

C 628.301
R 1297104
02/06/00

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ESTUDO DA FERTILIDADE EM RATAS COM ARTRITE:
EFEITO MODULATÓRIO DE DROGAS QUE INIBEM A
CICLOOXIGENASE E O FATOR DE NECROSE TUMORAL**

JOSÉ CLIELDER REBOUÇAS DA SILVA

ES6
612.6
5582
2000

FORTALEZA-CE

2000

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ESTUDO DA FERTILIDADE EM RATAS COM ARTRITE:
EFEITO MODULATÓRIO DE DROGAS QUE INIBEM A
CICLOOXIGENASE E O FATOR DE NECROSE TUMORAL**

JOSÉ CLIELDER REBOUÇAS DA SILVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do
título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Vietla Satyanarayana Rao

FORTALEZA-CE

2000

S58e Silva, José Clielder Rebouças da

Estudo da fertilidade em ratas com artrite: efeito modulatório de drogas que inibem a ciclooxigenase e o fator de necrose tumoral/ José Clielder Rebouças da Silva.- Fortaleza, 2000.

193f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

CDD 612.6

1. Fecundidade. 2. Artrite. 3. Artrite adjuvante. 4. Inibidores de ciclo-oxigenase. 5. Fator de necrose do tumor. I. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho da tese é permitida, desde que obedeça as normas éticas.

José Clielder Rebouças da Silva

Tese aprovada em 30/03/2000

Prof. Vietla Satyanarayana Rao

Prof. Aldo Angelo Moreira Lima

Prof. Ronaldo Albuquerque Ribeiro

Prof. Manassés Claudino Fonteles

Profa. Fernanda Regina de Castro Almeida

A meu pai *João José da Silva*, amigo e companheiro.

À minha mãe *Almerinda Rebouças da Silva* – À sua memória dedico esta passagem do “auto da alma” (Gil de Vicente, poeta português):

“Assi como foi cousa muito necessária haver estalagens, pera repouso e refeição dos cansados caminhantes, assi foi cousa conveniente que nesta caminhante vida houvesse... descanso das almas que vão caminhantes a eternal morada de Deus”.

AGRADECIMENTOS

Expresso meus agradecimento ao Prof. Vietla Satyanarayana Rao pela oportunidade de orientação durante este trabalho de tese, além da amizade e tolerância demonstrados durante estes vários anos de convivência e ensinamento.

À Profa. Gerly Anne Castro Brito e ao Prof. Dalgimar Bezerra de Menezes pela receptividade e presteza nas análises histopatológicas, bem como à inestimável contribuição técnica de José Ivan Rodrigues de Sousa.

Ao Prof. Aldo Ângelo Moreira Lima e ao Prof. Marcos Fábio G. Rocha por abrirem a possibilidade de colaboração nas dosagens de citocinas.

Em especial, a Cristiane Moreira Reis e Rômulo Augusto Feio Farias, pelo companheirismo e apoio.

Aos colegas de pós-graduação, bolsistas *et al.* do Laboratório de Produtos Naturais: Fátima de Souza, Adriana Tomé, Adriana Rolim, Laura Paiva, Angélica Costa, Regilane Matos, Luilma Gurgel, Marjorie Moreira, Karina Moreira, Erik Queiroz, Simony Fauth, Elaine Pereira, Iran Barros e Nísia Rodrigues, pelos momentos de descontração.

À bibliotecária Norma Carvalho Linhares pela competente revisão da bibliografia e aos demais funcionários da Biblioteca da Faculdade de Medicina da UFC.

À Sra. Artemísia, veterinária-técnica, e aos demais funcionários Sobrinho, Haroldo e Bento, do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC.

Ao Sr. Alan Menezes pelo trabalho fotográfico.

Às secretárias de graