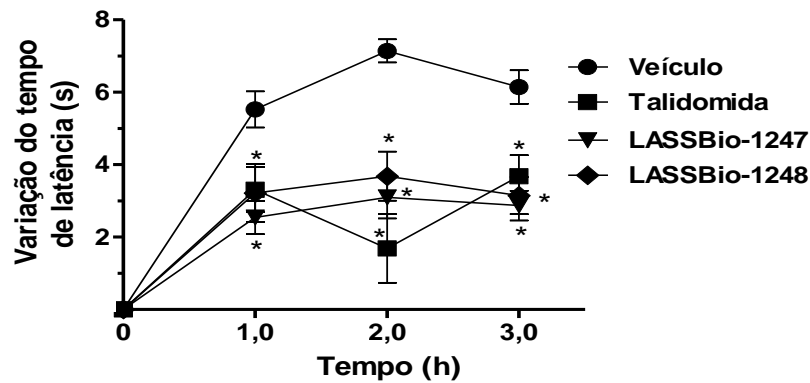


Gráfico 6: Efeito anti-hipernociceptivo de LASSBio-1247 e LASSBio-1248 no modelo de hipernocicepção térmica induzida por LPS.

A administração dos derivados NAH indólicos e da talidomida na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ por via oral aconteceu 1 h antes da administração intraplantar de 100 μL de LPS a 1mg/mL em ratos *wistar*. A resposta hipernociceptiva foi avaliada na temperatura de $52 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 3 h. Os resultados são expressos em variação do tempo de latência em segundos (s) \pm EPM; número de animais (n) = 6- 8 animais. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo-veículo (goma arábica 5%) (ANOVA- twoway, Bonferroni).

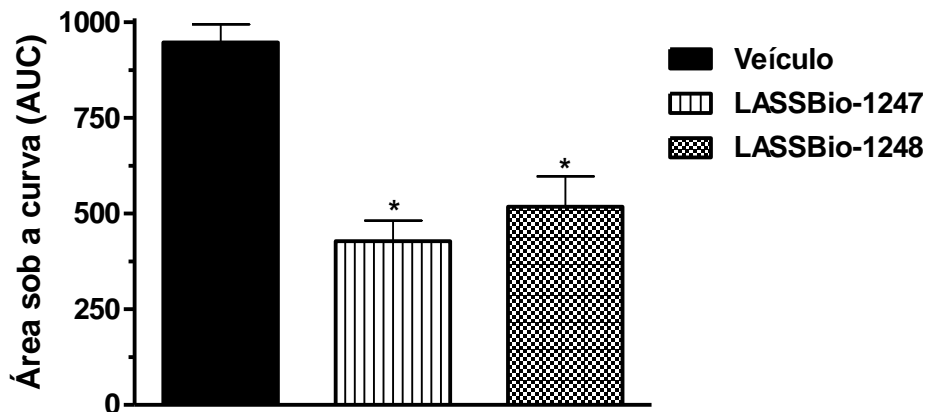


Gráfico 7: Efeito anti-hipernociceptivo global dos derivados NAH indólicos obtidos pelo cálculo da área sob a curva (AUC) no modelo de hipernocicepção térmica induzida por LPS.

A administração dos derivados NAH indólicos na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ por via oral aconteceu 1 h antes da administração intraplantar de 100 μL de LPS a 1mg/mL em ratos *wistar* e a resposta hipernociceptiva foi avaliada na temperatura de $52 \pm 1^\circ\text{C}$ por 3h. Número de animais (n) = 6- 8 animais; * $p < 0,05$ em comparação ao grupo-veículo (goma arábica 5%), ANOVA-oneway.

5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERNOCICEPTIVO EM MODELO INDUZIDO POR CAPSAICINA

O componente ativo vaniloide proveniente da pimenta (capsaicina) é conhecido pela sua capacidade de atuar como agonista em canais de cátion vaniloide de subtipo 1 que se comportam como receptores de potencial transitório e estão relacionados com alguns processos patológicos como a dor (MORAN *et al.*, 2011).

Mais ainda, estudos recentes indicam que a administração tópica de capsaicina provoca hipernocicepção mediada pelas fibras polimodais C, além de fosforilação da MAPK p38 na pata e no DRG de fibras aferentes de ratos de modo dependente do tempo (SWEITZER *et al.*, 2004; MIZUSHIMA *et al.*, 2005). Tal fato é relevante já que esta enzima está envolvida com a gênese de TNF- α .

Assim como nos modelos anti-hipernociceptivos avaliados anteriormente, o derivado LASSBio-1247 exibiu efeito inibitório pronunciado logo após 2 min da administração da capsaicina, sendo equivalente a 57%. Ainda, este derivado NAH indólico mostrou atividade anti-hipernociceptiva estatisticamente significativa nos tempos de 5 e 10 min de 60 e 90%, respectivamente (Gráfico 8).

Nesta avaliação, LASSBio-1248 também apresentou efeito semelhante ao SB203580, o inibidor da fosforilação da MAPK p38 (Gráfico 8). Dois minutos após a administração intraplantar de capsaicina, o derivado LASSBio-1248 aumentou o tempo de permanência do animal sobre a placa quente em 76% comparado ao grupo-controle. Já no tempo de 5 min, a atividade do protótipo foi de aproximadamente 80% e em 10 min a resposta hipernociceptiva foi revertida (Gráfico 8).

Vale ressaltar que a administração intraplantar da capsaicina provoca a dessensibilização dos canais TRPV1 e por isto, não há mais a manifestação do fenômeno hipernociceptivo nos tempos de 30 e 60 min do experimento (Gráfico 8).

O cálculo da ASC indicou que ambos os derivados NAH indólicos exibem perfil anti-hipernociceptivo global semelhantes e estatisticamente significativo comparado ao grupo-controle, sendo equivalente a 50% (Gráfico 9).

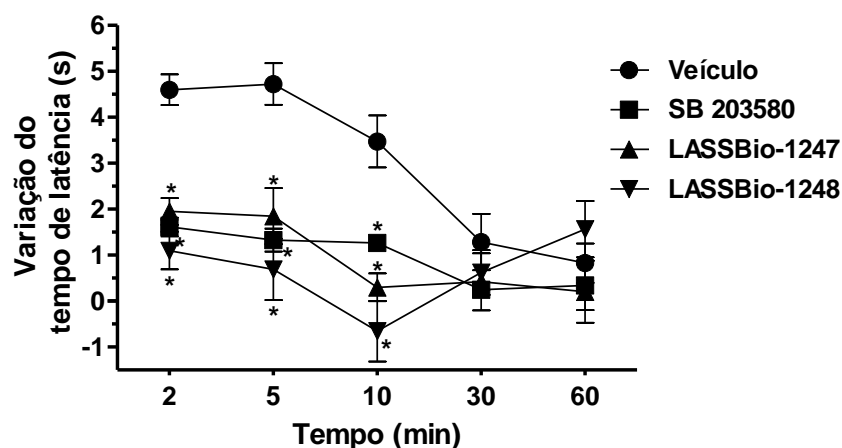


Gráfico 8: Efeito anti-hipernociceptivo dos derivados NAH indólicos LASSBio-1247 e LASSBio-1248 no modelo de hipernocicepção térmica induzida por capsaicina.

Os derivados NAH indólicos e o SB203580 foram administrados na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$, por via oral, 1 h antes da administração intraplantar de 10 μL de capsaicina a 1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em ratos *wistar*. A resposta hipernociceptiva foi avaliada na temperatura de $52 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 60 min. Os resultados são expressos em variação do tempo de latência em segundos (s) \pm EPM; número de animais (n) = 7- 12 animais. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo-veículo (goma arábica 5%), ANOVA- twoway, Bonferroni.

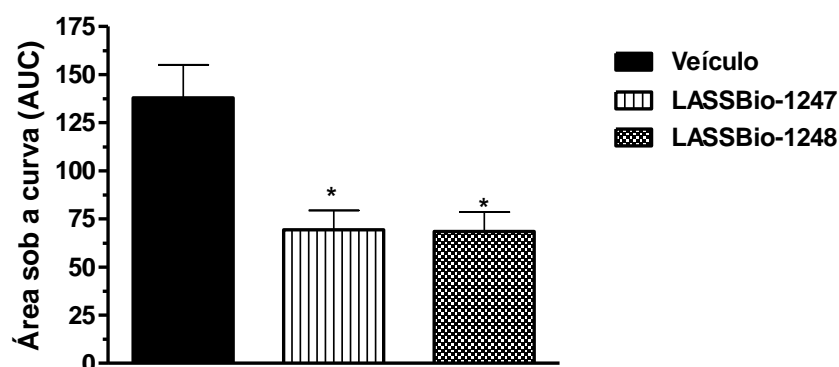


Gráfico 9: Efeito anti-hipernociceptivo global dos derivados NAH indólicos LASSBio-1247 e LASSBio-1248 obtido pelo cálculo da área sob a curva (AUC).

A administração dos derivados NAH indólicos na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ por via oral aconteceu 1 h antes da administração intraplantar de 10 μL de capsaicina a 1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em ratos *wistar*. A resposta hipernociceptiva foi avaliada na temperatura de $52 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 60 min. Número de animais (n) = 7- 12 animais; * $p < 0,05$ em comparação ao grupo-veículo (goma arábica 5%), ANOVA-oneway.

5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS NAH INDÓLICOS SOBRE O RECEPTOR TRPV1

Diante dos resultados anti-hipernociceptivos pronunciados de LASSBio-1247 e LASSBio-1248 no modelo de hipernocicepção térmica induzida por capsaicina, avaliamos a capacidade de os derivados inibirem o influxo de Ca^{+2} em células HEK-293 através dos canais TRPV1 humano (TRPV1h) expressos na célula em questão, empregando a técnica de imageamento de Ca^{+2} .

Neste contexto, o gráfico 10 mostra que houve um aumento significativo do influxo de Ca^{+2} quando as células HEK-293 foram estimuladas com o agonista do canal TRPV1, a capsaicina.

Ainda, o experimento de imageamento de Ca^{+2} revelou que tanto o LASSBio-1247 quanto o LASSBio-1248 nas concentrações de 10 μM não diminuíram o influxo de Ca^{+2} comparado com o grupo tratado com veículo (HBSS) e estimulado com a capsaicina, ao contrário das células tratadas com o antagonista TRPV1 AMG9810, cujo efeito de bloqueio foi estatisticamente significativo.

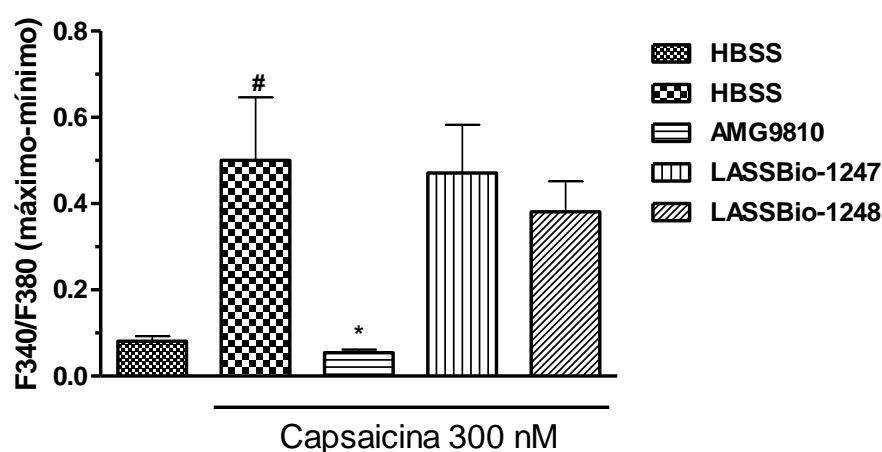


Gráfico 10: Os derivados NAH indólicos não alteram o influxo de Ca^{+2} em células HEK-293 que expressam o canal TRPV1 humano.

Derivados NAH indólicos e o AMG9810 foram adicionados separadamente à cultura de células na concentração de 10 μM e, 10 minutos depois, a capsaicina a 300 nM foi acrescentada ao sistema. n=3; #p<0,05 em comparação às células não-estimuladas com capsaicina; *p<0,05 em comparação às células estimuladas com capsaicina, ANOVA-oneway.

5.6 EFEITO ANTINOCICEPTIVO DOS DERIVADOS NAH INDÓLICOS NO MODELO DE NOCICEPÇÃO INDUZIDO POR FORMALINA 2,5%.

O modelo de nociceção induzida por formalina é caracterizado pela nociceção manifestada em duas fases: uma dita neurogênica e outra inflamatória. Segundo trabalhos publicados, esta fase é conduzida por diversos mediadores inflamatórios, como aminas vasoativas, prostaglandinas e TNF- α (YASHPAL & CODERRE, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2000).

O teste revelou que nenhum dos dois derivados NAH indólicos apresentou atividade antinociceptiva na primeira fase quando comparados ao grupo tratado com o veículo (goma arábica 5%) (Gráfico 11). Entretanto, a avaliação do efeito dos derivados na fase inflamatória indicou que LASSBio-1247 exibiu atividade antinociceptiva relevante equivalente a 60%, assim como o derivado LASSBio-1248 que propiciou ao grupo tratado com a referida substância uma sensação nociceptiva 57% menor que o grupo-controle (Gráfico 11).

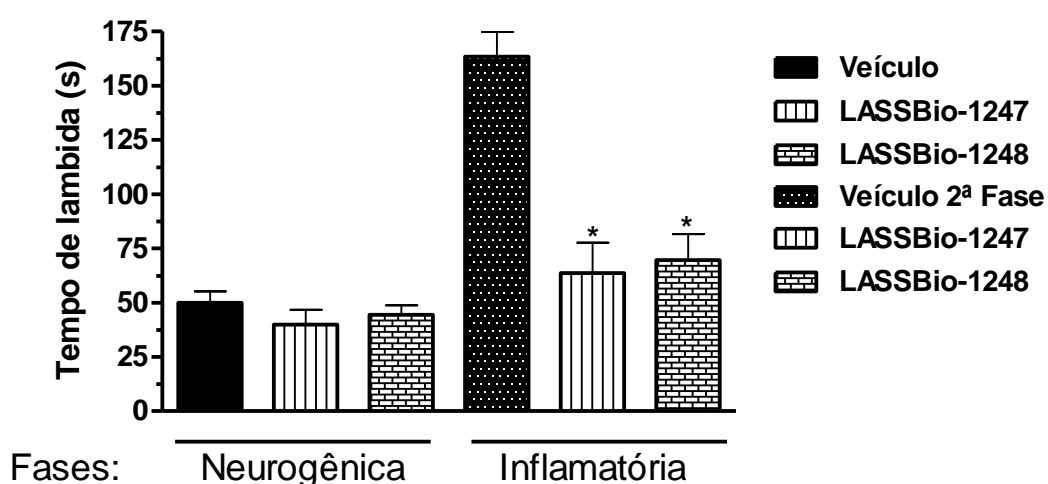


Gráfico 11: Efeito antinociceptivo dos derivados NAH indólicos LASSBio-1247 e LASSBio-1248 nas fases neurogênica e inflamatória do modelo de nociceção induzido por formalina 2,5%.

Os derivados NAH indólicos foram administrados à 100 $\mu\text{mol/kg}$ (v.o.) 1 h antes da administração intraplantar de 20 μL de formalina à 2,5%. Os resultados são expressos como tempo de lambida em segundos (s) \pm EPM obtidos durante os 5 min iniciais do experimento (fase neurogênica) e durante o intervalo de 15 a 30 min depois da administração da formalina 2,5%; número de animais (n) = 10- 13; * $p < 0,05$ em comparação ao grupo-veículo (goma arábica 5%), * $p < 0,05$ em comparação ao grupo-veículo (goma arábica 5%), ANOVA-oneway.

5.6.1 Avaliação da participação dos receptores canabinoides no efeito antinociceptivo dos derivados NAH indólicos

Atualmente, existem diversos estudos mostrando que a ativação do sistema canabinoide através dos receptores CB2 pode reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α . (RIBEIRO *et al.*, 2000). Ademais, tanto a ativação de CB1 quanto de CB2 tem participação antinociceptiva relevante em modelos de dor inflamatória, inclusive aqueles induzidos por carragenina ou por formalina (QUARTILHO *et al.*, 2003). Além da atividade considerável no modelo de formalina, resultados prévios mostram que tanto LASSBio-1247 quanto LASSBio-1248 também apresentaram atividade anti-hipernociceptiva pronunciada no modelo de hipernocicepção térmica induzida por carragenina (SANTOS, 2009).

No ensaio com formalina, a administração de antagonistas canabinoides dos receptores CB1 e CB2 (AM281 e AM630, respectivamente) e posterior tratamento com o agonista canabinoide (Win55.212-2) mostrou que ambos os receptores tem participação relevante no efeito antinociceptivo mediado pelo Win55.212-2 durante a fase inflamatória (Gráfico 12).

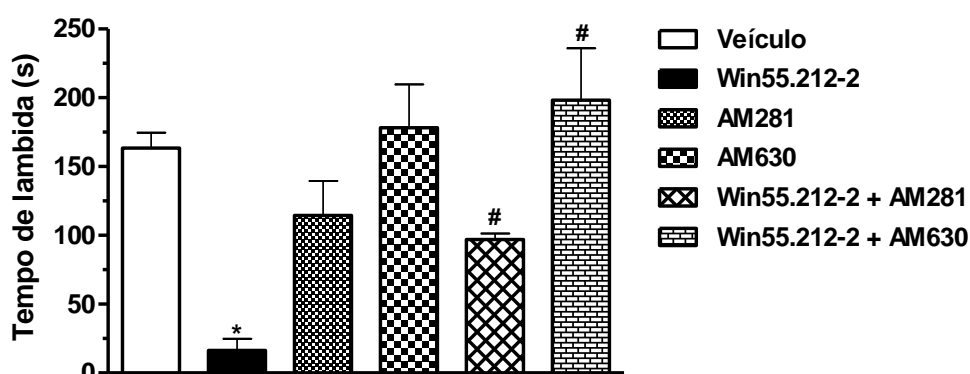


Gráfico 12: Avaliação da participação dos receptores canabinoides durante a fase inflamatória do modelo de nocicepção induzida por formalina 2,5%.

Win55,212-2 foi administrado na dose de 5,7 $\mu\text{mol/kg}$ (I.P), AM281 à 0,9 $\mu\text{mol/kg}$ e AM630 à 1,9 $\mu\text{mol/kg}$ (I.P). Respectivamente, os antagonistas e o agonista foram administrados 45 e 30 min antes da injeção intraplantar de 20 μL de formalina à 2,5%. Os resultados são expressos em tempo de lambida em segundos (s) \pm EPM obtidos durante o intervalo de 15 e 30 min depois da administração da formalina 2,5%; número de animais (n) = 5- 10, * $p < 0,05$ comparado ao grupo-veículo; # $p < 0,05$ comparado ao Win55,212-2 (ANOVA-oneway).

Esta mesma fase do teste de formalina indicou que a atividade antinociceptiva mediada pelo derivado LASSBio-1247 não é alterada pelo tratamento posterior do antagonista AM630 (Gráfico 13). Vale destacar que, com o término do AM281, o estudo sobre a participação dos receptores CB1 no efeito antinociceptivo de LASSBio-1247 será realizado em breve.

A estratégia de administração do antagonista CB1 AM281 após o tratamento com LASSBio-1248 mostrou que há a participação do referido receptor no efeito antinociceptivo deste derivado. Ademais, o estudo funcional indica que a atividade de LASSBio-1248 também envolve a participação do receptor CB2, já que a administração de AM630 reverteu o efeito antinociceptivo de LASSBio-1248 durante a fase inflamatória do modelo de formalina (Gráfico 13).

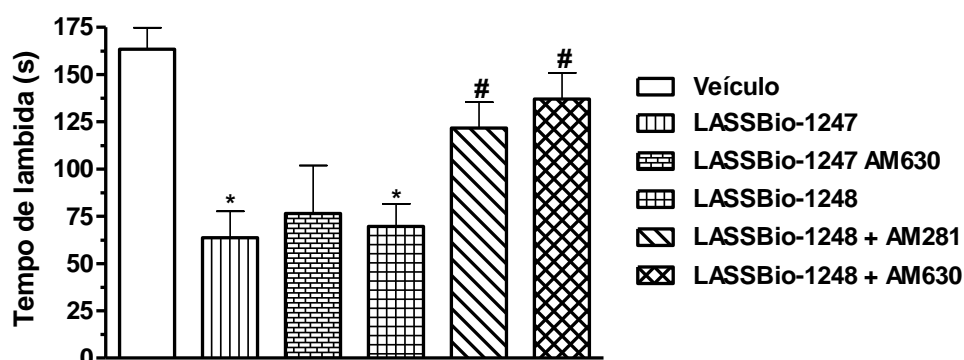


Gráfico 13: Avaliação da participação dos receptores canabinoides na modulação do efeito antinociceptivo dos derivados LASSBio-1247 e LASSBio-1248 na fase inflamatória do modelo de nocicepção induzida por formalina 2,5%.

Os derivados NAH indólicos foram administrados na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ por v.o, AM281 à 0,9 $\mu\text{mol/kg}$ e AM630 à 1,9 $\mu\text{mol/kg}$ (I.P). Respectivamente, os antagonistas foram administrados 45 min antes da injeção intraplantar de 20 μL de formalina à 2,5%. Os resultados são expressos em tempo de lambida em segundos (s) \pm EPM obtidos durante o intervalo de 15 e 30 min depois da administração da formalina 2,5%; número de animais (n) = 7- 13. * $p < 0,05$ comparado ao grupo-veículo; # $p < 0,05$ comparado ao LASSBio-1248 (ANOVA-oneway).

5.7 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM DERIVADOS NAH INDÓLICOS (COSTA *et al.*, 2010)

A comunidade farmacêutica que dedica grandes esforços no desenvolvimento de fármacos antagonistas de canais TRPV1 observou a ocorrência de hipertermia corporal como um efeito colateral importante (MORAN *et al.*, 2011). Além disto, outros estudos relacionados com o potencial analgésico de canabinoides e receptores CB1 apontam o risco significativo de hipotermia (WILEY *et al.*, 2014).

Neste contexto, a temperatura corporal de camundongos tratados com LASSBio-1247 ou LASSBio-1248 à 100 $\mu\text{mol/kg}$ por v.o. foi avaliada e comparada com a temperatura dos animais tratados com o veículo das substâncias (goma arábica 5%), sendo considerado o grupo-controle. O experimento revelou que, assim como o LASSBio-1247, o LASSBio-1248 não alterou de modo significativo a temperatura corporal durante as quatro horas de análises (Gráfico 14).

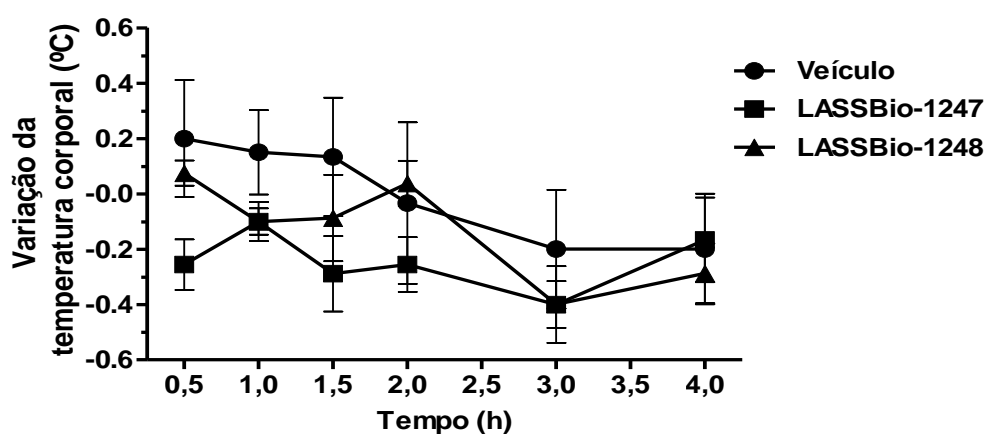


Gráfico 14: O tratamento com LASSBio-1247 e LASSBio-1248 não altera a termorregulação corporal dos animais.

Os derivados NAH indólicos LASSBio-1247 e LASSBio-1248 foram administrados na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ por v.o e a temperatura corporal foi avaliada durante às 4 h subsequentes. Os resultados são expressos em variação da temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) \pm EPM em comparação com a temperatura dos animais do grupo-veículo; número de animais (n) = 6- 9.

5.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIQUIMIOTÁTICO DOS DERIVADOS NAH INDÓLICOS

Segundo revisão bibliográfica, os neutrófilos podem contribuir significativamente com a fisiopatologia da fase inicial da AR em virtude de sua potencial capacidade de produzir mediadores que recrutam leucócitos, e conseqüentemente contribuir para o aumento do processo inflamatório e álgico (CASCÃO *et al.*, 2011).

Para avaliar se os derivados NAH indólicos reduzem a migração de neutrófilos, o modelo de quimiotaxia induzida por fMLP foi utilizado (MING *et al.*, 1987).

Os resultados obtidos no modelo de quimiotaxia de neutrófilos em câmara de Boyden estimulados por fMLP indicam que, assim como o SB203580, o LASSBio-1247 inibe a migração de neutrófilos em aproximadamente 45% comparado ao grupo-controle tratado com DMSO (Gráfico 15). Já o derivado LASSBio-1248 apresenta uma atividade anti-quimiotática de 25%, entretanto este efeito não é estatisticamente significativo (Gráfico 15).

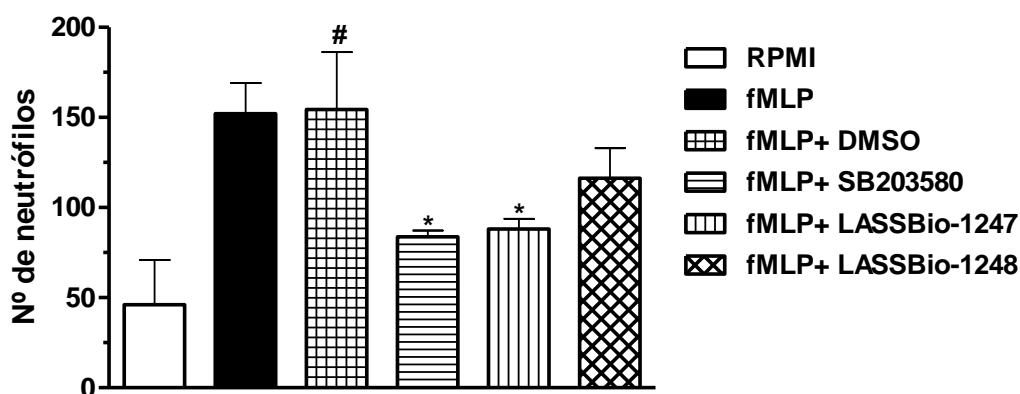


Gráfico 15: Avaliação do efeito anti-quimiotático de LASSBio-1247 e LASSBio-1248 sobre a migração de neutrófilos.

Os neutrófilos foram obtidos de medula óssea de fêmur e tíbia de ratos *wistar* após centrifugação das células em gradiente de percoll. Estas células foram ressuspensas em RPMI e a concentração foi ajustada para $1,0 \times 10^6$ neutrófilos/mL. Os neutrófilos foram pré-incubados por 1 h com o DMSO, com os derivados NAH indólicos ($100 \mu\text{M}$) ou com o SB203580 ($50 \mu\text{M}$) e colocados na parte superior da câmara de Boyden. O fMLP foi adicionado à 10 nM na região inferior da câmara e colocados em incubação por 1 h à 37°C . Os neutrófilos são contados por microscopia ótica e os resultados são expressos em número de neutrófilos \pm EPM; número de animais (n) = 1- 3. # $p < 0,05$ comparado ao RPMI; * $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com DMSO (ANOVA-oneway).

5.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERNOCICEPTIVO MECÂNICO NO MODELO DE AIA

Este teste hipernociceptivo induzido por mBSA ocorre inicialmente em virtude da ação de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , que desencadeiam a liberação de aminas e prostaglandinas que, por sua vez, também reduzirão o limiar de excitabilidade da membrana neuronal. Ademais, o referido modelo visa simular respostas imunes dependente de células Th1, como aquelas observadas durante a AR (CUNHA *et al.*, 2008b).

Neste contexto, a avaliação mecânica indicou que a hipernocicepção foi estabelecida 1 h após a injeção intra-articular de mBSA (Gráfico 16 e Gráfico 17). Sabendo que os AINEs podem ser utilizados no tratamento da dor de pacientes com AR, nós utilizamos a indometacina como controle-positivo para a resposta anti-hipernociceptiva no modelo em questão (ABRAMSON, 2011). Com isto, as primeiras 24 h de observação mostraram que a indometacina administrada na dose de 8,4 $\mu\text{mol/kg}$ (3 mg/kg) exibiu efeito anti-hipernociceptivo importante logo 1 h depois do tratamento, mantendo esta atividade de modo estatisticamente significativo até a 6^a h da avaliação (gráfico 16 e gráfico 17). De modo semelhante, o LASSBio-1247 exibiu atividade anti-hipernociceptiva relevante e estatisticamente significativa desde de a 1^a h até a 4^a h (gráfico 16). Já o derivado LASSBio-1248 apresentou efeito estatisticamente significativo 1 h depois da administração por v.o. Contudo, seu efeito não foi importante nas demais avaliações das 24 h iniciais (gráfico 17).

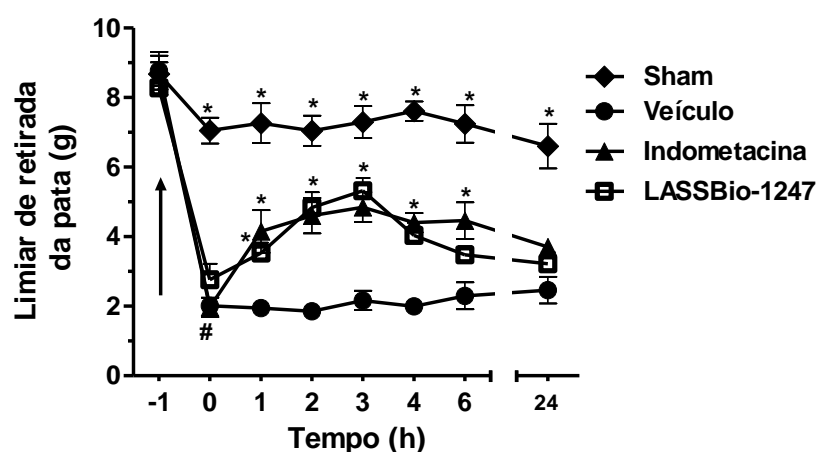


Gráfico 16: Avaliação da atividade anti-hipernociceptiva do derivado LASSBio-1247 e da indometacina no ensaio de hipernocicepção mecânica durante 24 h no modelo de AIA.

Indometacina administrada a 8,4 $\mu\text{mol/kg}$ (3 mg/kg) (v.o.), uma vez ao dia, e o derivado LASSBio-1247 administrado na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ (v.o) 1 h após a administração intra-articular de mBSA. Os resultados são expressos em limiar de retirada de pata em gramas (g) \pm EPM; número de animais (n) = 6- 13, # $p < 0,05$ comparado aos animais não-estimulados com mBSA (tempo -1 h), teste - *t* Student; * $p < 0,05$ comparado ao grupo-veículo, ANOVA-twoway.

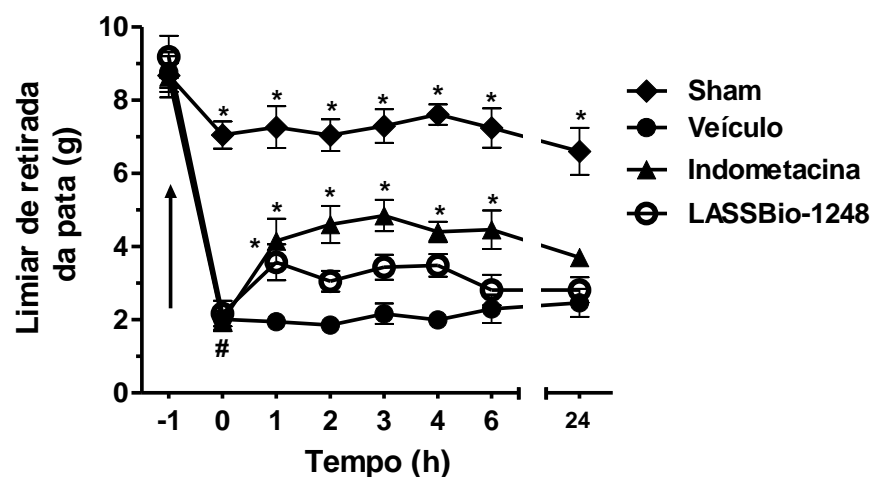


Gráfico 17: Avaliação da atividade anti-hipernociceptiva do derivado LASSBio-1248 e da indometacina no ensaio de hipernocicepção mecânica durante 24 h no modelo de AIA.

Indometacina administrada a 8,4 $\mu\text{mol/kg}$ (3 mg/kg) (v.o.), uma vez ao dia, e o derivado LASSBio-1248 administrado na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ (v.o) 1 h após a administração intra-articular de mBSA. Os resultados são expressos em limiar de retirada de pata em gramas (g) \pm EPM; número de animais (n) = 6- 13, # $p < 0,05$ comparado aos animais não-estimulados com mBSA (tempo -1h), teste- *t* Student; * $p < 0,05$ comparado ao grupo-veículo, ANOVA-twoway.

Além da avaliação inicial nas 24 primeiras horas após a administração intra-articular de mBSA, o modelo permitiu averiguar o efeito anti-hipernociceptivo das substâncias NAH indólicas nos dias subsequentes.

O uso do transdutor de força que evocou o reflexo de flexão da articulação da pata traseira do animal permitiu observar que LASSBio-1247 administrado na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ duas vezes ao dia aumentou consideravelmente a resistência dos animais ao estímulo mecânico nos 4 dias posteriores do experimento (tempos 25- 97 h) comparado ao grupo-controle (Gráfico 18). Estes resultados foram semelhantes àqueles observados pela administração de 8,4 $\mu\text{mol/kg}$ em dose única diária de indometacina (Gráfico 18).

Assim como na primeira fase do experimento (24 h), o derivado LASSBio-1248 não apresentou atividade anti-hipernociceptiva estatisticamente significativa no modelo de AIA (Gráfico 19).

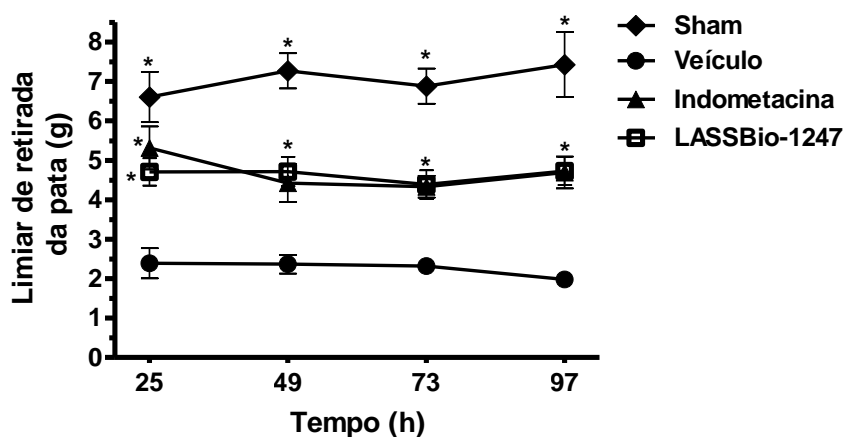


Gráfico 18: Avaliação da atividade anti-hipernociceptiva de LASSBio-1247 e da indometacina no ensaio de hipernocicepção mecânica de 25 a 97 h após a indução por mBSA.

Indometacina administrada a 8,4 $\mu\text{mol/kg}$ (3 mg/kg) (v.o.), uma vez ao dia, e o derivado LASSBio-1247 administrado na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ (v.o) duas vezes ao dia. Os resultados são expressos em limiar de retirada de pata em gramas (g) \pm EPM; número de animais (n) = 6- 13; * $p < 0,05$ comparado ao grupo-veículo, ANOVA-twoway.

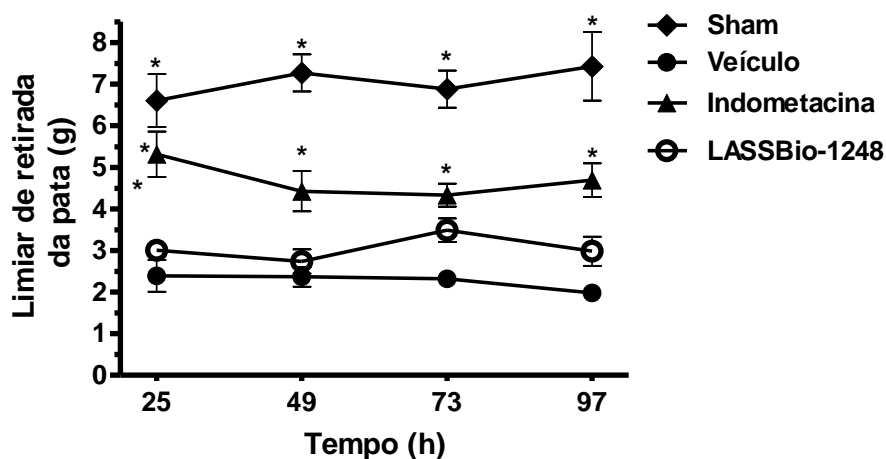


Gráfico 19: Avaliação da atividade anti-hipernociceptiva de LASSBio-1248 e da indometacina no ensaio de hipernocicepção mecânica de 25 a 97 h após a indução por mBSA.

Indometacina administrada a 8,4 $\mu\text{mol/kg}$ (3mg/kg) (v.o.), uma vez ao dia, e o derivado LASSBio-1248 administrado na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ (v.o) duas vezes ao dia. Os resultados são expressos em limiar de retirada de pata em gramas (g) \pm EPM; número de animais (n) = 6- 13; * p<0,05 comparado ao grupo-veículo, ANOVA-twoway.

Ainda, o cálculo da AUC do efeito anti-hipernociceptivo do derivado LASSBio-1247 e da indometacina confirmou a relevância do aumento à resistência mecânica no modelo de AIA, tanto nas 24 h iniciais (53 e 81%, respectivamente) quanto nas avaliações diárias (Gráfico 20). Nestas leituras, LASSBio-1247 proporcionou efeito anti-hipernociceptivo relevante e na mesma magnitude da indometacina, sendo igual a 100% (Gráfico 21).

Assim como as avaliações realizadas nas primeiras 24 h do experimento, o gráfico 21 confirma que LASSBio-1248 não apresentou efeito anti-hipernociceptivo estatisticamente significativo nos dias subsequentes no modelo de AIA.

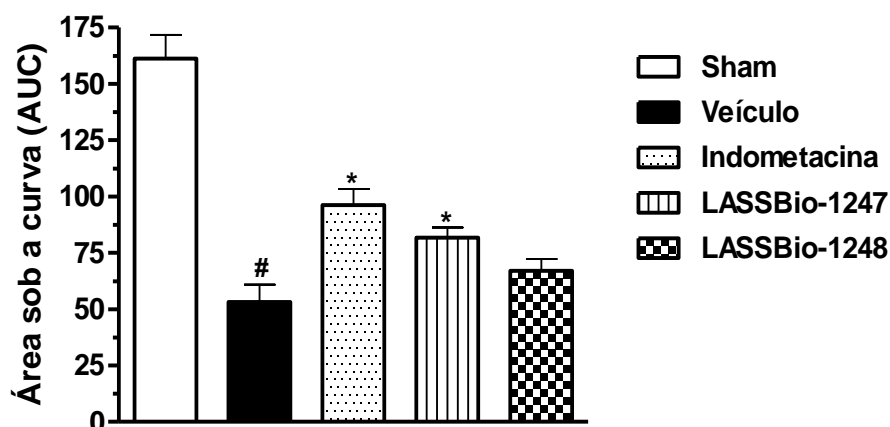


Gráfico 20: Efeito anti-hipernociceptivo global de LASSBio-1247, LASSBio-1248 e da indometacina obtidos pelo cálculo da área sob a curva (AUC) nas primeiras 24 h do modelo de AIA.

Indometacina administrada a 8,4 $\mu\text{mol/kg}$ (3 mg/kg) (v.o.), uma vez ao dia, e os derivados LASSBio-1247 e LASSBio-1248 administrados na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ (v.o) após a administração intra-articular de mBSA. Os resultados são expressos área sob a curva (AUC) \pm EPM das 24 h iniciais do experimento; número de animais (n) = 6- 13, # $p < 0,05$ comparado ao grupo-sham; * $p < 0,05$ comparado ao grupo-veículo; ANOVA-oneway.

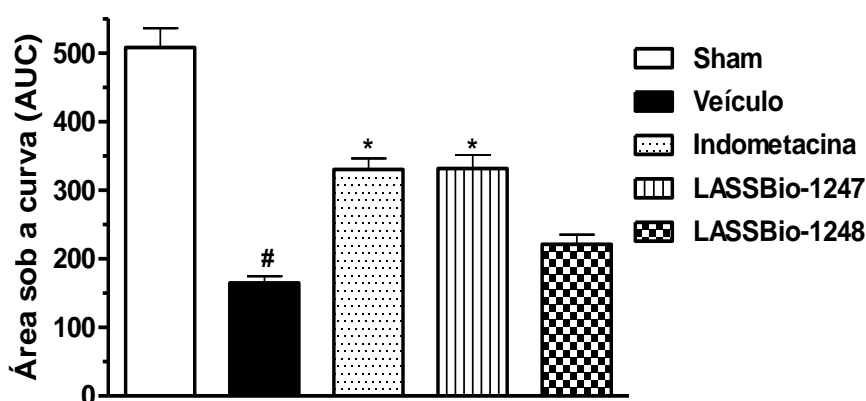


Gráfico 21: Efeito anti-hipernociceptivo global de LASSBio-1247, LASSBio-1248 e da indometacina obtidos pelo cálculo da área sob a curva (AUC) na fase crônica do modelo de AIA.

Indometacina administrada a 8,4 $\mu\text{mol/kg}$ (3 mg/kg) (v.o.), uma vez ao dia, e os derivados LASSBio-1247 e LASSBio-1248 administrados na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ (v.o) duas vezes ao dia após a administração intra-articular de mBSA. Os resultados são expressos área sob a curva (AUC) \pm EPM; número de animais (n) = 6- 13, # $p < 0,05$ comparado ao grupo-sham; * $p < 0,05$ comparado ao grupo-veículo; ANOVA-oneway.

Não obstante, a contagem de leucócitos totais realizada por microscopia ótica revelou que a administração intra-articular de mBSA aumentou significativamente a migração leucocitária para a cavidade da articulação comparada ao grupo-sham. No entanto, o tratamento dos camundongos com os derivados NAH indólicos mostrou que tanto LASSBio-1247 quanto o LASSBio-1248 reduzem o número de leucócitos na articulação inflamada em 42 e 57%, respectivamente. Estes efeitos foram semelhantes aquele exibido pela indometacina (Gráfico 22).

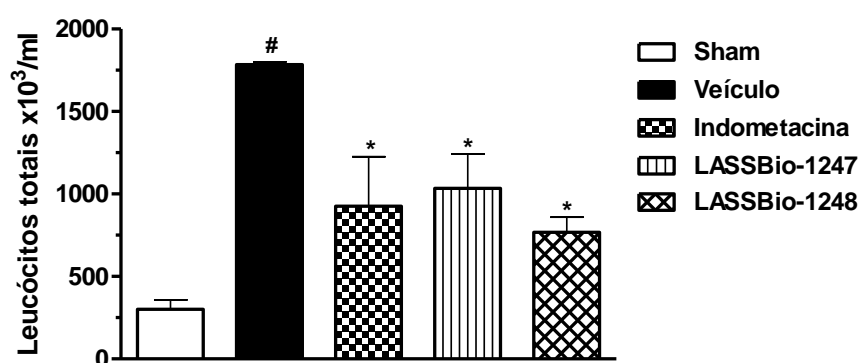


Gráfico 22: Os derivados LASSBio-1247 e LASSBio-1248 reduzem a quantidade de leucócitos totais do lavado articular no modelo de AIA.

Indometacina administrada a 8,4 $\mu\text{mol/kg}$ (3 mg/kg) (v.o.), uma vez ao dia, e os derivados NAH indólicos foram administrados na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ duas vezes ao dia, ambos por 5 dias. O lavado articular foi avaliado por microscopia ótica (aumento 40x) e os resultados são expressos em número de células x 10³/mL \pm EPM; número de animais (n) = 3. # p<0,05 comparado ao grupo-sham; * p<0,05 comparado ao grupo veículo (ANOVA-oneway).

5.9.1 Dosagem de TNF- α de animais com AIA

Sabidamente, o TNF- α exerce função relevante no recrutamento de leucócitos em modelos experimentais de AR que favorece a manutenção da resposta inflamatória e na redução do limiar de ativação dos nociceptores periféricos da articulação (KOCK, 2005; ASKENASE, 2003; KÖNIG *et al.*, 2014). Associado ao fato que os derivados NAH indólicos inibem a produção de TNF- α proveniente de macrófagos *in vitro*, os níveis desta citocina nos animais com AIA foram determinados.

Em virtude de a AR ser uma doença sistêmica que não afeta exclusivamente as articulações, observamos se os derivados NAH indólicos reduzem a quantidade de TNF- α plasmático (CHEN *et al.*, 2013; KOBAYASHI *et al.*, 2014).

Ao fim do experimento, os animais tratados com a indometacina a 8,4 $\mu\text{mol/kg}$ em dose única diária não apresentaram a quantidade de TNF- α diminuída comparada ao grupo-controle. Ainda, a administração de LASSBio-1248 também não diminuiu os níveis séricos desta citocina (Gráfico 23). No entanto, os animais tratados com LASSBio-1247 duas vezes por dia durante 5 dias com doses de 100 $\mu\text{mol/kg}$ exibiram menor quantidade de TNF- α no plasma (cerca de 62%) comparado ao grupo de animais tratados com o veículo (goma arábica 5%) (Gráfico 23).

Em seguida, a dosagem de TNF- α provenientes de amostras da articulação revelou que LASSBio-1247 administrado nas condições supracitadas diminuiu de modo estatisticamente significativo a quantidade de TNF- α comparado com o grupo-controle (47%) (Gráfico 24).

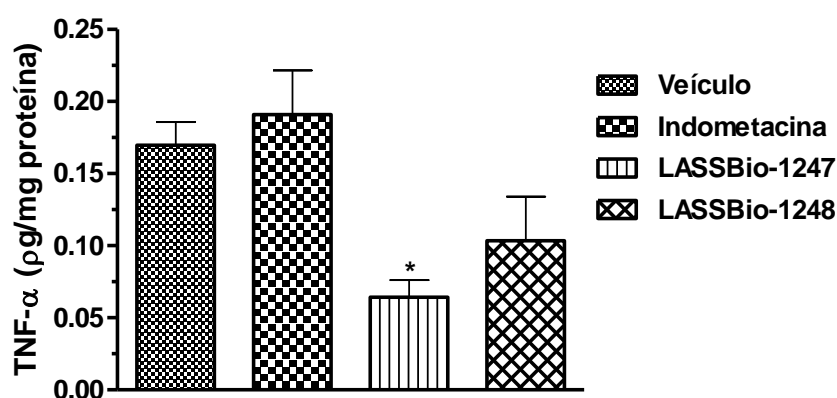


Gráfico 23: Efeito de LASSBio-1247, LASSBio-1248 e da indometacina sobre as quantidades de TNF- α plasmático em camundongos com AIA.

As amostras de plasma foram provenientes de animais tratados com um dos derivados NAH indólicos administrados na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ duas vezes ao dia ou com a indometacina em dose única de 8,4 $\mu\text{mol/kg}$ ou goma arábica 5% por v.o durante 5 dias. Os resultados são expressos em pg/mg de proteína \pm EPM; número de animais (n) = 2- 3. * $p < 0,05$ comparado ao grupo-veículo (ANOVA-oneway).

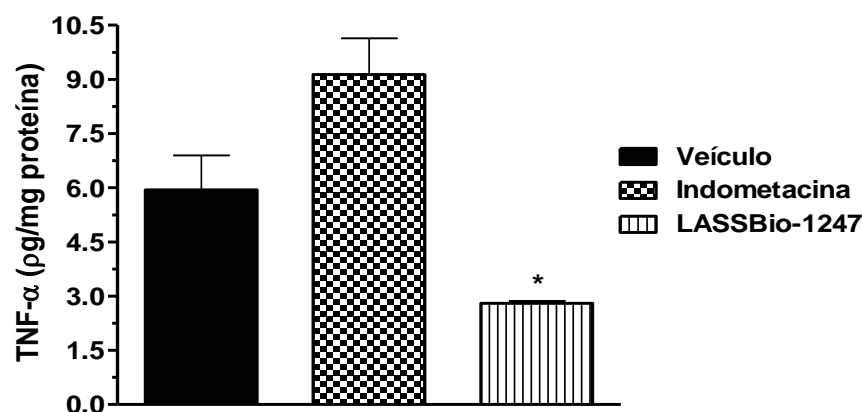


Gráfico 24: LASSBio-1247 reduz a quantidade de TNF- α articular em camundongos do modelo de AIA.

As amostras da articulação foram provenientes de animais tratados com derivado NAH indólico administrado na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ duas vezes ao dia, com a indometacina em dose única de 8,4 $\mu\text{mol/kg}$ ou goma arábica 5% por v.o durante 5 dias. Os resultados são expressos em pg/mg de proteína \pm EPM; n= 2 (cada n corresponde ao *pull* de amostras de 2 animais). * $p < 0,05$ comparado ao grupo-veículo (Teste *t*-student).

5.9.2 Dosagem de PGE₂ de animais com AIA

Conforme descrito amplamente na literatura, a PGE₂ é um dos principais mediadores liberados durante a inflamação capaz de reduzir o limiar de ativação dos nociceptores, contribuindo significativamente para a ocorrência da dor. Inclusive, os AINEs constituem uma das classes de fármacos que podem ser prescritos para o tratamento analgésico da AR (PISETSKY & WARD, 2012).

Ademais, Cunha e colaboradores (2008) revelaram que a intermediação do processo hipernociceptivo no modelo de AIA em questão é realizada por prostaglandinas como consequência da liberação inicial de TNF- α (CUNHA *et al.*, 2008b).

Com isto, os experimentos mostraram que as amostras do lavado articular dos animais com AIA apresentaram quantidades significativamente elevadas de PGE₂ comparadas com o grupo-sham (Gráfico 25). Neste contexto, a administração de LASSBio-1247 por via oral duas vezes ao dia durante 5 dias aos camundongos com AIA proporcionou a redução de aproximadamente 63% de PGE₂ na cavidade intra-articular comparado ao grupo-controle ao final do experimento (Gráfico 25).

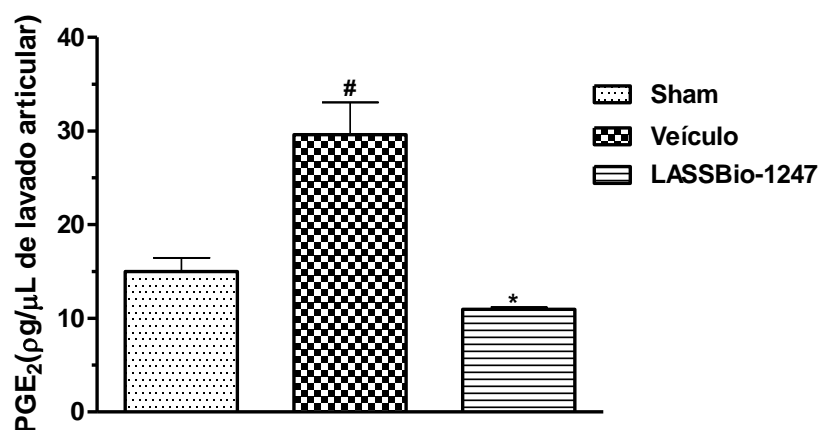


Gráfico 25: LASSBio-1247 reduz a quantidade intra-articular de PGE₂ do modelo de AIA em camundongos.

As amostras da articulação foram provenientes de animais tratados com derivado NAH indólico administrado na dose de 100 μmol/kg duas vezes ao dia ou goma arábica 5% por v.o. Tratamento realizado por cinco dias. Os resultados são expressos em pg/μL de lavado articular ± EPM; n= 2- 3. ^{*}p<0,05 comparado ao grupo-veículo; [#]p<0,05 comparado ao grupo-sham; (ANOVA-oneway).

5.10 POTENCIAL ULCEROGÊNICO

A determinação do potencial ulcerogênico dos derivados NAH indólicos LASSBio-1247 e LASSBio-1248 obtida através da dissecação dos estômagos dos camundongos utilizados no modelo de AIA foi realizada para avaliar a possibilidade destes compostos provocarem lesões ulcerativas gástricas. Este efeito colateral dos AINEs tradicionais é clinicamente importante (BURKE *et al.*, 2006).

A análise macroscópica da mucosa do estômago dos animais realizada após a administração por via oral dos compostos duas vezes ao dia durante 5 dias na dose de 100 μmol/kg mostrou que LASSBio-1248 não provocou a formação de lesões pontuais ou hemorrágicas aparentes. De modo contrário, LASSBio-1247 induziu lesões pontuais em alguns estômagos observados, assim como os animais tratados diariamente com indometacina a 8,4 μmol/kg.

5.11 AVALIAÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR AA

Sabidamente, a TXA₂ é um prostanóide proveniente de plaquetas formado a partir da ação enzimática da COX-1 expressa nas referidas células sobre o AA liberado após a ação da PLA₂ sobre os fosfolípidos de membrana (SMITH *et al.*, 2000). Diante da inibição da produção de PGE₂ em amostras de articulação de animais estimulados com AIA, associado ao fato que LASSBio-1247 foi planejado a partir da *bis*-homologação de derivados inibidores da COX, o modelo experimental de

agregação plaquetária induzida por AA foi utilizado para avaliar uma possível ação inibitória do protótipo NAH indólico sobre a cascata do AA (CUNHA *et al.*, 2003).

Neste contexto, o gráfico 26 mostra que o AA induz a agregação de plaquetas provenientes de coelhos e que este efeito foi inibido pelo tratamento prévio de indometacina 100 μM ou LASSBio-1247 em diferentes concentrações.

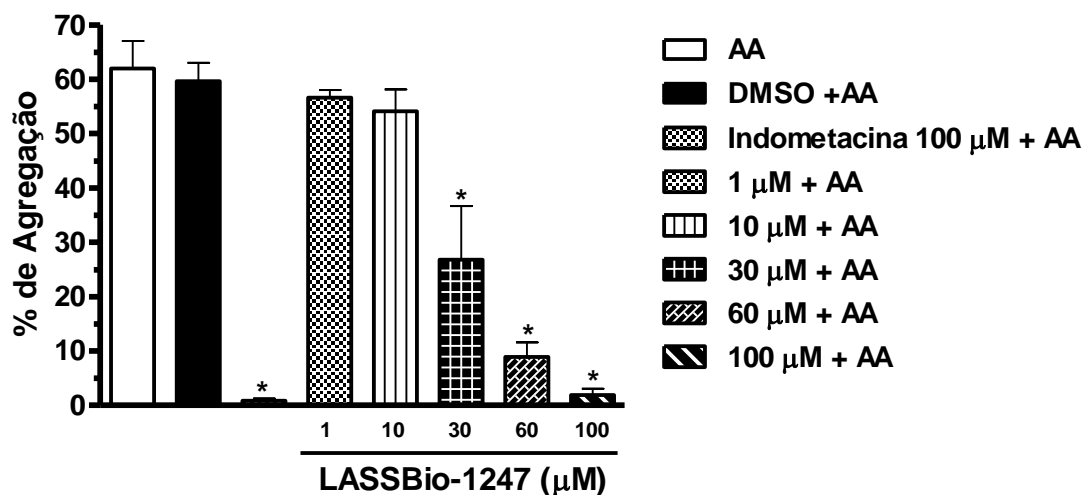


Gráfico 26: LASSBio-1247 reduz a agregação plaquetária induzida por AA em um efeito dependente da concentração.

O derivado NAH indólico foi pré-incubado em diferentes concentrações (1-100 μM) por 5 min antes da adição do AA (200 μM) nas plaquetas de coelho. Os resultados são expressos em porcentagem (%) de agregação plaquetária \pm EPM; n= 3- 4. *p<0,05 comparado ao grupo com DMSO (ANOVA-oneway).

Deste modo, a CI_{50} do derivado LASSBio-1247 sobre a agregação plaquetária induzida por AA foi determinada, sendo igual a 31,5 μM (Tabela 4) (Gráfico 27).

Tabela 4: Efeito inibitório de LASSBio-1247 sobre a agregação plaquetária induzida por AA.

Substância	Concentração (μM)	n	% Agregação plaquetária	% Inibição
LASSBio-1247	1	3	$56,2 \pm 1,83$	5,9
LASSBio-1247	10	3	$52,3 \pm 5,09$	12,3
LASSBio-1247	30	4	$29,6 \pm 12,20$	50,0
LASSBio-1247	60	3	$7,3 \pm 3,17$	87,7
LASSBio-1247	100	3	$2,3 \pm 1,60$	96,1

Os resultados são expressos em média \pm erro padrão; n = número de experimentos/grupo.

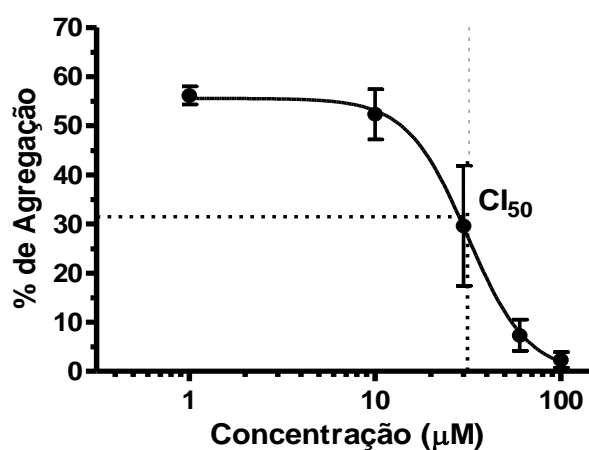


Gráfico 27: Curva concentração-resposta do derivado LASSBio-1247 no modelo de agregação plaquetária induzida por AA.

LASSBio-1247 foi avaliado em diferentes concentrações (1- 100 μM). Os resultados são expressos em porcentagem de agregação plaquetária \pm EPM; curva sigmoide com inclinação variável obtida por regressão não-linear ($R^2 = 0,7832$); n= 3- 4.

6. DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A artrite reumatoide (AR) é um processo inflamatório crônico multifatorial, mas de cunho autoimune, caracterizada pela inflamação persistente da sinóvia, sendo associada com danos permanentes à cartilagem da articulação. Neste contexto, a inflamação e a intensa migração leucocitária para a articulação acometida são fatores essenciais no desenvolvimento da doença em questão (DUBIN & PATAPOUTIAN, 2010; WALSH & MCWILLIAMS, 2012).

De modo corroborativo, a participação de neutrófilos, macrófagos, células T CD4⁺ e mediadores inflamatórios no desenvolvimento e manutenção da referida doença é extremamente relevante (SCOTT *et al.*, 2010). Os macrófagos ativos são encontrados em quantidade elevada na membrana sinovial inflamada da articulação de indivíduos acometidos pela AR, existindo uma correlação com a manifestação da dor tanto na fase aguda quanto na crônica, por produzir quantidades significativas de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , que perpetuam a inflamação e a lesão articular (PARAMESWARAN & PATIAL, 2010; SCHAIBLE *et al.*, 2010). Assim como o TNF- α , a PGE₂ é liberada na sinóvia de pacientes com AR e também sensibiliza as fibras aferentes, favorece a ocorrência do processo algico que pode ser debilitante. Por sua vez, a dor apresenta uma estreita correlação com a incapacidade física e com a redução da qualidade de vida destes indivíduos (REINOLD *et al.*, 1995; RUSSEL *et al.*, 2011).

O TNF- α é uma citocina com importância fundamental na AR por agir como um amplificador da resposta inflamatória. Além de autorregular sua produção, o TNF- α é responsável pela ativação e recrutamento de células T, neutrófilos e dos próprios macrófagos, por causar dor inflamatória e induzir a liberação de outras citocinas culminando com a destruição articular (KINNE *et al.*, 2000; BRENNAN & MCINNES, 2008). Amplamente descrito, o TNF- α e seus receptores estão expressos em maiores concentrações tanto no soro quanto na articulação dos pacientes com AR (CHEN *et al.*, 2013; KOBAYASHI *et al.*, 2014).

Diante deste panorama e levando em consideração o perfil antinociceptivo e anti-inflamatório apresentado pelos derivados NAH indólicos LASSBio-1247 e LASSBio-1248, a potência inibitória dos referidos derivados sobre a produção de TNF- α proveniente de macrófagos peritoneais foi determinada (Santos, 2009). Assim, os

dois protótipos inibiram de forma dependente da concentração a produção de TNF- α , apresentando eficácia semelhante a talidomida, sendo que LASSBio-1247 é mais eficiente que o fármaco em questão e cerca de três vezes mais potente em inibir a produção de TNF- α que LASSBio-1248.

Em virtude do mecanismo de ação de LASSBio-1247 e LASSBio-1248 ser desconhecido, o teste de viabilidade celular foi empregado com o intuito de averiguar se a redução da produção de TNF- α não ocorreria pela morte dos macrófagos. Este experimento permitiu observar que, mesmo em altas concentrações, LASSBio-1248 inibe significativamente a produção do TNF- α sem afetar a viabilidade celular, como foi observado também para a talidomida. Apesar de LASSBio-1247 ter sido eficaz na diminuição da produção de TNF- α , este derivado NAH indólico reduziu a viabilidade de macrófagos em 30% na concentração de 100 μ M. No entanto, os resultados obtidos no experimento de viabilidade celular permitem sugerir que o efeito do derivado sobre a produção de TNF- α não é decorrente da morte celular, já que a CI_{50} da inibição da produção de TNF- α é aproximadamente dez vezes menor que a concentração responsável pela inviabilidade de algumas destas células.

Após obtermos os resultados em experimentos *in vitro*, havia a necessidade de avaliar os efeitos dos derivados em um modelo *in vivo* que fosse mediado principalmente por citocinas. Diante deste fato, o ensaio de hipernocicepção térmica induzido por LPS foi utilizado porque a resposta inflamatória é mediada majoritariamente por IL-1 β , IL-6 e TNF- α (VAJJA *et al.*, 2004). Através da ligação com receptores do tipo Toll 4, o LPS pode causar a fosforilação de enzimas MAPKs e do NF- κ B que estão envolvidos com a transcrição gênica de inúmeros fatores pró-inflamatórios, como as próprias citocinas citadas anteriormente (HAN *et al.*, 1994; ASHWELL, 2006; ROSSOL *et al.*, 2011).

O teste de hipernocicepção térmica induzido pelo LPS revelou que tanto LASSBio-1247 quanto LASSBio-1248 exibiram atividade na mesma magnitude da talidomida desde a primeira até a terceira hora de avaliação do experimento. Em virtude da natureza do modelo caracterizada pela presença das citocinas, há a possibilidade de os efeitos anti-hipernociceptivos dos derivados NAH indólicos estarem associados a inibições da atividade ou ativação de enzimas de vias de sinalização que participam da transcrição gênica das citocinas, como MAPK p38 e o fator de transcrição NF- κ B.

Estudos realizados previamente por Santos (2009) mostrou que a administração de LASSBio-1247 ocasionou efeito anti-hipernociceptivo relevante em um modelo de dor inflamatória induzida por carragenina associada a temperatura elevada. Contudo, esta atividade foi marcada pela perda gradativa do efeito conforme a evolução do tempo (4 h de experimento). Segundo Verry e colaboradores (2006), a inflamação provocada pela carragenina tem um perfil inicial determinado pela liberação sequencial de TNF- α e IL-1 β juntamente com IL-6, culminando com a presença de aminas vasoativas e prostaglandinas nos tecidos inflamados.

Sabidamente, LASSBio-1247 e LASSBio-1248 também induziram menor sensação hipernociceptiva em animais estimulados com carragenina na pata (SANTOS, 2009). Se uma comparação entre as atividades anti-hipernociceptivas de LASSBio-1247 obtidas nos modelos induzidos pela carragenina e pelo LPS for realizada é possível sugerir que a redução do seu efeito com relação ao tempo no experimento induzido pela carragenina não acontece devido a problemas farmacocinéticos. LASSBio-1247 mostrou ter atividade anti-hipernociceptiva relevante até a terceira hora no experimento de hipernocicepção induzida pelo LPS, indicando a possibilidade que este derivado NAH indólico possa ter parte de seu mecanismo de ação relacionados com a intervenção sobre a atividade de citocinas pró-inflamatórias (SANTOS, 2009).

Sabidamente, a capsaicina atua como agonista dos canais de cátion TRPV1 que são expressos de modo abundante em fibras aferentes sensoriais de pequeno e médio calibres e requeridos para a redução do limiar de ativação dos nociceptores durante o processo álgico inflamatório. Com a baixa homologia entre os subtipos de receptores de potencial transitório, há a possibilidade de a capsaicina ativar somente o TRPV1 (MORAN *et al.*, 2011). O potencial analgésico do bloqueio de TRPV1 tem sido amplamente explorado seja por abordagens genéticas no receptor, seja pelo seu bloqueio (CATERINA *et al.*, 2000; VOIGHT *et al.*, 2014).

Já no aspecto molecular, experimentos apontam para a capacidade de a capsaicina diminuir a expressão de iNOS e COX-2, enzimas cujas transcrições gênicas podem ser mediadas pelo NF- κ B, em macrófagos estimulados por LPS (SHIN *et al.*, 2012). Mais ainda, a capsaicina impede a ativação deste fator de transcrição induzida pelo TNF- α , bem como bloqueia a degradação da subunidade I κ B α e assim evita a translocação da subunidade p65 para o núcleo que é essencial para o NF- κ B

exercer sua função (SINGH *et al.*, 1996). Parece que este efeito é independente dos canais TRPV1 (SHIN *et al.*, 2013).

De acordo com Sweitzer e colaboradores (2004), a aplicação intraplantar de capsaicina provoca rápida fosforilação da MAPK p38 (pico máximo de 2 min com a atividade até 10 min) e desencadeia papel importante no desenvolvimento do estado hipernociceptivo, exercendo seus efeitos na medula espinhal e nas fibras periféricas polimodais C (MIZUSHIMA *et al.*, 2005). A ativação desta enzima pode provocar a despolarização das membranas dos nociceptores sensoriais e contribuir para a formação da resposta nociceptiva persistente (CHENG & JI, 2008).

Os resultados no modelo de hipernocicepção térmica induzida por capsaicina indicaram que LASSBio-1247 e LASSBio-1248 tem atividade estatisticamente significativa logo após a administração da capsaicina e ambos aumentaram o tempo de permanência dos animais sobre a placa quente nos momentos seguintes da avaliação em um perfil semelhante ao inibidor da MAPK p38, o SB203580. Vale ressaltar que a administração da capsaicina promove a dessensibilização dos canais TRPV1 e, por isto, a resposta hipernociceptiva não acontece no final do experimento (VELDHUIS *et al.*, 2012). O cálculo da AUC evidenciou o efeito anti-hipernociceptivo global bastante pronunciado dos derivados NAH indólicos no modelo de hipernocicepção induzida por capsaicina.

Associados ao fato de LASSBio-1247 e LASSBio-1248 interferirem na produção de citocinas com o perfil de ativação da MAPK p38 induzida pela capsaicina, estes resultados permitem sugerir que ambos derivados podem atuar na via de sinalização mediada por esta MAPK (MIZUSHIMA *et al.*, 2005).

Amplamente descrito na literatura, estudos com imageamento de Ca^{+2} obtidos em células HEK293 que expressam canais de potencial transitório humano são bastante utilizados para avaliar a modulação dos canais TRPV1 por protótipos candidatos a fármacos analgésicos (CHEN *e al.*, 2014). Os receptores TRPV1 são canais de cátion não-seletivos que causam despolarização celular através do aumento do influxo de Na^+ e principalmente Ca^{+2} após sua ativação pela capsaicina (ROSENBAUM *et al.*, 2004; TRIBUTINO *et al.*, 2010). Como consequência da ativação dos canais TRPV1 expressos em nociceptores polimodais C e A δ periféricos, há a formação do potencial de ação e a ocorrência da dor (WANG & WOOLF, 2005).

Neste contexto, os experimentos com imageamento de Ca^{+2} mostraram que, ao contrário do antagonista AMG9810, nem LASSBio-1247 nem o LASSBio-1248

reduziram o influxo deste cátion para as células HEK293 expressando canais TRPV1h após o estímulo com capsaicina, permitindo sugerir que os efeitos anti-hipernociceptivos dos derivados NAH indólicos não envolvem a participação destes receptores integradores de estímulos dolorosos.

Inequivocamente, a analgesia observada por protótipos candidatos a fármaco mediada pelo bloqueio dos receptores TRPV1 está associada com a ocorrência da hipertermia por causa da sua função termorreguladora agregada possivelmente a sua expressão no SNC (JARA-OSGUERA *et al.*, 2008). Por exemplo, inúmeros antagonistas do canal TRPV1 induzem o aumento da temperatura corporal, inclusive em humanos (ROWBOTHAM *et al.*, 2011; GAVVA *et al.*, 2008). Com isto, apesar de os efeitos anti-hipernociceptivos destacáveis no modelo induzido por capsaicina, nenhum dos derivados NAH indólicos testados causou um aumento da temperatura corporal dos camundongos. Logo, estes resultados sugerem que os protótipos em questão são incapazes de provocar hipertermia e fortalecem as evidências obtidas em células HEK293 expressando TRPV1h.

Em virtude da característica integradora de sistemas dos canais TRPV1 que contribui para a facilitação da formação do potencial de ação, pode-se implicar na possibilidade de os derivados NAH indólicos reduzirem, direta ou indiretamente, a produção ou a ação de algum mediador em seu receptor metabotrópico e consequentemente impedir fosforilações e a ativação do TRPV1 (SAWYNOK *et al.*, 2006; ADCOCK, 2009). Por exemplo, Panossian e colaboradores relataram que o tratamento de leucócitos com capsaicina pode causar danos à membrana celular, resultando na liberação de AA e PGE₂ (PANOSSIAN *et al.*, 1996; HUANQ *et al.*, 2012). Em experimentos nociceptivos, o tratamento prévio com indometacina foi capaz de reduzir a sensibilidade térmica de animais após a aplicação tópica de capsaicina (BASTOS & TONUSSI, 2010).

A administração intraplantar de formalina promove a manifestação de duas fases nociceptivas. Na primeira fase, dita neurogênica, os derivados NAH indólicos não foram capazes de atenuar a nocicepção neurogênica, corroborando com resultados de experimentos anteriores onde a avaliação da resposta nociceptiva relacionada com SNC foi realizada sob estímulo térmico (SANTOS, 2009). Já a fase inflamatória mostrou que os dois derivados NAH possuem atividade antinociceptiva pronunciada em um modelo que há a participação de PGs e TNF- α (PEREIRA *et al.*, 2009).

Estudos científicos anteriores descrevem que o sistema canabinoide pode ser importante para a regulação da resposta imunológica durante a AR porque há a expressão de ambos os receptores em tecido sinovial dos pacientes e por diminuir o recrutamento de células relevantes ao desenvolvimento desta doença autoimune (GUI *et al.*, 2014; MASSI *et al.*, 2006). Ainda, trabalhos reportam: (1) a possibilidade de a interação agonista em receptores CB2 diminuir a produção de TNF- α e de outros mediadores inflamatórios e (2) que um determinado agonista tanto de CB1 quanto em CB2 apresenta efeito anti-hipernociceptivo em modelos induzidos por formalina em camundongos e por carragenina em ratos. Estes fatos associados às atividades pronunciadas de LASSBio-1247 e LASSBio-1248 nos modelos de formalina e de carragenina justificaram a observação da participação dos receptores canabinoides nos seus efeitos antinociceptivos (CHANG *et al.*, 2001; QUARTILHO *et al.*, 2003).

Assim, um estudo funcional envolvendo a administração de antagonistas de receptores canabinoides com os derivados NAH indólicos foi realizado para compreender parte dos seus mecanismos de ação antinociceptivo.

A administração de AM630 15 min depois de LASSBio-1247 não alterou o perfil antinociceptivo deste derivado no modelo de nocicepção inflamatória induzida por formalina, sugerindo que seus efeitos não são dependentes de receptores CB2. Já o AM281 reverteu o efeito antinociceptivo de LASSBio-1248 na segunda fase do modelo de formalina, assim como o AM630. Portanto, estes resultados indicam que parte do efeito antinociceptivo deste derivado envolve a participação do sistema canabinoide e permitem sugerir que LASSBio-1248 pode ser agonista CB1 e CB2 sem, contudo, alcançar o SNC ou ser inibidor da enzima FAAH.

Conduto, apesar de os receptores CB1 modularem a neurotransmissão e as respostas relacionadas com a dor, Rawls e colaboradores (2002) mostraram que a administração do agonista Win55212-2 causou hipotermia persistente e dependente da dose, sendo revertida apenas pelo antagonista CB1 e não por um antagonista CB2. De acordo com os autores, os receptores CB1 localizados no SNC são os responsáveis primários na mediação da hipotermia induzida por agonistas canabinoides (RAWLS *et al.*, 2002).

Em virtude de os efeitos antinociceptivos de LASSBio-1247 ser pronunciado em modelos inflamatórios amparados por receptores CB1 e a evidente participação deste receptor na modulação da atividade antinociceptiva de LASSBio-1248, a temperatura corporal dos camundongos foi avaliada a fim de observar a ocorrência de

hipotermia como efeito colateral pela ativação de CB1 (RAWLS *et al.*, 2002). Os dados indicaram que o tratamento com os derivados NAH indólicos testados não alterou significativamente a temperatura dos animais e sugere que tanto LASSBio-1247 quanto LASSBio-1248 não apresentam efeitos termorregulatórios indesejáveis típicos daqueles provenientes da ativação de CB1.

Diante dos resultados de inibição da produção de TNF- α proveniente de macrófagos e anti-hipernociceptivos de LASSBio-1247 e LASSBio-1248 em modelos experimentais sustentados por mediadores e vias de sinalização importantes para o desenvolvimento e a manutenção da AR, decidimos verificar a eficácia destes derivados em um experimento de artrite propriamente dito e adotamos o modelo de **Artrite Induzida por Antígeno (AIA)** por ser dependente do antígeno e por refletir uma resposta imunológica mediada por células T (BRACKERTZ *et al.*, 1977a). Para este experimento, a leitura da resposta hipernociceptiva foi realizada a partir do emprego de estímulos mecânicos porque as fibras nociceptivas de músculos e das articulações exibem sensibilização destacável frente a este tipo de estímulo e também para associar a hipernocicepção com o movimento normal da articulação (SCHAIBLE *et al.*, 2006).

Segundo estudos publicados recentemente, a hipernocicepção induzida por BSA_m é direcionada por células T e mediada pelo TNF- α que, dentre outros mediadores, desencadeia a liberação de IL-1 β , PGE₂ e aminas simpáticas que também são responsáveis pela redução do limiar de excitabilidade da fibra nociceptiva (CUNHA *et al.*, 2008b).

O tratamento dos animais com o LASSBio-1247 por v.o propiciou um efeito anti-hipernociceptivo relevante já nas primeiras 24 h do modelo, dita fase aguda. O cálculo da AUC mostrou que o efeito observado foi significativo comparado ao grupo-controle semelhante ao fármaco de referência para o experimento, a indometacina. Já o derivado LASSBio-1248 não exibiu atividade em nenhum dos tempos avaliados.

O uso do transdutor de força indicou que LASSBio-1247 possui efeito anti-hipernociceptivo equivalente a indometacina nos demais dias da análise. A manutenção do efeito anti-hipernociceptivo causado pelo tratamento com a indometacina dos animais estimulados com AIA reforça a participação de prostanoídes na geração do processo hipernociceptivo.

Apesar de LASSBio-1248 ter apresentado efeitos anti-hipernociceptivos destacáveis nos modelos de dor inflamatória, a avaliação do efeito anti-

hipernociceptivo global no modelo de AIA aponta que este derivado não exibe qualquer atividade no modelo experimental de artrite caracterizado por dores crônicas. No caso, a avaliação da hipernocicepção de animais com AIA foi realizada a partir de estímulos mecânicos.

Sabidamente, a intensa migração leucocitária para a membrana sinovial da articulação acometida pela AR é um fator relevante tanto no desenvolvimento da dor quanto da própria doença (THOMSON & UDALOVA, 2009). Neste contexto, os resultados obtidos sobre a redução de leucócitos totais promovida pelo LASSBio-1247 podem ter contribuído para o seu efeito anti-hipernociceptivo.

Entretanto, esta atividade parece não ser a única importante para a ocorrência da hipernocicepção induzida pela administração intra-articular de BSA_m, visto que LASSBio-1248 também diminuiu o número de leucócitos totais, mas não alterou a resposta hipernociceptiva dos animais frente ao estímulo mecânico. Estes resultados indicam que LASSBio-1247 pode interferir em outros fatores relevantes para o desenvolvimento da nocicepção na AR porque, assim como o LASSBio-1248, LASSBio-1247 reduziu a produção de TNF- α *in vitro* e a concentração de leucócitos no lavado articular, mas somente esta substância apresentou efeito anti-hipernociceptivo pronunciado nas duas fases do modelo de AIA.

Apesar de a AR ser uma doença sustentada por células T e ter a participação de células B, há relatos consistentes do acúmulo de neutrófilos no fluido articular durante a AR. Sua ativação inapropriada contribui não só para a perpetuação da resposta inflamatória inicial e para os danos teciduais, mas também com a liberação de mediadores que reduzem o limiar de ativação dos nociceptores (FUTOSI *et al.*, 2013; KHANDPUR *et al.*, 2013). Na AR, os mecanismos de ativação, o recrutamento e a apoptose de neutrófilos estão alterados (CASCÃO *et al.*, 2010).

A partir da migração neutrofílica induzida pelo fMLP, um agente que fosforila a MAPKs e ativa NF- κ B para exercer a quimiotaxia destas células, observamos que o derivado LASSBio-1247 exibe efeito anti-quimiotático na mesma magnitude que o SB203580, diferente do LASSBio-1248. Com isto, os resultados *in vitro* permitem sugerir que o LASSBio-1247 pode reduzir o número de neutrófilos da articulação dos animais estimulados com AIA, pela sua atividade anti-quimiotática direta sobre as referidas células.

Ademais, o levantamento bibliográfico realizado por Cascão e colaboradores (2010) indica que os neutrófilos constituem o primeiro tipo celular a migrar para o fluido

sinovial durante a AR e a hipernocicepção na fase aguda do modelo de AIA é dependente de neutrófilos (PINTO *et al.*, 2010). Portanto, o efeito antiquimiotático de LASSBio-1247 sobre os neutrófilos pode ter reduzido a intensidade e a perpetuação do processo inflamatório e favorecido a sua atividade anti-hipernociceptiva.

Segundo diversos trabalhos científicos, o TNF- α exerce função relevante no recrutamento de leucócitos para a articulação de animais com artrite experimental e é fundamental para a manutenção da AR (KOCK, 2005; ASKENASE, 2003).

Sabendo que a AR é consequência de uma inflamação sistêmica onde o TNF- α exerce papel na patogênese desta doença, Shrivastava e colaboradores (2014) revelaram que pacientes com AR apresentam concentrações séricas de TNF- α elevadas, existindo uma correlação direta com a atividade e a gravidade da AR (SHRIVASTAVA *et al.*, 2014; JENKINS *et al.*, 2002). Os agentes biotecnológicos anti-TNF- α melhoram de modo rápido e consistente os sinais e sintomas causados pela AR, indicando ser uma abordagem adequada para o tratamento desta doença (AGARWAL, 2011).

Neste contexto, observamos que LASSBio-1247 administrado por v.o duas vezes ao dia durante 5 dias reduziu significativamente a quantidade de TNF- α plasmático comparado com os animais do grupo-controle. Todavia, o mesmo efeito não foi observado a partir do tratamento com LASSBio-1248 em condições experimentais iguais. Ou seja, ainda com a diminuição do número de leucócitos totais na articulação, o derivado LASSBio-1248 pode não ter exibido efeito anti-hipernociceptivo no modelo de AIA em virtude da sua incapacidade de reduzir a quantidade de TNF- α sistêmico. Segundo Keffer e colaboradores (1991), a elevação da quantidade desta citocina no plasma de camundongos desencadeia uma resposta semelhante à AR. Logo, a intervenção sobre a produção de TNF- α mediada pelo tratamento com LASSBio-1247 ratifica seu efeito sistêmico após a sua administração por v.o e permite sugerir que esta atividade é bastante relevante no modelo em questão.

Ao considerar que um conjunto de dados aponta que o TNF- α articular provoca intensa resposta hipernociceptiva que pode ser prevenida pela administração de fármacos biotecnológicos anti-TNF- α , a quantidade desta citocina na articulação de animais estimulados com BSA_m foi determinada (SCHAIBLE *et al.*, 2010; RICHTER *et al.*, 2010). Neste contexto, foi observado que LASSBio-1247 promoveu efeito

inibitório significativo sobre a produção de TNF- α na articulação acometida pela artrite experimental.

Segundo Curtis e Singh (2011), a diminuição da produção ou o bloqueio da ação de citocinas pró-inflamatórias pode ser importante no controle da dor e do desenvolvimento da AR. De fato, a presença do TNF- α na cavidade articular favorece o aumento da excitabilidade tanto das fibras nociceptivas locais quanto aqueles da medula espinhal (KÖNIG *et al.*, 2014).

Ainda, estudos realizados por Cunha e colaboradores (2008b) mostraram que a origem da hipernocicepção mecânica em camundongos com AIA depende de uma sequência de liberação de mediadores inflamatórios iniciada pelo TNF- α . Assim, os resultados indicam que a atividade anti-hipernociceptiva mediada pelo tratamento com LASSBio-1247 pode ser em virtude da redução de TNF- α e de uma possível descontinuidade na cascata de mediadores inflamatórios desencadeada pela indução da artrite experimental.

Em um estudo clínico realizado para avaliar a regulação sobre a migração de leucócitos, Taylor e colaboradores (2000) observaram que a redução de TNF- α promovida pela terapia com anticorpo monoclonal anti-TNF- α diminuiu a migração de neutrófilos para o interior da articulação de pacientes com AR, assim como células T e B e macrófagos. Logo, a terapia anti-TNF- α tem papel crítico no recrutamento de linfócitos e monócitos para a sinóvia da articulação. Então, a redução do número de leucócitos totais em articulações com artrite intermediada por LASSBio-1247 pode ter ocorrido devido a diminuição dos níveis de TNF- α , além da sua potencial atividade antiquimiotática para neutrófilos.

Ainda de acordo com Cunha e colaboradores (2008b), o modelo de AIA utilizado no presente trabalho resulta no surgimento da hipernocicepção cuja indução envolve a participação de PGE₂. Sobre o mecanismo do processo algico na AR, a PGE₂ é um mediador inflamatório que reduz o limiar de ativação dos nociceptores, facilitando a ocorrência da dor inflamatória periférica associada com a AR (MORIYANA *et al.*, 2005). Schaible e colaboradores (2002) mostraram que os receptores para PGE₂ expressos nas terminações dos nociceptores indicam a participação deste mediador lipídico no intermédio da dor inflamatória periférica associada com a AR. Inclusive, este fato corrobora com a ampla indicação dos AINEs para o tratamento analgésico de pacientes com a referida doença (RUOFF, 2014).

A dosagem do referido mediador lipídico proveniente de amostra da articulação de animais estimulados com a artrite experimental mostrou que, ao fim das 97 h do modelo em questão, o tratamento por v.o de LASSBio-1247 provocou uma atividade inibitória pronunciada sobre a produção de PGE₂ em quantidade comparável ao dos animais não-estimulados com BSAm (grupo-sham). Assim, estes dados sugerem que menores quantidades deste prostanoide no lavado articular podem estar associadas com a diminuição de TNF- α e da concentração de leucócitos totais. Ainda, o efeito anti-hipernociceptivo de LASSBio-1247 inclui a diminuição de PGE₂ na articulação.

Contudo, Cunha e colaboradores (2008b) também relataram que a PGE₂ é o mediador final de uma cascata de eventos dependente primordialmente do TNF- α , mas também a possibilidade de LASSBio-1247 promover a redução da produção de PGE₂ não pode ser excluída já que os derivados NAH indólicos estudados são provenientes da *bis*-homologação de um protótipo planejado para reduzir a produção de PGs a partir da inibição da enzima COX. Então, houve a necessidade de avaliar se LASSBio-1247 pode atuar na cascata do AA ou se a redução da PGE₂ aconteceu pela diminuição do TNF- α articular.

Neste contexto, diversos autores indicam que o modelo de agregação plaquetária induzida pelo AA pode ser utilizado como ferramenta importante para a triagem farmacológica de AINEs inibidores da COX (CUNHA *et al.*, 2003). Deste modo, os resultados do referido experimento mostraram que a incubação de LASSBio-1247 antes da adição do AA evitou a agregação das plaquetas em um efeito dependente da concentração empregada. Por isto, tal fato permite sugerir que LASSBio-1247 pode inibir a produção de prostanoídes

Uma observação macroscópica da mucosa gástrica dos animais mostrou que LASSBio-1248 é um derivado seguro por não induzir a formação de lesões ulcerativas quando administrado cronicamente, diferente de LASSBio-1247.

Portanto, o presente estudo revelou que, diante de uma doença cuja terapia é fundamentada em fármacos com importantes efeitos colaterais e outros de elevado custo e eficácia limitada, o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da AR capazes de reduzir os níveis de TNF- α e PGE₂ pode contribuir significativamente para diminuir a dor e, conseqüentemente, melhorar a qualidade de vida dos pacientes e amenizar os impactos sócio-econômicos relacionados com a AR.

Finalmente, o derivado NAH indólico LASSBio-1247 administrado por via oral surge como um protótipo candidato a fármaco promissor para o tratamento da AR.

7. CONCLUSÃO

7 CONCLUSÕES

- LASSBio-1247 é cerca de três vezes mais potente que LASSBio-1248 na inibição da produção de TNF- α proveniente de macrófagos que não ocorre em virtude da baixa viabilidade destas células;
- LASSBio-1247 e LASSBio-1248 exibem efeitos anti-inflamatórios e anti-hipernociceptivos pronunciados em modelos mediados por citocinas e vias de sinalização importantes para a gênese e manutenção da AR;
- O efeito antinociceptivo de LASSBio-1248 envolve a participação dos receptores CB1 e CB2 sem, contudo, afetar a nocicepção neurogênica;
- Tanto LASSBio-1247 quanto LASSBio-1248 são desprovidos dos principais efeitos colaterais observados para agonistas CB1 e antagonistas TRPV1 sobre a termorregulação corporal;
- Camundongos tratados com LASSBio-1248 duas vezes ao dia durante cinco dias não apresentaram lesões ulcerativas gástricas aparentes;
- LASSBio-1247 administrado por via oral duas vezes ao dia reduz o número de leucócitos totais da articulação de animais com AIA que pode ter sido mediado pela diminuição dos níveis de TNF- α articular, bem como pelo seu efeito antiquimiotático;
- A redução do número de leucócitos totais na articulação e a diminuição dos níveis de TNF- α e PGE₂ podem contribuir para o efeito anti-hipernociceptivo de LASSBio-1247 no modelo de AIA;

Frente ao fato de o desenvolvimento e a manutenção da AR ser dependente da ação de mediadores inflamatórios e de múltiplos eventos celulares, os efeitos sobre a redução da quantidade de TNF- α , PGE₂ e leucócitos totais na articulação de animais com AIA, além do potencial antiquimiotático sobre neutrófilos, apontam para LASSBio-1247 como um protótipo candidato a fármaco anti-inflamatório promissor para o tratamento por via oral de pacientes com AR.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Aarvak, T.; Chabaud, M.; Thoen, J.; Miossec, P.; Natvig, J. B. **Changes in the Th1 or Th2 Cytokine Dominance in the Synovium of Rheumatoid Arthritis (RA): a Kinetic Study of the Th Subsets in One Unusual RA Patient.** *Rheumatology*, v. 39, n. 5, p. 513- 522, 2000.

Abromson, S. B. **Expert Recommendations For NSAIDs Use: a User-Friendly Model?** *Nature Reviews of Rheumatology*, v. 7, p. 133- 134, 2011.

Adcock, J. J. **TRPV1 Receptors in Sensitisation of Cough and Pain Reflexes.** *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, v. 22, n. 2, p. 65- 70, 2009.

Adibhatla, R. M.; Hatcher, J. F. **Phospholipase A2, Reactive Oxygen Species, and Lipid Peroxidation in CNS Pathologies.** *BMB Reports*, v. 41, n. 8, p. 560- 567, 2008.

Agarwal, S. K. **Biologic Agents in Rheumatoid Arthritis: an Update for Managed Care Professionals.** *Journal of Managed Care Pharmacy*, v. 17, n. 9-b, p. S14- S18, 2011.

Aittomäki, S.; Pesu, M. **Therapeutic Targeting of the JAK/STAT Pathway.** *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 114, n. 1, p. 18- 23, 2013.

Aletaha, D.; Neogi, T.; Silman, A. J.; Funovits, J.; Felson, D. T.; Bingham, C. O.; Birnbaum, N. S.; Burmester, G. R.; Bykerk, V. P.; Cohen, M. D.; Combe, B.; Costenbader, K. H.; Dougados, M.; Emery, P.; Ferraccioli, G.; Hazes, J. M.; Hobbs, K.; Huizinga, T. W.; Kavanaugh, A.; Kay, J.; Kvien, T. K.; Laing, T.; Mease, P.; Ménard, H. A.; Moreland, L. W.; Naden, R. L.; Pincus, T.; Smolen, J. S.; Stanislawski-Biernat, E.; Symmons, D.; Tak, P. P.; Upchurch, K. S.; Vencovský, J.; Wolfe, F.; Hawker, G. **2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria: an American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism Collaborative Initiative.** *Arthritis & Rheumatism*, v. 62, n. 9, p. 2569- 2581, 2010.

Andoh, A.; Yasui, H.; Inatomi, O.; Zhang, Z.; Deguchi, Y.; Hata, K.; Araki, Y.; Tsujikawa, T.; Kitoh, K.; Kim-Mitsuyama, S.; Takayanagi, A.; Shimizu, N.; Fujiyama, Y. **Interleukin-17 Augments Tumor Necrosis Factor- α -Induced Granulocyte and Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor Release from Human Colonic Miofibroblasts.** *Journal of Gastroenterology*, v. 40, p. 802- 810, 2005.

Arce, F.; Breckpot, K.; Stephenson, H.; Karwacz, K.; Ehrenstein, M. R.; Collins, M.; Escors, D. **Selective ERK Activation Differentiates Mouse and Human Tolerogenic Dendritic Cells, Expands Antigen-specific Regulatory T Cells and**

Suppresses Experimental Inflammatory Arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, v. 63, n. 1, p. 84- 95, 2011.

Ashwell, J. D. **The Many Paths to p38 Mitogen-activated Protein Kinase Activation in the Immune System.** *Nature Reviews Immunology*, v. 6, p. 532- 540, 2006.

Askenase, P. W. **Mast Cells and Mediation of T-Cell Recruitment in Arthritis.** *The New England Journal of Medicine*, v. 349, n. 13, p. 1294, 2003.

Aterido, A.; Palacio, C.; Marsal, S.; Ávila, G.; Julià, A. **Novel Insights into the Regulatory Architecture of CD4+ T Cells in Rheumatoid Arthritis.** *Plos One*, v. 9, n. 6, e10060, 2014.

Badger, A. M.; Cook, M. N.; Lark, M. W.; Newman-Tarr, T. M.; Swift, B. A.; Nelson, A. H.; Barone, F. C.; Kumar, S. **SB 203580 Inhibits p38 Mitogen-Activated Protein Kinase, Nitric Oxide Production, and Inducible Nitric Oxide Synthase in Bovine Cartilage-Derived Chondrocytes.** *The Journal of Immunology*, v. 161, n. 1, p. 467-473, 1998.

Bainha, M.; Bedini, A.; Spampinato, S. M. **Role of Nociception /Orphanin FQ in Thermoregulation.** *Neuropeptides*, v. 50, p. 51- 56, 2015.

Bak, R. O.; Mikkelsen, J. G. **Regulation of Cytokines by Small RNA During Skin Inflammation.** *Journal of Biomedical Science*, v. 17, p. 53- 71, 2010.

Baldwin, A. S. **The NF-kappa B and I kappa B Proteins: New Discoveries and Insights.** *Annual Review of Immunology*, v.14, p. 649- 683, 1996.

Ban, J. O.; Oh, J. H.; Kim, T. M.; Kim, D. J.; Jeong, H.; Han, S. B.; Hong, J. T. **Anti-inflammatory and Arthritic Effects of Thiocremonobob, a Novel Sulfurcompound Isolated from Garlic Via Inhibition of NF-kB.** *Arthritis Research & Therapy*, v. 11, n. 11, p. R145- R157, 2009.

Barnes, P. J. **How Corticosteroids Control Inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005.** *British Journal of Pharmacology*, v. 148, p. 245- 154, 2006.

Bastos, L. C.; Tonussi, C. R. **PGE(2)-Induced Lasting Nociception to Heat: Evidences for a Selective involvement of A-Delta Fibers in the Hyperpathic Component of Hyperalgesia.** *European Journal of Pain*, v. 14, n. 2, p. 113- 119, 2010.

Basbaum, A. I.; Bautista, D. M.; Scherrer, G.; Julius, D. **Cellular and Molecular Mechanisms of Pain**. *Cell*, v. 139, n. 2, p. 267- 284, 2009.

Baumann, H.; Kushner, I. **Production of Interleukin-6 by Synovial Fibroblasts in Rheumatoid Arthritis**. *American Journal of Pathology*, v. 152, n. 3, p. 641- 644, 1998.

Barnes, P. J.; Adcock, I. M. **Glucocorticoid Resistance in Inflammatory Diseases**. *Lancet*, v. 373, p. 1905- 1917, 2009.

Boettger, M. K.; Hensellek, S.; Richter, F.; Gajda, M.; Stöckigt, R.; von Banchet, G. S.; Bräuer, R.; Schaible, H. **Antinociceptive Effects of Tumor Necrosis Factor α Neutralization in a Rat Model of Antigen-induced Arthritis**. *Arthritis & Rheumatism*, v. 58, n. 8, p. 2368- 2378, 2008.

Boissier, M.; Semerano, L.; Challal, S.; Saldenbergh-Kermanac'h, N.; Falgarone, G. **Rheumatoid Arthritis: From Autoimmunity to Synovitis and Joint Destruction**. *Journal of Immunity*, v. 39, p. 222- 228, 2012.

Bombini, G.; Canetti, C.; Rocha, F. A. C.; Cunha, F. Q. **Tumor Necrosis Factor- α Mediates Neutrophil Migration to the Knee Synovial Cavity During Immune Inflammation**. *European Journal of Pharmacology*, v. 496, p. 197- 204, 2004.

Börner, C.; Bedini, A.; Höllt, V.; Kraus, J. **Analysis of Promoter Regions Regulating Basal and Interleukin-4-Inducible Expression of the Human CB1 Receptor Gene in T Lymphocytes**. *Molecular Pharmacology*, v. 73, n. 3, p. 1013- 1019, 2008.

Brackertz, D.; Mitchell, G. F.; Mackay, I. R. **Antigen-Induced Arthritis in Mice. I. Induction of Arthritis in Various Strains of Mice**. *Arthritis and Rheumatism*, v. 20, n. 3, p. 841- 850, 1977a.

Brackertz, D.; Mitchell, G. F.; Vadas, M. A.; Mackay, I. R.; Miller, J. F. A. P. **Studies on Antigen-Induced Arthritis in Mice. II. Immunologic Correlates of Arthritis Susceptibility in Mice**. *The Journal of Immunology*, v. 118, n. 5, p. 1639- 1644, 1977b.

Brennan, F. M.; Chantry, D.; Jackson, A.; Maini, R.; Feldman, M. **Inhibitory Effect of TNF α Antibodies on Synovial Cell Interleukin-1 Production in Rheumatoid Arthritis**. *The Lancet*, v. 334, n. 8657, p. 244- 247, 1989.

Brennan, F. M.; McInnes, I. B. **Evidence that Cytokines Play a Role in Rheumatoid Arthritis**. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 118, n. 11, p. 3537- 3545, 2008.

Bush, K. A.; Farmer, K. M.; Walker, J. S.; Kirkham, B. W. **Reduction of Joint Inflammation and Bone Erosion in Rat Adjuvant Arthritis by Treatment with Interleukin-17 Receptor IgG1 Fc Fusion Protein.** *Arthritis and Rheumatism*, v. 46, n. 3, p. 802- 805, 2002.

Cadwell, J. R.; Furst, D. E. **The Efficacy and Safety Of Low-dose Corticosteroids For Rheumatoid Arthritis.** *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v. 21, n. 1, p. 1- 11, 1991.

Cañete, J. D.; Pablos, J. L. **Biologic Therapy in Rheumatoid Arthritis.** *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 6, p. 752- 759, 2013.

Carswell, E. A.; Old, L. J.; Kassel, R. L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B. **An Endotoxin-Induced Serum Factor That Causes Necrosis of Tumors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 72, n. 9, p. 3666- 3670, 1975.

Cascão, R.; Rosário, H. S.; Souto-Carneiro, M. M.; Fonseca, J. E. **Neutrophils in Rheumatoid Arthritis: More than Simple Final Effectors.** *Autoimmunity Reviews*, v. 9, p. 531- 535, 2010.

Caterina, M. J.; Leffler, A.; Malmberg, A. B.; Martin, W. J.; Trafton, J.; Petersen-Zeitz, K. R.; Koltzenburg, M.; Basbaum, A. I.; Julius, D. **Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor.** *Science*, v. 288, n. 5464, p. 306- 313, 2000.

Cencioni, M. T.; Chiurchiù, V.; Catanzaro, G.; BorSELLINO, G.; Bernardi, G.; Battistini, L.; Maccarrone, M. **Anandamide Suppresses Proliferation and Cytokine Release from Primary Human T-Lymphocytes Mainly Via CB₂ Receptors.** *Plos One*, v. 5, n. 1, p. e8688, 2010.

Chabaud-Riou, M.; Firestein, G. S. **Expression and Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases-3 and -6 in Rheumatoid Arthritis.** *American Journal of Pathology*, v. 164, n. 1, p. 177- 184, 2004.

Chang, Y.; Lee, S. T.; Lin, W. **Mediator Release From Macrophage: Involvement of Eicosanoids.** *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 81, p. 715- 723, 2001.

Chen, H.; Yu, B.; Lu, C. **The Effect of Intra-articular Injection of Different Concentrations of Ozone on the Level of TNF- α , TNF-R1 and TNF-R2 in Rats with Rheumatoid Arthritis.** *Rheumatology International*, v.33, n. 5, p. 1223-1227, 2013.

Chen, J.; Li, J.; Gao, H.; Wang, C.; Luo, J.; Lv, Z.; Li, X. **Comprehensive Evaluation of Different T-helper Cell Subsets Differentiation and Function in Rheumatoid Arthritis.** *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, v. 2012, p. 535361- 535366, 2012.

Chen, X.; Lu, J.; An, M.; Ma, Z.; Zong, H.; Yang, J. **Anti-inflammatory Effect of Resveratrol on Adjuvant Arthritis Rats with Abnormal Immunological Function Via the Reduction of Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2.** *Molecular Medicine Reports*, v. 9, n. 6, p. 2592- 2598, 2013.

Chen, X.; Sun, W.; Gianaris, N. G.; Riley, A. M.; Cummins, T. R.; Fehrenbacher, J. C.; Obukhov, A. G. **Furanocoumarins Are a Novel Class of Modulators for the Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) Channel.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 14, p. 9600- 9610, 2014.

Cheng, J.; Ji, R. **Intracellular Signaling in Primary Sensory Neurons and Persistent Pain.** *Neurochemical Research*, v. 33, p. 1970- 1978, 2008.

Chermont, G. C.; Kowalski, S. C.; Ciconelli, R. M.; Ferraz, M. B. **Resource Utilization and the Cost of Rheumatoid Arthritis in Brazil.** *Clinical and Experimental Rheumatology*, v. 26, p. 24- 31, 2008.

Choy, E. **Understanding the Dynamics: Pathways Involved in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis.** *Rheumatology*, v. 51, p. v3- v11, 2012.

Claudino, R. F.; Kassuya, C. A. L.; Ferreira, J.; Calixto, J. B. **Pharmacological and Molecular Characterization of the Mechanisms Involved in Prostaglandin E2-Induced Mouse Paw Edema.** *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 318, n. 2, p. 611- 618, 2006.

Cook, A. D.; Pobjoy, J.; Steidl, S.; Dürr, M.; Braine, E. L.; Turner, A. L.; Lacey, D. C.; Hamilton, J. A. **Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Is a Key Mediator in Experimental Osteoarthritis Pain and Disease Development.** *Arthritis Research & Therapy*, v. 14, n. 5, p. R199, 2012.

Cook, A. D.; Turner, A. L.; Braine, E. L.; Pobjoy, J.; Lenzo, J. C.; Hamilton, J. A. **Regulation of Systemic and Local Myeloid Cell Subpopulations by Bone Marrow Cell-Derived Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Experimental Inflammatory Arthritis.** *Arthritis & Rheumatism*, v. 63, n. 8, p. 2340- 2351, 2011.

Cope, A. P.; Aderka, D.; Doherty, M.; Engelmann, H.; Gibbons, D.; Jones, A. C.; Brennan, F. M.; Maini, R. N.; Wallach, D.; Feldmann, M. **Increased Levels of Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors in the Sera and Synovial Fluid of Patients with Rheumatic Diseases.** *Arthritis and Rheumatism*, v. 35, n. 10, p. 1160- 1169, 1992.

Costa, B.; Bettoni, I.; Petrosino, S.; Comelli, F.; Giagnoni, G.; Marzo, V. D. **The Dual Fatty Acid Amide Hydrolase/TRPV1 Blocker, N-Arachidonoyl-Serotonin, Relieves Carragenan-Induced Inflammation and Hyperalgesia in Mice.** *Pharmacological Research*, v. 61, p. 537- 546, 2010.

Costa, J.; Pinto-Gouveia, J.; Marôco, J. **Pain Related Catastrophizing on Physical Limitation in Rheumatoid Arthritis Patients. Is Acceptance Important?** *Spanish Journal of Psychology*, v. 17, n. e31, p. 1- 13, 2014.

Costenbader, K. H.; Feskanich, D.; Mandl, L. A.; Karlson, E. W. **Smoking Intensity, Duration, and Cessation, and the Risk of Rheumatoid Arthritis in Women.** *The American Journal of Medicine*, v. 119, n. 6, p. 503.e1- 503.e9, 2006.

Cruz, C. D.; Neto, F. L.; Castro-Lopes, J.; McMahon, S. B.; Cruz, F. **Inhibition of ERK Phosphorylation Decreases Nociceptive Behavior in Monoarthritic Rats.** *Pain*, v. 116, p. 411- 419, 2005.

Cunha, A. C.; Figueiredo, J. M.; Tributino, J. L. M.; Miranda, A. L. P.; Castro, H. C.; Zingali, R. B.; Fraga, C. A. M.; de Souza, M. C. B. V.; Ferreira, V. F.; Barreiro, E. J. **Antiplatelet Properties of Novel N-Substituted-Phenyl-1, 2, 3-Triazole-4-Acylhydrazone Derivatives.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 11, p. 2051- 2059, 2003.

Cunha, T. M.; Verri Jr., W. A.; Schivo, I. R.; Napimoga, M. H.; Parada, C. A.; Poole, S.; Teixeira M. M.; Ferreira, S. H.; Cunha, F. Q. **Crucial Role of Neutrophils in the Development of Mechanical Inflammatory Hypernociception.** *Journal of Leukocyte Biology*, v. 83, p. 824- 832, 2008a.

Cunha, T. M.; Verri Jr., W. A.; Valério, D. A.; Guerreiro, A. T.; Nogueira, L. G.; Vieira, S. M.; Souza, D. G.; Teixeira, M. M.; Poole, S. Ferreira, S. H.; Cunha, F. Q. **Role of Cytokines in Mediating Mechanical Hypernociception in a Model of Delayed-type Hypersensitivity in Mice.** *European Journal of Pain*, v. 12, p. 1059-1068, 2008b.

Curtis, J. R.; Singh, J. A. **Use of Biologics in Rheumatoid Arthritis: Current and Emerging Paradigms of Care.** *Clinical Therapeutics*, v. 33, n. 6, p. 679- 707, 2011.

Czeschik, J. C.; Hagenacker, T.; Schäfers, M.; Büsselberg, D. **TNF- α Differentially Modulates ion Channels of Nociceptive Neurons.** Neuroscience Letters, V. 434, p. 293- 298, 2008.

Damjanov, N.; Kauffman, R. S.; Spencer-Green, G. T. **Efficacy, Pharmacodynamics, and Safety of VX-702, a Novel p38 MAPK Inhibitor, in Rheumatoid Arthritis.** Arthritis & Rheumatism, v. 60, n. 5, p. 1232- 1241, 2009.

Davidson, S.; Copits, B. A.; Zhang, J.; Page, G.; Ghetti, A.; Gereau, R. W. **Human Sensory Neurons: Membrane Properties and Sensitization by Inflammatory Mediators.** Pain, v. 155, n. 9, p. 1861- 1870, 2014.

Dayer, J.-M. **The Pivotal Role of Interleukin-1 in the Clinical Manifestations of Rheumatoid Arthritis.** Rheumatology, v. 42, n. suplem. 2, p. ii3- ii10, 2003.

Dayer, J.-M.; Beutler, B.; Cerami, A. **Cachectin/Tumor Necrosis Factor Stimulates Collagenase and Prostaglandin E2 Production by Human Synovial Cells and Dermal Fibroblasts.** The Journal of Experimental Medicine, v. 162, n. 2, p. 2163- 2168, 1985.

Dayer, J.-M.; Choy, E. **Therapeutic Targets in Rheumatoid Arthritis: the Interleukin-6 Receptor.** Rheumatology, v. 49, p. 15- 24, 2010.

Delves, P. J.; Martin, S. J.; Burton, D. R.; Roitt, I. M. **Produção de Efetores.** Fundamentos de Imunologia, Editora Guanabara Koogan, 12ª ed., p. 237; 239; 518, 2011.

De Punder, Y. M.; van Riel, P. L. **Rheumatoid Arthritis: Understanding Joint Damage and Physical Disability in RA.** Nature Reviews Rheumatology, v. 7, n. 5, p. 260- 261, 2011.

Dodeller, F.; Schulze-Koops, H. **The p38 Mitogen-activated Protein Kinase Cascade in CD4 T Cells.** Arthritis Research & Therapy, v. 8, p. 205- 215, 2006.

Dolgin, E. **Companies hope For Kinase Inhibitor JAKpot.** Nature Reviews Drug Discovery, v. 10, p. 717-718, 2011.

Doyle, T.; Chen, Z.; Muscoli, C.; Obeid, L. M.; Salvemini, D. **Intraplantar-Injection Ceramide in Rats Induces Hyperalgesia through an NF- κ B and p38 Kinase-**

Dependent Cyclooxygenase2/Prostaglandin E2 Pathway. FASEB journal, v. 25, n. 8, p. 2782- 2791, 2011.

Ea, H.; Uzan, B.; Rey, C.; Lioté, F. **Octacalcium Phosphate Crystals Directly Stimulate Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase Through p38 and JNK Mitogen-Activated Protein Kinases in Articular Chondrocytes.** Arthritis Research & Therapy, v. 7, p. R915- R926, 2005.

Eidi, H.; Joubert, O.; Attik, G.; Duval, R. E.; Bottin M. C.; Hamouia, A.; Maincent, P.; Rihn, B. H. **Citotoxicity Assessment of Heparin Nanoparticles in NR8383 Macrophages.** International Journal of Pharmaceutics, v. 396, p.156- 165, 2010.

Elliott, M. J.; Maini, R. N.; Feldman, M.; Kalden, J. R.; Antoni, C.; Smolen, J. S.; Leeb, B.; Breedveld, F. C.; Macfarlane, J. D.; Bijl, H.; Woody, J. N. **Randomised Double-Bind Comparison of Chimeric Monoclonal Antibody to Tumor Necrosis Factor α (cA2) Versus Placebo in Rheumatoid Arthritis.** The Lancet, v. 344, p. 1105- 1110, 1994.

Eriksson, C.; Rantapää-Dahlqvist, S.; Sundqvist, K. G. **Changes in Chemokines and Their Receptors in Blood During Treatment with the TNF Inhibitor Infliximab in Patients with Rheumatoid Arthritis.** Scandinavian Journal of Rheumatology, v. 42, n. 4, p. 260- 265, 2013.

Eriksson, J. K.; Johansson, K.; Askling, J.; Neovius, M. **Costs for Hospital Care, Drugs and Lost Work Days in Incident and Prevalent Rheumatoid Arthritis: How Large, and How Are They Distributed?** Annals of the Rheumatic Diseases, v. X, doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204080, 2013.

Fan, Y.; Mao, R.; Yang, J. **NF- κ B and STAT3 Signaling Pathways Collaboratively Link Inflammation to Cancer.** Protein Cell, v. 4, n. 3, p. 176- 185, 2013.

Farquhar-Smith, W. P. **Anatomy, Physiology and Pharmacology of Pain.** Anesthesia and Intensive Care Medicine, v. 9, n. 1, p. 3- 7, 2007.

Fattahi, M. J.; Mirshafiey, A. **Prostaglandins and Rheumatoid Arthritis.** Arthritis, doi: 10.1155/2012/239310, 2012.

Feldman, A. M.; Combes, A.; Wagner, D.; Kadakomi, T.; Kubota, T.; Li, Y. Y.; McTiernan, C. **The Role of Tumor Necrosis Factor in the Pathophysiology of Heart Failure.** Journal of the American College of Cardiology, v. 35, n. 3, p. 537- 544, 2000.

Feldmann, M.; Brennan, F. M.; Maini, R. N. **Rheumatoid Arthritis**. *The Cell*, v. 85, p. 307- 310, 1996.

Feldman, M. **Development of Anti-TNF Therapy for Rheumatoid Arthritis**. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, p. 364-371, 2002.

Fierro, I. M.; Colgan, S. P.; Bernasconi, G.; Petasis, N. A.; Clish, C. B.; Arita, M.; Serhan, C. N. **Lipoxin A4 and Aspirin-Triggered 15-epi-Lipoxin A4 Inhibit Human Neutrophil Migration: Comparisons between Synthetic 15 Epimers in Chemotaxis and Transmigration with Microvessel Endothelial Cells and Epithelial Cells**. *The Journal of Immunology*, v. 170, n. 5, p. 2688-2694, 2003.

Firestein, G. S.; Manning, A. M. **Signal Transduction and Transcription Factors in Rheumatic Disease**. *Arthritis and Rheumatism*, v. 42, n. 4, p. 609- 621, 1999.

Fleischmann, R. **Don't Forget Traditional DMARDs**. *Rheumatology*, v. 50, p. 429-430, 2011.

Fleischmann, R.; Cutolo, M.; Genovese, M. C.; Lee, E. B.; Kanik, K. S.; Connel, C. A.; Gruben, D.; Krishnaswami, S.; Wallenstein, G.; Wilkinson, B. E.; Zwillich, S. H. **Phase IIb Dose-Ranging Study Of the Oral JAK inhibitor Tofacitinib (CP-690,550) or Adalimumab Monotherapy Versus Placebo in Patients With Active Rheumatoid Arthritis With an Inadequate Response to Disease-Modifying Antirheumatic Drugs**. *Arthritis and Rheumatism*, v. 64, n. 3, p. 617, 2012b.

Fleischmann, R.; Kremer, J.; Cush, J.; Schulze-Koops, H.; Connel, C. A.; Bradley, J. D.; Gruben, D.; Wallenstein, G. V.; Zwillich, S. H.; Kanik, K. S. **Placebo-Controlled Trial of Tofacitinib Monotherapy in Rheumatoid Arthritis**. *The New England Journal of Medicine*, v. 367, n. 6, p. 495, 2012a.

Folco, G.; Murphy, R. C. **Eicosanoid Transcellular Biosynthesis: From Cell-Cell Interactions to in Vivo Tissue Responses**. *Pharmacological Reviews*, v. 58, n. 3, p. 375- 388, 2006.

Folwer, C. J.; Holt, S.; Tiger, G. **Acidic Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Inhibit Rat Brain Fatty Acid Amide Hydrolase in pH-dependent Manner**. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 1, p. 55- 58, 2003.

Font-Nieves, M.; Sans-Fons, M. G.; Gorina, R.; Bonfill-Teixidor, E.; Salas-Pérdomo, A.; Márquez-Kisinousky, L.; Santalucia, T.; Planas, A. M. **Induction of COX-2 Enzyme and Down-regulation of COX-1 Expression by Lipopolysaccharide (LPS) Control**

Prostaglandin E₂ Production in Astrocytes. The Journal of Biological Chemistry, v. 287, n. 9, p. 6454- 6468, 2012.

Fournier, C. **Where Do T Cells Stand in Rheumatoid Arthritis?** Joint Bone Spine, v. 72, n. 6, p. 527- 532, 2005.

Futosi, K.; Fodor, S.; Mócsai, A. **Neutrophil Cell Surface Receptors and Their Intracellular Signal Transduction Pathways.** International Immunopharmacology, v. 17, n. 3, p. 638- 650, 2013.

Gadina, M. **Janus Kinase: an Ideal Target for the Treatment of Autoimmune Diseases.** Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, v. 16, n. 1, p. S70- S72, 2013.

Gavva, N. R.; Treanor, J. J. S.; Garami, A.; Fang, L.; Surapaneni, S.; Akrami, A.; Alvarez, F.; Bak, A.; Darling, M.; Gore, A.; Jang, G. R.; Kessler, J. P.; Ni, L.; Norman, M. H.; Palluconi, G.; Rose, M. J.; Salfi, M.; Tan, E.; Romanovsky, A. A.; Banfield, C.; Davar, G. **Pharmacological Blockade of the Vanilloid Receptor TRPV1 Elicits Marked Hyperthermia in Humans.** Pain, v. 136, n. 1-2, p. 202- 210, 2008.

Germain, N.; Boichot, E.; Advenier, C.; Berdyshev, E. V.; Lagente, V. **Effect of the Cannabinoid Receptor Ligand, WIN 55,212-2, on Superoxide Anion and TNF- α Production by Human Mononuclear Cells.** International Immunopharmacology, v. 2, n. 4, p. 537- 543, 2002.

Goldstein, D. M.; Kuglstatler, A.; Lou, Y.; Soth, m. J. **Selective p38 α Inhibitors Clinically Evaluated for the Treatment of Chronic Inflammatory Disorders.** Journal of Medicinal Chemistry, v. 53, p. 2345- 2353, 2010.

Graham, E. S.; Ashton, J. C. **Cannabinoid Receptors: a Brief History and “What’s Hot”.** Frontiers in Bioscience, v. 1, n. 14, p. 944- 957, 2009.

Grassi, W.; Angelis, R. D.; Lamanna, G.; Cervini, C. **The Clinical Features of Rheumatoid Arthritis.** European Journal of Radiology, v. 27, sup. 1, p. S18- S24, 1998.

Guha, M.; Mackman, N. **LPS Induction of Gene Expression in Human Monocytes.** Cellular signaling, v. 13, p. 85- 94, 2001.

Gui, H.; Liu, X.; Wang, Z.; He, D.; Su, D.; Dai, S. **Expression of Cannabinoid Receptor 2 and Its Inhibitory Effects on Synovial Fibroblasts in Rheumatoid Arthritis.** *Rheumatology*, v. 53, n. 5, p. 802- 809, 2014.

Hagenacker, T.; Czeschik, J. C.; Schäfers, M.; Büsselberg, D. **Sensitization of Voltage Activated Calcium Channel Currents for Capsaicin in Nociceptive Neurons by Tumor-necrosis-factor- α .** *Brain Research Bulletin*, v. 81, p. 157- 163, 2010.

Hale, K. K.; Trollinger, D.; Rihaneck, M.; Manthey, C. L. **Differential Expression and Activation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase α , β , γ and δ in Inflammatory Cell Lineages.** *Journal of Immunology*, v. 162, n. 7, p.4246- 4252, 1999.

Han, J.; Lee, J. –D.; Bibbs, L.; Ulevich, R. J. **A MAP Kinase Target by Endotoxin and Hyperosmolarity in Mammalian Cells.** *Science*, v. 265, p. 808- 810, 1994.

Han, S.; Thatte, J.; Buzard, D. J.; Jones, R. M. **Therapeutic Utility of Cannabinoid Receptor Type 2 (CB₂) Selective Agonists.** *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 56, n. 21, p. 8224- 8256, 2013.

Han, Z.; Boyle, D. L.; Chang, L.; Bennett, B.; Karin, M.; Yang, L.; Manning, A. M.; Firestein, G. S. **c-Jun N-Terminal Kinase Is Required for Metalloproteinase Expression and Joint Destruction in Inflammatory Arthritis.** *The Journal of Clinical Investigation*, v. 108, n. 1, p. 73- 81, 2001.

Handa, R.; Shankar, S. **Biological Agents in Rheumatoid Arthritis.** *Journal of Postgraduate Medicine*, v. 50, n. 4, p. 293- 299, 2004.

Handel, M. L.; McMorrow, L. B.; Gravallesse, E. M. **Nuclear Factor- κ B in Rheumatoid Synovium.** *Arthritis & Rheumatism*, v. 38, n. 12, p. 1762- 1770, 1995.

Haque, M.; Fino, K.; Lei, F.; Xiong, X.; Song, J. **Utilizing Regulatory T Cells against Rheumatoid Arthritis.** *Frontiers in Oncology*, v. 4, p. 209- 218, 2014.

Heit, B.; Liu, L.; Colarusso, P.; Puri, K. D.; Kubes, P. **PI3K Accelerates, But Is Not Required for, Neutrophil Chemotaxis to fMLP.** *Journal of Cell Science*, v. 121, n. Pt 2, p. 205- 214, 2008.

Hench, P. **Effects of Cortisone in the Rheumatic Diseases.** *The Lancet*, v. 2, p. 483- 484, 1950.

Hess, A.; Axmann, R.; Rech, J.; Finzel, S.; Heindl, C.; Kreitz, S.; Sergeeva, M.; Saake, M.; Garcia, M.; Kollias, G.; Straub, R. H.; Sporns, O.; Doerfler, A.; Brune, K.; Schett, G. **Blockade of TNF- α Rapidly Inhibits Pain Responses in the Central Nervous System.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 108, n. 9, p. 3731- 3736, 2011.

Hoes, J. N.; Jacobs, J. W. G.; Buttgereit, F.; Bijlsma, J. W. J. **Current View Of Glucocorticoid Co-therapy With DMARDs In Rheumatoid Arthritis.** Nature Reviews of Rheumatology, v. 6, p. 693- 702, 2010.

Hoffmeister, R. T. **Methotrexate Therapy in Rheumatoid Arthritis: 15 Years Experience.** The American Journal of Medicine, v. 75, n. 6A, p. 69- 73, 1983.

Hot, A.; Zrioual, S.; Toh, M.; Lenief, V.; Miossec, P. **IL-17A-Versus IL-17F-Induced Intracellular Signal Transduction Pathways and Modulation by IL-17RA and IL-17RC RNA Interference in Rheumatoid Synoviocytes.** Annals of the Rheumatic Diseases, v. 70, n. 2, p. 341- 348, 2011.

Huang, J.; Ding, L.; Shi, D.; Hu, J.; Zhu, Q.; Gao, S.; Qiu, L. **Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Participates in the Inhibitory Effect of Ginsenoside Rg1 on Capsaicin-Induced Interleukin-8 and Prostaglandin E₂ Production in HaCat Cells.** Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 64, n. 2, p. 252- 258, 2012.

Huscher, D.; Thiele, K.; Gromnica-Ihle, E.; Demary, W.; Dreher, R.; Zink, A.; Buttgereit, F. **Dose-related Patterns of Glucocorticoid-induced Side Effects.** Annals of the Rheumatic Diseases, v. 68, n. 7, p. 1119- 1124, 2009.

Inglis, J. J.; Nissim, A.; Lees, D. M.; Hunt, S. P.; Chernajovsky, Y.; Kidd, B. L. **The differential Contribution of Tumor Necrosis Factor to Thermal and Mechanical Hyperalgesia During Chronic Inflammation.** Arthritis Research & Therapy, v. 7, n. 4, p. R807- R816, 2005.

Inoue, T.; Hammaker, D.; Boyle, D. L.; Firestein, G. S. **Regulation of JNK by MKK-7 in Fibroblast-like Synoviocytes.** Arthritis & Rheumatism, v. 54, n. 7, p. 2127- 2135, 2006.

Issekutz, A. C.; Meager, A.; Otterness, I.; Issekutz, T. B. **The Role of Tumor Necrosis Factor-Alpha and IL-1 in Polymorphonuclear Leucocyte and T Lymphocyte Recruitment to Joint Inflammation in Adjuvant Arthritis.** Clinical and Experimental Immunology, v. 97, n. 1, p. 26- 32, 1994.

Jara-Oseguera, A.; Simon, S. A.; Rosenbaum, T. **TRPV1: on the Road to pain Relief.** *Current Molecular Pharmacology*, v. 1, n. 3, p. 255- 269, 2008.

Jeffrey, K.T.; Camps, M.; Rommel, C.; Mackay, C. R. **Targeting Dual- Specificity Phosphatases: Manipulating MAP Kinase Signaling and Immune Responses.** *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 6, p. 391- 403, 2007.

Jenkins, B. J. **Transcriptional Regulation of Pattern Recognition Receptors by JAK/STAT, and the Implications for Disease Pathogenesis.** *Journal of Interferon & Cytokine Research*, v. 34, n. 10, p. 750- 758, 2014.

Jensen, E. C. **The Basics of Western Blot.** *The Anatomical Record*, v. 295, p. 369- 371, 2012.

Ji, R.; Gereau IV, R. W.; Malcangio, M.; Strichartz, G. R. **MAP Kinase and Pain.** *Brain Research Reviews*, v. 60, n. 1, p. 135- 148, 2009.

Ji, R.; Samad, T. A.; Jin, S.; Schmoll, R.; Woolf, C. J. **p38 MAPK Activation by NGF in Primary Sensory Neurons after Inflammation Increases TRPV1 Levels and Maintains Heat Hyperalgesia.** *Neuron*, v. 36, p. 57- 68, 2002.

Jovanovic, D. V.; Di Batista, J. A.; Martel-Pelletier, J.; Reboul, P.; He, Y.; Jolicoeur, F. C.; Pelletier, J. P. **Modulation of TIMP-1 Synthesis by Anti-inflammatory Cytokines and Prostaglandin E2 in Interleukin 17 Stimulated Human Monocytes/Macrophages.** *Journal of Rheumatology*, v. 28, n. 4, p. 712- 718, 2001.

Julius, D.; Basbaum, A. I. **Molecular Mechanisms of Nociception.** *Nature*, v. 413, p. 203- 210, 2001.

Kalla, A. A.; Tikly, M. **Rheumatoid Arthritis in Development World.** *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, v. 17, n. 5, p. 863- 875, 2003.

Kaminska, B.; Swiatek-Machado, K. **Targeting Signaling Pathways with Small Molecules to Treat Autoimmune Disorders.** *Expert Reviews of Clinical Immunology*, v. 4, n. 1, p. 93- 112, 2008.

Karsdal, M. A.; Woodworth, T.; Henriksen, K.; Maksymowych, W. P.; Genant, H.; Vergnaud, P.; Christiansen, C.; Schubert, T.; Qvist, P.; Schett, G.; Platt, A.; Bay-Jensen, A. **Biochemical Markers of Ongoing Joint Damage in Rheumatoid**

Arthritis- Current and Future Applications, Limitations and Opportunities. Arthritis Research and Therapy, v. 13, p. 215- 234, 2011.

Kavanaugh, A. **Guidelines for RA Therapy-Avoiding Hamartia.** Nature Reviews of Rheumatology, v. 6, p. 505- 506, 2010.

Keffer, J.; Probert, L.; Cazlaris, H.; Georgopoulos, S.; Kaslaris, E.; Kioussis, D.; Kollias, G. **Transgenic Mice Expressing Human Tumor Necrosis Factor: a Predictive Genetic Model of Arthritis.** The EMBO Journal, v. 10, n. 13, p. 4025- 4031, 1991.

Khandpur, R.; Carmona-Rivera, C.; Vivekanandan-Giri, A.; Gizinski, A.; Yalavarthi, S.; Knight, J. S.; Friday, S.; Li, S.; Patel, R. M.; Subramanian, V.; Thompson, P.; Chen, P.; Fox, D. A.; Pennathur, S.; Kaplan, M. J. **NETs Are a Source of Citrullinated Autoantigens and Stimulate Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis.** Science Translational Medicine, v. 5, p. 178ra40, 178ra49, 2013.

Kinne, R. W.; Bräuer, R.; Stuhlmüller, B.; Palombo-Kinne, E.; Burmester, G. **Macrophages in Rheumatoid Arthritis.** Arthritis Research, v. 2, p. 189-202, 2000.

Kirwan, J. R.; Bijlsma, J. W. J.; Boers, M.; Shea, B. **Effects of Glucocorticoids On Radiological Progression In Rheumatoid Arthritis (Review).** The Cochrane Database of Systemic Reviews, v. 24, n. 1, p. 1- 80 (CD006356), 2007.

Kirwan, J. R. **The Effect of Glucocorticoids On Joint Destruction In Rheumatoid Arthritis.** The New England Journal of Medicine, v. 333, n. 3, p. 142- 146, 1995.

Kirwan, J. R.; Bijlsma, J. W. J.; Boers, M.; Shea, B. **Effects of Glucocorticoids On Radiological Progression In Rheumatoid Arthritis (Review).** The Cochrane Database of Systemic Reviews, v. 24, n. 1, p. 1- 80 (CD006356), 2007.

Klasen, I. S.; Donselaar, I. G.; Ladestein, R. M. T.; van den Berg, W. B.; Benner, R. **Joint Inflammations and Flare-up Reactions in Mice Induced by a Helper T Cell Clone.** Agents and Actions, v. 19, n. 5/6, p. 331- 334, 1986.

Klasen, I. S.; Ladestein, R. M. T.; van den Berg, W. B.; Benner, R. **Requeriments for Flare Reactions of Joint Inflammation Induced in Mice by Cloned MT4+, Lyt-2-T Cells.** Arthritis and Rheumatism, v. 32, n. 3, p. 330- 337, 1989.

Kleyer, A.; Schett, G. **Arthritis and Bone Loss: a Hen and Egg Story.** Arthritis and Bone Loss, v.26, n. 1, p. 80- 84, 2014.

Kobayashi, T.; Yokoyama, T.; Ito, S.; Kobayashi, D.; Yamagata, A.; Okada, M.; Oofusa, K.; Narita, I.; Murasawa, A.; Nakazono, K.; Yoshie, H. **Periodontal and Serum Protein Profiles in Patients with Rheumatoid Arthritis Related with Tumor Necrosis Factor Inhibitor Adalimumab.** *Journal of Periodontology*, v. 85, n. 11, p. 1480- 1488, 2014.

Kocijan, R.; Harre, U.; Schett, G. **ACPA and Bone Loss in Rheumatoid Arthritis.** *Current Rheumatology Reports*, v. 15, n. 10, p. 366- 370, 2013.

Kock, A. E. **Chemokines and Their Receptors in Rheumatoid Arthritis Future Targets?** *Arthritis & Rheumatism*, v. 52, n. 3, p. 710- 721, 2005.

Kong, T.; Zhang, C.; Liu, Z. **Recent Developments of p38 α MAPK Inhibitors As Anti-inflammatory Agents Based on the Imidazole Scaffolds.** *Currents Medical Chemistry*, v. 20, p. 1997- 2016, 2013.

König, C.; Zharsky, M.; Möller, C.; Schaible, H.; Ebersberger, A. **Involvement of Peripheral and Spinal Tumor Necrosis Factor α in Spinal Cord Hyperexcitability during Knee Joint Inflammation in Rats.** *Arthritis & Rheumatology*, v. 66, n. 3, p. 599- 609, 2014.

Korbecki, J.; Baranowska-Bosiacka, I.; Gutowska, I.; Chlubek, D. **The Effect of Reactive Oxygen Species on the Synthesis of Prostanoids from Arachidonic Acid.** *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 64, n. 4, p. 409- 421, 2013.

Kosaka, T.; Miyata, A.; Ihara, H.; Hara, S.; Sugimoto, T.; Takeda, O.; Takahashi, E.; Tanabe, T. **Characterization of the Human Gene (PTGS2) Encoding Prostaglandin-endoperoxide Synthase 2.** *European Journal of Biochemistry*, v. 221, p. 889- 897, 1994.

Krauser, D.; Schleusser, B.; Herborn, G.; Rau, R. **Response to Methotrexate Treatment Is Associated with Reduced Mortality in Patients with Severe Rheumatoid Arthritis.** *Arthritis & Rheumatism*, v. 43, n. 1, p. 14- 21, 2000.

Kremer, J. M.; Cohen, S.; Wilkinson, B. E.; Connell, C. A.; French, J.L.; Gomez-Reino, J.; Gruben, D.; Kanik, K. S.; Krishnaswami, S.; Pascual-Ramos, V.; Wallenstein, G.; Zwillich, S. H. **A Phase IIb Dose-Ranging Study of The Oral JAK Inhibitor Tofacitinib (CP-690,550) Versus Placebo In Combination With Background Methotrexate in Patients With Active Rheumatoid Arthritis and an Inadequate Response To Methotrexate Alone.** *Arthritis & Rheumatism*, v. 64, n. 4, p. 970-981, 2012.

Kriegler, M.; Perez, C.; DeFay, K.; Albert, I.; Lu, S. D. **A Novel Form of TNF/Cachectin Is a Cell Surface Cytotoxic Transmembrane Protein: Ramifications for the Complex Physiology of TNF.** *Cell*, v. 53, p. 45- 53, 1988.

Kumar, S.; Boehm, J.; Lee, J. C. **p38 MAP Kinases: Key Signaling Molecules as Therapeutic Targets for Inflammatory disease.** *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 2, p. 717- 726, 2003.

Küper, C.; Beck, F. X.; Neuhofer, W. **Toll-like Receptor 4 Activates NF- κ B and MAP Kinase pathways to Regulate Expression of Proinflammatory COX-2 in Renal Medullary collecting Duct Cells.** *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, v. 302, n. 1, p. F38- F46, 2012.

Kuriya, B.; Cheng, C. K.; Chen, H. M.; Bykerk, V. P. **Validation of a Prediction Rule for Development of Rheumatoid Arthritis in Patients with Early Undifferentiated Arthritis.** *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 68, n. 9, p. 1482- 1485, 2009.

Lacerda, Daniel. **Avaliação Farmacológica de Novos Derivados 6-Nitro-Benzodioxola-N-Acildrazônicos Candidatos a Protótipos de Fármacos Antinociceptivos e Anti-inflamatórios.** 2006. 42- 43 fls. Dissertação (mestrado em ciências biológicas (farmacologia))– Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

Lavich, T. R.; Cordeiro, R. S. B.; Silva, P. M. R.; Martins, M. A. **A Novel Hot-plate Test Sensitive to hyperalgesic Stimuli and Non-opioid Analgesic.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 38, p. 445- 451, 2005.

Lee, D. M.; Weinblatt, M. E. **Rheumatoid Arthritis.** *The Lancet*, v. 358, p. 903- 911, 2001.

Lee, Y. C. **Effect and Treatment of Chronic Pain in Inflammatory Arthritis.** *Current Rheumatology Reports*, v. 15, n. 1, p. 300- 307, 2013.

Lee, J. C.; Laydon, J. T.; McDonnell, P. C.; Gallagher, T. F.; Kumar, S.; Green, D.; McNulty, D.; Blumenthal, M. J.; Keys, J. R.; Land vatter, S. W.; Strickler, J. E.; McLaughlin, M. M.; Siemens, I. R.; Fisher, S. M.; Livi, G. P.; White, J. R.; Adams, J. L.; Young, P. R. **A Protein Kinase Involved in the Regulation of Inflammatory Cytokine Biosynthesis.** *Nature*, v. 372, p. 739- 746, 1994.

Lee, K.; Kang, B.; Lee, H.; Son, S.; Hwang, S.; Kim, D.; Park, J.; Cho, H. **Spinal NF- κ B Activation Induces COX-2 Upregulation and Contributes to Inflammatory Pain Hypersensitivity.** *European Journal of Neuroscience*, v. 19, p. 3375- 3381, 2004.

Lee, S.; Boyle, D. L.; Berdeja, A.; Firestein, G. S. **Regulation of Inflammatory Arthritis by the Upstream Kinase Mitogen Activated Protein Kinase Kinase 7 in the c-Jun N-Terminal Kinase Pathway.** *Arthritis Research & Therapy*, v. 14, n. 1, p. R38- R46, 2012.

Leench, M. T.; Morand, E. F. **Fibroblasts and Synovial Immunity.** *Current Opinion in Pharmacology*, v. 13, p. 565- 569, 2013.

Leonard, W. J.; O'Shea, J. J. **Jaks and STATs: Biological Implications.** *Annual Review of Immunology*, v. 16, p. 293- 322, 1998.

Levy, D. E.; Darnell Jr, J. E. **STATs: Transcriptional Control and Biological Impact.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 3, n. 9, p. 651- 662, 2002.

Li, P.; Sanz, I.; O'Keefe, R. J.; Schwarz, E. M. **NF- κ B Regulates VCAM-1 Expression on Fibroblast-Like Synoviocytes.** *Journal of Immunology*, v. 164, n. 11, p. 5990-5997, 2000.

Lima, C. K. F.; Silva, R. M.; Lacerda, R. B.; Santos, B. L. R.; Silva, R. V.; Amaral, L. S.; Quintas, L. E. M.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J.; Guimaraes, M. Z. P.; Miranda, A. L. P. **LASSBio-1135: a Dual TRPV1 Antagonist and Anti-TNF-Alpha Compound Orally Effective in Models of Inflammatory and Neuropathic Pain.** *Plos One*, v. 9, n. 6, p. e99510, 2014.

Lin, J.; Zhou, Z.; Huo, R.; Xiao, L.; Ouyang, G.; Wang, L.; Sun, Y.; Shen, B.; Li, D.; Li, N. **Cyr61 Induces Il-6 Production by Fibroblast-Like Synoviocytes Promoting Th17 Differentiation in Rheumatoid Arthritis.** *The Journal of Immunology*, v. 188, n. 11, p. 5776- 5784, 2012.

Lin, J.; Ziring, D.; Desai, S.; Kim, S.; Wong, M.; Korin, Y.; Braun, J.; Reed, E.; Gjertson, D.; Singh, R. R. **TNF α Blockade in Human Diseases: An Overview of Efficacy and Safety.** *Clinical Immunology*, v. 126, p. 13- 30, 2008.

Lichtman, A. H.; Blankman, J. L.; Cravatt, B. F. **Endocannabinoid Overload.** *Molecular Pharmacology*, v. 78, n. 6, p. 993- 995, 2010.

Lubberts, E.; Koenders, M. I.; van den Berg, W. B. **The Role of T Cell Interleukin-17 in Conducting Destructive Arthritis: Lessons from Animal Models.** *Arthritis Research and Therapy*, V. 7, n. 1, p. 29- 37, 2005.

Lundkvist, J.; Kastäng, F.; Kobelt, G. **The Burden of Rheumatoid Arthritis and Access to Treatment: Health Burden and Costs.** *The European Journal of Health Economics*, v. 8, suplemento, 2, p. S49- S60, 2008.

Luo, J.; Zhao, X.; Xu, W.; Zhao, X.; Wang, J.; Lin, X.; Sun, T.; Fu, Z. **Activation of Spinal NF- κ B/p65 Contributes to Peripheral Inflammation and Hyperalgesia in Rat Adjuvant-Induced Arthritis.** *Arthritis and Rheumatism*, v. 66, n. 4, p. 896- 906, 2014.

Machold, K. P.; Stamm, T. A.; Eberl, G. J. M.; Nell, V. K. P.; Dunky, A.; Uffmann, M.; Smolen, J. S. **Very Recent Onset Arthritis- Clinical, Laboratory, and Radiological Findings During the First Year of Disease.** *The Journal of Rheumatoid*, v. 29, n. 11, p. 2278- 2287, 2002.

MacPhee, D. J. **Methodological Considerations for Improving Western Blot Analysis.** *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 61, p. 171-177, 2010.

Malan Jr., T. P.; Ibrahim, M. M.; Deng, H.; Liu, Q.; Mata, H. P.; Vanderah, T.; Porreca, F.; Makriyannis, A. **CB2 Cannabinoid Receptor-mediated Peripheral Antinociception.** *Pain*, v. 93, p. 239- 245, 2001.

Malysheva, O. A.; Wahle, M.; Wagner, U.; Pierer, M.; Arnold, S.; Häntzschel, H.; Baerwald, C. G. O. **Low-Dose Prednisolone In Rheumatoid Arthritis: Adverse Effects Of Various Disease Modifying Antirheumatic Drugs.** *The Journal of Rheumatology*, v. 35, p. 979- 985, 2008.

Marchand, F.; Perretti, M.; McMahon, S. B. **Role of the Immune System in Chronic Pain.** *Nature Reviews of Neuroscience*, v. 6, p. 521- 532, 2005.

Massi, P.; Vaccani, A.; Parolaro, D. **Cannabinoid, Immune System and Cytokine Network.** *Current Pharmaceutical Design*, v. 12, n. 24, p. 3135- 3146, 2006.

McEvoy, A. N.; Bresnihan, B.; FitzGerald, O.; Murphy, E. P. **Cyclooxygenase 2-Derived Prostaglandin E2 Production by Corticotropin-Releasing Hormone contributes to the Activated cAMP Response Element Binding Protein Content in**

Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue. *Arthritis & Rheumatism*, v. 50, n. 4, p. 1132-1145, 2004.

McInnes, I. B.; O'Dell, J. R. **State-of-the-art: Rheumatoid arthritis.** *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 69, p. 1898- 1906, 2010.

Means, T. K.; Pavlovich, R. P.; Roca, D.; Vermeulen, M. W.; Fenton, M. J. **Activation of TNF- α Transcription Utilizes Distinct MAP Kinase Pathways in Different Macrophage Populations.** *Journal of Leukocyte Biology*, v. 67, p. 885- 893, 2000.

Mémet, S. **NF- κ B Functions in the Nervous System: from Development to Disease.** *Biochemical Pharmacology*, v. 72, p. 1180- 1195, 2006.

Mielants, H.; Bosh, F. V. D. **Extra-articular Manifestation.** *Clin. Exp. Rheumat.*, v. 27, p. S29, 2009.

Migita, K.; Izumi, Y.; Torigoshi, T.; Satomura, K.; Izumi, M.; Nishino, Y.; Jiuchi, Y.; Nakamura, M.; Kozuru, H.; Nonaka, F.; Equchi, K.; Kawakami, A.; Motokawa, S. **Inhibition of Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT) Signaling Pathway in Rheumatoid Synovial Fibroblasts Using Small Molecule Compounds.** *Clinical and Experimental Immunology*, v. 174, n. 3, p. 356-363, 2013.

Mizushima, T.; Obata, K.; Yamanaka, H.; Dai, Y.; Fukuoka, T.; Tokunaga, A.; Mashimo, T.; Nogushi, K. **Activation of p38 MAPK in Primary Afferent Neurons by Noxious Stimulation and its Involvement in the Development of Thermal Hyperalgesia.** *Pain*, v. 113, p. 51- 60, 2005.

Mjaavatten, M. D.; Bykerk, V. P. **Early Rheumatoid Arthritis: the Performance of the 2010 ACR/EULAR Criteria for Diagnosing RA.** *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, v. 27, p. 451- 466, 2013.

Mody, G. M.; Cardiel, M. H. **Challenges in the Management of Rheumatoid Arthritis in Development Countries.** *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, v. 22, n. 4, p. 621- 641, 2008.

Moelants, E. A. V.; Mortier, A.; Damme, J. V.; Proost, P. **Regulation of TNF- α with a Focus on Rheumatoid Arthritis.** *Immunology and Cell Biology*, v. 91, n. 6, p. 393-401, 2013.

Moran, M. M.; McAlexander, M. A.; Biro, T.; Szallasi, A. **Transient Receptor Potencial Channels as Therapeutic Targets.** Nature Reviews Drug Discovery, v. 10, p. 601-620, 2011.

Moriyana, T.; Higashi, T.; Togashi, K.; Iida, T.; Segi, E.; Sugimoto, Y.; Tominaga, T.; Narumiya, S.; Tominaga, M. **Sensitization of TRPV1 by EP₁ and IP Reveals Peripheral Nociceptive Mechanism of Prostaglandins.** Molecular Pain, v. 1, 2005.

Mulherin, D.; Fitzgerald, O.; Bresnihan, B. **Synovial Tissue Macrophage Populations and Articular Damage in Rheumatoid Arthritis.** Arthritis & Rheumatism, v. 39, n. 1, p. 115- 124, 1996.

Müller-Ladner, U.; Gay, R. E.; Gay, S. **Role of Nuclear Factor κ B in Synovial Inflammation.** Current Rheumatology Reports, v. 4, p. 201- 207, 2002.

Nagarkatti, P.; Pandey, R.; Rieder, S. A.; Hegde, V. L.; Nagarkatti, M. **Cannabinoids As Novel Anti-inflammatory Drugs.** Future Medical Chemistry, v. 1, n. 7, p. 1333-1349, 2009.

Narita, M.; Shimamura, M.; Imai, S.; Kubota, C.; Yajima, Y.; Takagi, T.; Shiokawa, M.; Inoue, T.; Suzuki, M.; Suzuki, T. **Role of Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α -Dependent Expression of Cyclooxygenase-2 m RNA in Thermal Hyperalgesia Induced by Chronic Inflammation in Mice.** Neuroscience, v. 152, p. 477- 486, 2008.

Niederberger, E.; Geisslinger, G. **The IKK-NF- κ B Pathway: a Source for Novel Molecular Drug Targets in Pain Therapy?** The FASEB Journal, v. 22, p. 3432- 3442, 2008.

Nielsen, S. F.; Bojesen, S. E.; Schnohr, P.; Nordestgaard, B. G. **Elevated Rheumatoid Factor and Long Term Risk of Rheumatoid Arthritis: a Prospective Cohort Study.** B. M. J. (Clinical Research edition), v. 345, p. e5344- e5352, 2012.

Noack, M.; Miossec, P. **Th17 and Regulatory T Cell Balance in Autoimmune and Inflammatory Diseases.** Autoimmunity Reviews, v. 13, p. 668- 677, 2014.

Noss, E. H.; Chang, S. K.; Watts, G. F. M.; Brenner, M. B. **Modulation of Matrix Metalloproteinase Production by Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts After Cadherin 11 Engagement.** Arthritis & Rheumatism, v. 63, n. 12, p. 3768- 3778, 2011.

Old, L. J. **Tumor Necrosis Factor (TNF)**. *Science*, v. 230, p. 630- 632, 1985.

Opar, A. **Kinase Inhibitors Attract Attention as Oral Rheumatoid Arthritis Drugs**. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 9, n. 4, p. 257, 2010.

Organização Mundial de Saúde. **Disease Incidence, Prevalence and Disability (Part 3)**. *Global Burden of Disease*, p. 28- 37, 2004.

Ouyang, W.; Kollss, J. K.; Zheng, Y. **The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation**. *Cell Press Immunity*, v. 28, n. 4, p. 454- 467, 2008.

Palazzo, E.; Luongo, L.; de Novellis, V.; Rossi, F.; Marabese, I.; Maione, S. **Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 and Pain Development**. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 12, p. 9- 12, 2012.

Parameswaran, N.; Patial, S. **Tumor Necrosis Factor- α signaling in Macrophages**. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, v. 20, n. 2, p. 87- 103, 2010.

Patterson, H.; Nibbs, R.; McInnes, I.; Siebert, S. **Protein Kinase Inhibitors in the Treatment of Inflammatory and Autoimmune Diseases**. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 176, n. 1, p. 1- 10, 2014.

Paunovic, V.; Harnett, M. **Mitogen-Activated Protein Kinases As Therapeutic Targets for Rheumatoid Arthritis**. *Drugs*, v. 73, p. 101-115, 2013.

Pelletier, M. Maggi, L.; Micheletti, A.; Lazzeri, E.; Tamassia, N.; Costantini, C.; Cosmi, L.; Lunardi, C.; Annunziato, F.; Romagnani, S.; Cassatella, M. **Evidence for a Cross-Talk Between Human Neutrophils and Th17 Cells**. *Blood*, v. 115, n. 2, p. 335- 343, 2010.

Penning, T. D.; Talley, J. J.; Bertenshaw, S. R.; Carter, J. S.; Collins, P. W.; Docter, S.; Graneto, M. J.; Lee, L. F.; Malecha, J. W.; Miyashiro, J. M.; Rogers, R. S.; Rogier, D. J.; Yu, S. S.; Anderson, G. D.; Burton, E. G.; Cogburn, J. N.; Gregory, S. A.; Koboldt, C. M.; Perkins, W. E.; Seibert, K.; Veenhuizen, A. W.; Zhang, Y. Y.; Isakson, P. C. **Synthesis and Biological Evaluation of the 1,5-Diarylpyrazole Class of Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Identification of 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, Celecoxib)**. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 40, p. 1347- 1365, 1997.

Pereira, P. J. S.; Dornelles, F. N.; Santos, D. S.; Calixto, J. B.; Morrone, F. B.; Campos, M. M. **Nociceptive and Inflammatory responses Induced by Formalin in the Orofacial Region of Rats: Effect of Anti-TNF- α Strategies.** *International Immunopharmacology*, v. 9, p. 80- 85, 2009.

Perl, E. R. **Ideas about Pain, a Historical View.** *Nature Reviews Neuroscience*, v. 8, n. 1, p. 71- 80, 2007.

Pertwee, R. G. **Cannabinoid Receptors and Pain.** *Progress in Neurobiology*, v. 63, n. 5, p. 569- 611, 2001.

Pertwee, R. G. **Elevating Endocannabinoid Levels: Pharmacological Strategies and Potential Therapeutic Applications.** *The Proceedings of the Nutrition Society*, v. 73, n. 1, p. 96- 105, 2014.

Pinto, L. G.; Cunha, T. M.; Vieira, S. M.; Lemos, H. P.; Verri Jr., W. A.; Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H. **IL-17 Mediates Articular Hypernociception in Antigen-Induced Arthritis in Mice.** *Pain*, v. 148, p. 247- 256, 2010.

Pisetsky, D. S.; Ward, M. M. **Advances in the Treatment of Inflammatory Arthritis.** *Brest Practice & Research Clinical Rheumatology*, v. 26, p. 251- 261, 2012.

Posadas, I.; Bucci, M.; Roviezzo, F.; Rossi, A. Parente, L.; Sautebin, L.; Cirino, G. **Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression.** *British Journal of Pharmacology*, v. 142, p. 331- 338, 2004.

Premkumar, L. S.; Abooj, M. **TRP Channels and Analgesia.** *Life Sciences*, v. 92, p. 415- 424, 2013.

Quartilho, A.; Mata, H. P.; Ibrahim, M. M.; Vanderah, T. W.; Porreca, F.; Makriyannis, A.; Malan, T. P. **Inhibition of Inflammatory Hyperalgesia by Activation of Peripheral CB₂ Cannabinoid Receptors.** *Anesthesiology*, v. 99, p. 955- 960, 2003.

Rajakariar, R.; Yaqoob, M. M.; Gilroy, D. W. **COX-2 in Inflammation and Resolution.** *Molecular Interventions*, v. 6, n. 4, p. 199- 207, 2006.

Rao, P. N. P.; Knaus, E. E. **Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond.** *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical science*, v. 11, n. 2, p. 81s- 110s, 2008.

Rawls, S. M.; Cabassa, J.; Geller, E. B.; Adler, M. W. **CB1 Receptors in the Preoptic Anterior Hypothalamus Regulate WIN 55212-2 [(4,5-Dihydro-2-Methyl-4(4-Morpholinylmethyl)-1-(1-Naphthalenyl-Carbonyl-6H-Pyrrolo[3,2,1ij]Quinolin-6-one)-Induced Hypothermia.** The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 301, n. 3, p. 963- 968, 2002.

Reinold, H.; Ahmadi, S.; Depner, U. B.; Layh, B.; Heindl, C.; Hamza, M.; Pahl, A.; Brune, K.; Narumiya, S.; Müller, U.; Zeilhofer, H. U. **Spinal Inflammatory Hyperalgesia Is Mediated by Prostaglandin E Receptors of the EP2 Subtype.** The Journal of Clinical Investigation, v. 115, n. 3, p. 673- 679, 2005.

Ribeiro, R. A.; Vale, M. L.; Ferreira, S. H.; Cunha, F. Q. **Analgesic Effect of Thalidomide on Inflammatory Pain.** European Journal of Pharmacology, v. 391, p. 97- 103, 2000.

Richardson, D.; Pearson, R. G.; Kurian, N.; Latif, M. L.; Garle, M. J.; Barrett, D. A.; Kendall, D. A.; Scammell, B. E.; Reeve, A. J.; Champman, V. **Characterisation of the Cannabinoid Receptor System in Synovial Tissue and Fluid in Patients with Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis.** Arthritis Research & Therapy, v. 10, n. 2, p. R43- R56, 2008.

Richter, F.; Natura, G.; Löser, S.; Schmidt, K.; Viisanen, H.; Schaible, H. **Tumor Necrosis Factor Causes Persistent Sensitization of Joint Nociceptors to Mechanical Stimuli in Rats.** Arthritis & Rheumatism, v. 62, n. 12, p. 3806- 3814, 2010.

Robbins, S. L.; Cotran, R. S. **Inflamação Aguda e Crônica.** Bases Patológicas das Doenças, Elsevier, 7ª ed., p. 50; 81, 2005.

Rosenbaum, T.; Gordon-Shaaq, A.; Munari, M.; Gordon, S. E. **Ca²⁺/calmodulin Modulates TRPV1 Activation by Capsaicin.** The Journal of General Physiology, v. 123, n. 1, p. 53- 62, 2004.

Rosenberg, A. E. **Ossos, Articulações e Tumores de Tecidos Moles.** Bases patológicas das Doenças, Elsevier, 7ª ed., p. 1366; 1368, 2004.

Ruoff, G. **Rheumatoid Arthritis: Early Treatment with Corticosteroids and Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs.** The Journal of Family Practice, v. 63, suplemento 2, p. S27- S30, 2014.

Russel, A. S.; Gulliver, W. P.; Irvine, E. J.; Albani, S.; Dutz, J. P. **Quality of Life in Patients with Immune-Mediated Inflammatory Diseases.** The Journal of Rheumatology, v. 88, n. 1, p. 7- 19, 2011.

Russel, F. A.; Fernandes, E. S.; Courade, J.; Keeble, J. E.; Brain, S. D. **Tumor Necrosis Factor α Mediates Transient Receptor Potential Vanilloid 1-dependent Bilateral Thermal Hyperalgesia with Distinct Peripheral Roles of Interleukin-1 β , Protein Kinase C and Cyclooxygenase-2 Signalling.** Pain, v. 142, p. 264- 274, 2009.

Saag, K. G.; Koehnke, R.; Caldwell, J. R.; Brasington, R.; Burmeister, L.F.; Zimmerman, B.; Kohler, J. A.; Furst, D. E. **Low Dose Long-term Corticosteroid Therapy In Rheumatoid Arthritis: An Analysis Of Serious Adverse Events.** The American Journal of Medicine, v. 96, p. 115- 123, 1994.

Sabio, G.; Davis, R. J. **TNF and MAP Kinase Signalling Pathways.** Seminars in Immunology, v. 26, p. 237- 245, 2014.

Sala, A.; Folco, G.; Murphy, R. C. **Transcellular Biosynthesis of Eicosanoids.** Pharmacological Reports, v. 62, p. 503- 510, 2010.

Santos, Ewerton. **Estudo do Perfil Antinociceptivo e Anti-inflamatório de Derivados N-acilidrazônicos Indólicos Homólogos do Protótipo LASSBio-651.** 2009. 81- 84 fls. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas)– Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Sarzi-Puttini, P.; Atzeni, F.; Salaffi, F. **Pain in Rheumatic Diseases: How Relevant Is It?** Rheumatism, v. 66, n. 1, p. 1- 3, 2014.

Sawynok, J.; Reid, A.; Meisner, J. **Pain Behaviors Produced by Capsaicin: Influence of Inflammatory Mediators and Nerve Injury.** The Journal of Pain, v. 7, n. 2, p. 134- 141, 2006.

Schaible, H.; Schmelz, M.; Tegeder, I. **Pathophysiology and Treatment of Pain in Joint Disease.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 58, 323- 342, 2006.

Schaeffer, T.; Truchetet, M.; Richez, C. **When and Where Does Rheumatoid Arthritis Begin?** Joint Bone Spine, v. 79, p. 550- 554, 2012.

Schaible, H.; Ebersberger, A.; Banchet, G. S. V. **Mechanisms of Pain in Arthritis.** Annals of the New York Academy of Science, v. 966, p. 343- 354, 2002.

Schaible, H.; Grubb, B. D. **Afferent and Spinal Mechanisms of Joint Pain.** Pain, v. 55, n. 1, p. 5- 54, 1993.

Schaible, H.; Schmelz, M.; Tegeder, I. **Pathophysiology and Treatment of Pain in Joint Disease.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 58, p. 323- 342, 2006.

Schaible, H.; von Banchet, G. S.; Boettger, M. K.; Bräuer, R.; Gajda, M.; Richter, F.; Hensellek, S.; Brenn, D.; Natura, G. **The Role of Proinflammatory cytokines in the Generation and Maintenance of Joint Pain.** Annals of the New York Academy of Science, v. 1193, p. 60- 69, 2010.

Schett, G.; Gravallese, E. **Bone Erosion in Rheumatoid Arthritis: Mechanisms, Diagnosis and Treatment.** Nature Review Rheumatology, v. 8, p. 656- 664, 2012.

Schett, G.; Teitelbaum, L. **Osteoclasts and Arthritis.** Journal of Bone and Mineral Research, v. 24, n. 7, p. 1142- 1146, 2009.

Schett, G.; Tohidast-Akrad, M.; Smolen, J. S.; Schmid, B. J.; Steiner, C. W.; Bitzan, P.; Zenz, P.; Redlich, K.; Xu, Q.; Steiner, G. **Activation, Differential Localization, and Regulation of the Stress-activated Protein Kinases, Extracellular Signal-regulated Kinase, c-JUN N-Terminal Kinase, and p38 Mitogen-activated Protein Kinase, in Synovial Tissue and Cells in Rheumatoid Arthritis.** Arthritis and Rheumatism, v. 43, n. 11, p. 2501- 2512, 2000.

Schett, G.; Zwerina, J.; Firestein, G. **The p38 Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway in Rheumatoid Arthritis.** Annals Rheumatoid Disease, v. 67, n. 7, p. 909- 916, 2008.

Schimmer, B. P.; Parker, K. L. **Hormônio Adrenocorticotrópico; Esteroides Adrenocorticais e Seus Análogos Sintéticos; Inibidores da Síntese e das Ações dos Hormônios Adrenocorticais.** As Bases Farmacológicas da Terapêutica, Mc Graw Hill, 11ª ed., p. 1441; 1445, 2006.

Schumacher, M. A. **Transient Receptor Potencial Channels in Pain and Inflammation: Therapeutic Opportunities.** Pain Practice, v. 10, n. 3, p. 185- 200, 2010.

Scott, D. L.; Wolfe, F.; Huizinga, T. W. **Rheumatoid Arthritis**. *Lancet*, v. 376, p. 1094-1108, 2010.

Scott, T.; Owens, M. D. **Thrombocytes Respond to Lipopolysaccharide Through Toll-like Receptor-4, and MAP Kinase and NF-kappa B Pathways leading to expression of Interleukin-6 and Cyclooxygenase-2 with Production of Prostaglandin E₂**. *Molecular Immunology*, v. 45, n. 4, p. 1001- 1008, 2008.

Shetty, A.; Hanson, R.; Korsten, P.; Shawagfeh, M.; Arami, S.; Volkov, S.; Vila, O.; Swedler, W.; Shunaigat, A. N.; Smadi, S.; Sawaged, R.; Perkins, D.; Shahrara, S.; Sweiss, N. J. **Tocilizumab in the Treatment of Rheumatoid Arthritis and Beyond**. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 28, n. 8, p. 349- 364, 2014.

Shrivastava, A. K.; Singh, H. V.; Raizada, A.; Singh, S. K.; Pandey, A.; Singh, N.; Yadav, D. S.; Sharma, H.; **Inflammatory Markers in Patients with Rheumatoid Arthritis**. *Allergologia et Immunopathologia, ahead of print*, 2014.

Siman, A. J.; MacGregor, A. J.; Thomson, W.; Holligan, S.; Carthy, D.; Farhan, A.; Ollier, W. E. R. **Twin Concordance Rates for Rheumatoid Arthritis: Results from a Nationwide Study**. *British Journal of Rheumatology*, v. 32, p. 903- 907, 1993.

Shin, Y. -H.; Namkoong, E.; Choi, S.; Bae, J. -S.; Jin, M.; Hwang, S. -M.; Arote, R.; Choi, S. -Y.; Park, K. **Capsaicin Regulates the NF- κ B Pathway in Salivary Gland Inflammation**. *Journal of Dental Research*, v. 92, n. 6, p. 547- 552, 2013.

Singh, S.; Natarajan, K.; Aggarwal, B. B. **Capsaicin (8-methyl-N-vanillil-6-nonenamide) Is a Potent Inhibitor of Nuclear Transcription Factor-Kappa B Activation by Diverse Agents**. *Journal of Immunology*, v. 157, n. 10, p. 4412- 4420, 1996.

Smith, H. S.; Smith, A. R.; Seidner, P. **Painful Rheumatoid Arthritis**. *Pain Physician*, v. 14, p. E427- E458, 2011.

Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. **Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid**. *Analytical chemistry*, v. 150, p. 76- 85, 1985.

Smolen, J.S.; Aletaha, D.; Bijlsma, J. W. J.; Breedveld, F. C.; Boumpas, D.; Burmester, G.; Combe, B.; Cutolo, M.; de Wit, M.; Dougados, M.; Emery, P.; Gibofsky, A.; Gomez-Reino, J. J.; Haraoui, B.; Kalden, J.; Keystone, E. C.; Kvien, T. K.; McInnes, I.; Martin-Mola, E.; Montecucco, C.; Schoels, M.; van der Heide, D. **Treating Rheumatoid**

Arthritis To Target: Recommendations Of an International Task Force. *Annals of the Rheumatic Disease*, v. 69, n. 4, p. 631- 637, 2010.

Smolen, J.S.; Aletaha, D.; Koeller, M.; Weisman, M. H.; Emery, P. **New Therapies for Treatment of Rheumatoid Arthritis.** *The Lancet*, v. 370, n. 9602, p. 1861- 1874, 2007.

Sokka, T.; Kankainen, A.; Hannonen, P. **scores for Functional Disability in Patients with Rheumatoid Arthritis Are Correlated at Higher Levels with Pain Scores Than with Radiographic Scores.** *Arthritis and Rheumatism*, v. 43, n. 2, p. 386- 389, 2000.

Spies, C. M.; Burmester, G. -R.; Buttgereit, F. **Analyses of Similarities and Differences in Glucocorticoid Therapy Between Rheumatoid Arthritis and Ankylosing Spondylitis- a Systematic Comparison.** *Clinical and Experimental Rheumatology*, v. 27, suplemento 55, p. S152- S158, 2009.

Stahn, C; Löwenberg, M.; Hommes, D. W.; Buttgereit, F. **Molecular Mechanisms of Glucocorticoid Action and Selective Glucocorticoid Receptor Agonists.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 275, p. 72- 78, 2007.

Stuck, A. E.; Minder, C. E.; Frey, F. J. **Risk Of Infectious Complications In Patients Taking Glucocorticosteroids.** *Reviews of Infectious Diseases*, v. 11, n. 6, p. 954-963, 1989.

Sundarrajan, M.; Boyle, D. L.; Chabaud-Riou, M.; Hammaker, D.; Firestein, G. S. **Expression of the MAPK Kinases MKK-4 and MKK-7 in Rheumatoid Arthritis and Their Role As Key Regulators of JNK.** *Arthritis & Rheumatism*, v. 48, n. 9, p. 2450-2460, 2003.

Sweitzer, S. M.; Peters, M. C.; Ma, J. Y.; Kerr, I.; Mangadu, R.; Chakravarty, S.; Dugar, S.; Medicherla, S.; Protter, A. A.; Yeomans, D. C. **Peripheral and Central p38 MAPK Mediates Capsaicin-induced Hyperalgeia.** *Pain*, v. 111, p. 278- 285, 2004.

Symmons, D.; Mathers, C.; Pflieger, B. **The Global Burden of Rheumatoid Arthritis in the Year 2000.** *Global Burden of disease*, p. 1- 35, 2006.

Szabó, A.; Helyes, Z.; Sándor, K.; Bite, A.; Pintér, E.; Németh, J.; Bánvölgyi, A.; Bölcskei, K.; Elekes, K. Szolcsányi, J. **Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptors in Adjuvant-induced Chronic Arthritis: In vivo Study Using Gene-deficient Mice.** *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 314, n. 1, p. 111- 119, 2005.

Szabo, T.; Biro, T.; Gonzalez, A. F.; Palkovits, M.; Blumberg, P. M. **Pharmacological Characterization of Vanilloid Receptor Located in the Brain.** *Molecular Brain Research*, v. 98, n. 1- 2, p. 51- 57, 2002.

Szalay, B.; Vásárhelyi, B.; Cseh, Á.; Tulassay, T.; Deák, M.; Kovács, L.; Balog, A. **The Impact of Conventional DMARD and Biological Therapies on CD4+ Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis: a Follow-up Study.** *Clinical Rheumatology*, v. 33, n. 2, p. 175- 185, 2014.

Szallasi, A.; Blumberg, P. M. **Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms.** *Pharmacological Reviews*, v. 51, n.2, p. 159- 211, 1999.

Tak, P. P.; Smeets, T. J. M.; Daha, M. R.; Kluin, P. M.; Meijers, K. A. E.; Brand, R.; Meinders, A. E.; Breedveld, F. C. **Analysis of the Synovial Cell Infiltrate in Early Rheumatoid Synovial Tissue in Relation to Local Disease Activity.** *Arthritis & Rheumatism*, v. 40, n. 2, p. 217- 225, 1997.

Tanaka, Y.; Yamaoka, K. **JAK Inhibitor Tofacitinib for Treating Rheumatoid Arthritis: From Basic to Clinical.** *Modern Rheumatology*, v.23, n. 3, p. 415, 2013.

Tanasescu, R.; Constantinescu, C. S. **Cannabinoids and the Immune System: an Overview.** *Immunobiology*, v. 215, p. 588- 597, 2010.

Tayal, V.; Kalra, B. S. **Cytokines and Anti-Cytokines as Therapeutics- An update.** *European Journal of Pharmacology*, V. 579, p. 1- 12, 2008.

Taylor, P. C.; Peters, A. M.; Paleolog, E.; Chapman, P. T.; Elliot, M. J.; McCloskey, R.; Feldman, M.; Maini, R. N. **Reduction of Chemokine Levels and Leukocyte Traffic to Joints by Tumor Necrosis Factor α Blockade in Patients with Rheumatoid Arthritis.** *Arthritis & Rheumatism*, v. 43, n. 1, p. 38-47, 2000.

Thalhamer, T.; McGrath, M. A.; Harnett, M. M. **MAPKs and Their Relevance To Arthritis and Inflammation.** *Rheumatology*, v. 47, p. 409- 414, 2008.

Thomson, S.; Udalova, I. A. **Quantitative Measurement of Cytokine Expression in Synoviocytes Derived from Rheumatoid Arthritis Patients.** *Methods in Molecular Biology*, v. 512, p. 233- 248, 2009.

Tiselius, A. W. K. **Chemistry in 1948: Presentation Speech by Professor A. Westgren, Chairman of the Nobel Committee for Chemistry of the Royal Swedish**

Academy of Sciences. Nobel Lectures in Chemistry (1942-1962), ed. World Scientific Publishing Co. Pte., p.189; 191, 217, 1999.

Trenkmann, M.; Brock, M.; Gay, R. E.; Michel, B. A.; Gay, S.; Huber, L. C. **Tumor Necrosis Factor α - Induced MicroRNA-18a Activates Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts through a Feedback Loop in NF- κ B Signaling.** Arthritis and Rheumatism, v. 65, n. 4, p. 916- 927, 2013.

Tributino, J. L.; Santos, M. L.; Mesquita, C. M.; Lima, C. K.; Silva, L. L.; Maia, R. C.; Duarte, C. D.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A.; Castro, N. G.; Miranda, A. L.; Guimaraes, M. Z. **LASSBio-881: an N-acylhydrazone Transient Receptor Potential Vanilloid Subfamily Type 1 Antagonist Orally Effective against the Hypernociception Induced by Capsaicin or Partial Sciatic Ligation.** British Journal of Pharmacology, v. 159, n. 8, p. 1716- 1723, 2010.

Tsatsanis, C.; Androulidaki, A.; Venihaki, M.; Margioris, A. N. **Signaling Networks Regulating Cyclooxygenase-2.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 38, p. 1654- 1661, 2006.

Uhlig, T.; Kvien, K. **Is Rheumatoid Arthritis Disappearing?** Annals of the Rheumatic Diseases, v. 64, n. 1, p. 7- 10, 2005.

Uhlig, T.; Moe, R. H.; Kvien, T. K. **The Burden of Disease in Rheumatoid Arthritis.** PharmacoEconomics, v. 32, n. 9, p. 841- 851, 2014.

Vajja, B. N. L.; Juluri, S.; Kole, L.; Chakrabarti, R.; Joshi, V. D. **Lipopolysaccharide-induced Paw Edema Model for Detection of Cytokine Modulating Anti-inflammatory Agents.** International Immunopharmacology, v. 4, p. 901- 909, 2004.

Valencia, X.; Stephens, G.; Goldbach-Mansky, R.; Wilson, M.; Shevach, E. M.; Wilson, M.; Lipsky, P. E. **TNF Downmodulates the Function of Human CD4⁺CD25^{hi} T-Regulatory Cells.** Blood, v. 108, n. 1, p. 253- 261, 2006.

van der Goes, M. C.; Jacobs, J. W. G.; Boers, M.; Andrews, T.; Blom-Bakkers, M. A. M.; Buttgereit, F.; Caeyers, N.; Cutolo, M.; Da Silva, J. A. P.; Guillevin, L.; Kirwan, J. R.; Rovensky, J.; Severijns, G.; Webber, S.; Westhovens, R.; Bijlsma, J. W. J. **Monitoring Adverse Events of Low-dose Glucocorticoid Therapy: EULAR Recommendations for Clinical Trials and Daily Practice.** Annals of the Rheumatic Diseases, v. 69, n. 11, p. 1913- 1919, 2010.

van de Laar, M.; Pergolizzi Jr., J. V.; Mellinghoff, H.; Merchante, I. M.; Nalamachu, S.; O'Brien, J.; Perrot, S.; Raffa, R. B. **Pain Treatment In Arthritis-Related Pain: Beyond NSAIDs**. *The Open Rheumatology Journal*, v. 6, p. 320- 330, 2012.

van den Berg, W. B.; Miossec, P. **IL-17 As a Future Therapeutic Target for Rheumatoid Arthritis**. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 5, p.549- 553, 2009.

van Everdingen, A. A.; Jacob, J. W.; Siewertsz Van Reesema, D. R.; Bijlsma, J. W. **Low-dose Prednisone Therapy for Patients with Early Active Rheumatoid Arthritis: Clinical Efficacy, Disease-modifying Properties, and Side Effects: a Randomized Double-blind, Placebo-controlled Clinical Trial**. *Annals of Internal Medicine*, v. 136, n. 1, p. 1- 12, 2002.

van Vollenhoven, R. F.; Chatzidionysiou, K. **Triple Therapy or Etanercept after Methotrexate Failure in RA?**. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 9, p. 510- 512, 2013.

van Vollenhoven, R. F.; Fleischmann, R.; Cohen, S.; Lee, E. B.; Meijide, J. A. G.; Wagner, S.; Forejtova, S.; Zwillich, S. H.; Gruben, D.; Koncz, T.; Wallenstein, G. V.; Krishnaswami, S.; Bradley, J. D.; Wilkinson, B. **Tofacitinib or Adalimumab Versus Placebo in Rheumatoid Arthritis**. *The New England Journal of Medicine*, v. 367, n. 6, p. 508, 2012.

van Zonneveld, A. J.; de Boer, H. C.; van der Veer, E. P.; Rabelink, T. J. **Inflammation, Vascular injury and Repair in Rheumatoid Arthritis**. *Ann. Rheum. Dis.*, v. 69, Suplem. 1, p. i57-i60, 2009.

Veldhuis, N. A.; Lew, M. J.; Abogadie, F. C.; Poole, D. P.; Jennings, E. A.; Ivanusic, J. J.; Eilers, H.; Bunnett, N, W.; McIntyre, P. **N-Glycosylation Determines Ionic Permeability and Desensitization of the TRPV1 Capsaicin Receptor**. *The Journal of Biological Chemistry*, *In Press*, 2012.

Verry Jr., W. A.; Cunha, T. M.; Parada, C. A.; Poole, S.; Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H. **Hypernociceptive Role of Cytokines and Chemoamines: Targets for Analgesic Drug Development?**. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 112, p. 116- 138, 2006.

Verry Jr., W. A.; Souto, F. O.; Vieira, S. M.; Almeida, S. C. L.; Fucada, S. Y.; Xu, D.; Alves-Filho, J. C.; Cunha, T. M.; Guerrero, A. T. G.; Mattos-Guimaraes, R. B.; Oliveira, F. R.; Teixeira, M. M.; Silva, J. S.; McInnes, I. B.; Ferreira, S. H.; Louzada-Junior, P.; Liew, F. Y.; Cunha, F. Q. **IL-33 Induces Neutrophil Migration In Rheumatoid Arthritis and Is a Target of Anti-TNF Therapy**. *Annals of Rheumatic Diseases*, v. 69, n. 9, p. 1697- 1703, 2010.

Vincent, F. B.; Morand, E. F.; Murphy, K.; Mackay, F.; Mariette, X.; Marcelli, C. **Antidrug Antibodies (ADAb) to Tumor Necrosis Factor (TNF)-Specific Neutralizing Agents in Chronic Inflammatory Diseases: a Real Issue, a Clinical Perspective.** *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 72, n. 2, p. 165- 178, 2013.

Voight, E. A.; Gomtsyan, A. R.; Daanen, J. F.; Perner, R. J.; Schmidt, R. G.; Bayburt, E. K.; DiDomenico, S.; McDonald, H. A.; Puttfarcken, P. S.; Chen, J.; Neelands, T. R.; Bianchi, B. R.; Han, P.; Reilly, R. M.; Franklin, P. H.; Segreti, J. A.; Nelson, R. A.; Su, Z.; King, A. J.; Polakowski, J. S.; Baker, S. J.; Gauvin, D. M.; Lewis, L. R.; Mikusa, J. P.; Joshi, S. K.; Faltynek, C. R.; Kym, P. R.; Kort, M. E. **Discovery of (R)-1-(7-Chloro-2,2-bis(fluoromethyl)chroman-4-yl)-3-(3-methylisoquinolin-5-yl)urea (A-1165442): A Temperature-Neutral Transient Receptor Potential Vanilloid-1 (TRPV1) Antagonist with Analgesic Efficacy.** *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 57, n. 17, p. 7412- 7424, 2014.

Volin, M. V.; Koch, A. F. **Interleukin-18: a Mediator of Inflammation and Angiogenesis in Rheumatoid Arthritis.** *Journal of Interferon & Cytokine Research*, v. 31, n. 10, p. 745- 751, 2011.

Wang, H.; Woolf, C. J. **Pain TRPs.** *Neuron*, v. 46, p. 9- 12, 2005.

Wang, Q.; Ma, Y.; Liu, D.; Zhang, L.; Wei, W. **The Roles of B Cells and Their Interactions with Fibroblast-Like Synoviocytes in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis.** *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 155, p. 205- 211, 2011.

Walsh, D. A.; McWilliams, D. F. **Pain in Rheumatoid Arthritis.** *Current Pain and Headache Reports*, v. 16, n. 6, p. 509- 517, 2012.

Weinblatt, M. E. **Methotrexate in Rheumatoid Arthritis: a Quarter Century of Development.** *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, v. 124, p. 16- 25, 2013.

Westra, J.; Limburg, P. C.; de Boer, P.; van Rijswijk, M. H. **Effects of RWJ67657, a p38 Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) Inhibitor, on the Production of Inflammatory Mediators by Rheumatoid Synovial Fibroblasts.** *Annals Rheumatology disease*, v. 63, p. 1453- 1459, 2004.

Wiley, J. L.; Marusich, J. A.; Huffman, J. W. **Moving around the Molecule: Relationship between Chemical Structure and in vivo Activity of Synthetic Cannabinoids.** *Life Science*, v. 97, n. 1, p. 55- 63, 2014.

Williams, L. M.; Rudensky, A. Y. **Maintenance of the Foxp3-Dependent Developmental Program in Mature Regulatory T Cells Requires Continued Expression of Foxp3.** *Nature Immunology*, v. 8, n. 3, p. 277- 284, 2007.

Willians, R. O.; Feldman, M.; Maini, R. N. **Anti-tumor Necrosis Factor Ameliorates Joint Disease in Murine Collagen-induced Arthritis.** *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v.89, n. 20, p. 9784- 9788, 1992.

Wolfe, F.; Caplan, L.; Michaud, K. **Treatment for Rheumatoid Arthritis and the Risk of Hospitalization for Pneumonia.** *Arthritis & Rheumatism*, v. 54, n. 2, p. 628- 634, 2006.

Wolfe, F.; Michaud, K. **Assessment of Pain in Rheumatoid Arthritis: Minimal Clinically Significant Difference, Predictors, and the Effect of Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy.** *The Journal of Rheumatology*, v. 34, n. 8, p. 1674- 1683, 2007.

Woodbury, C. J.; Zwick, M.; Wang, S.; Lawson, J. J.; Caterina, M. J.; Koltzenburg, M.; Albers, K. M.; Koerber, H. R.; Davis, B. M. **Nociceptors Lacking TRPV1 and TRPV2 Have Normal Heat Responses.** *The Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 28, p. 6410- 6415, 2004.

Xie, W.; Chipman, J. G.; Robertson, D. L.; Erikson, R. L.; Simmons, D. L. **Expression of a Mitogen-Responsive Gen Encoding Prostaglandin Synthase Is Regulated by mRNA Splicing.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 88, p. 2692- 2696, 1991.

Yamamoto, Y.; Gaynor, R. B. **I κ B Kinases: Key Regulators of the NF- κ B Pathway.** *Trends in Biochemical Sciences*, v. 29, n. 2, p. 72- 79, 2004.

Yang, P. T.; Kasai, H.; Zhao, L. J.; Xiao, W. G.; Tanabe, F.; Ito, M. **Increased CCR5 Expression on Circulating CD4⁺ T Cells in Ankylosing Spondylitis, Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus.** *Clinical and Experimental Immunology*, v. 138, n. 2, p. 342- 347, 2004.

Yarilina, A.; Xu, K.; Chan, C.; Ivashkiv, L. B. **Regulation of Inflammatory Responses in Tumor Necrosis Factor-Activated and Rheumatoid Arthritis Synovial Macrophages by JAK Inhibitors.** *Arthritis & Rheumatism*, v. 64, n. 12, p. 3856- 3866, 2012.

Yashpal, K.; Coderre, T. J. **Influence of Formalin Concentration on the Antinociceptive Effects of Anti-inflammatory Drugs in the Formalin Test in Rats: Separate Mechanisms Underlying the Nociceptive Effects of Low- and High-concentration formalin.** *European Journal of Pain*, v. 2, p. 63- 68, 1998.

Yue, C.; You, X.; Zhao, L.; Wang, H.; Tang, F.; Zhang, F.; Zhang, X.; He, W. **The Effects of Adalimumab and Methotrexate Treatment on Peripheral Th17 Cells and IL-17/IL-6 Secretion in Rheumatoid Arthritis Patients.** *Rheumatology International*, v. 30, n. 12, p. 1553- 1557, 2010.

Zidar, N.; Odar, K.; Glavac, D.; Jerse, M.; Zupanc, T.; Stajer, D. **Cyclooxygenase in Normal Human Tissues- is COX-1 Really a Constitutive Isoform, and COX-2 an Inducible Isoform?** *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 13, n. 9b, 3753- 3763, 2009.

Zwerina, J.; Hayer, S.; Redlich, K.; Bobacz, K.; Kollias, G.; Smolen, J. S.; Scett, G. **Activation of p38 MAPK Is a Key Step in Tumor Necrosis Factor- Mediated Inflammatory Bone Destruction.** *Arthritis and Rheumatism*, v. 54, n. 2, p. 463- 472, 2006.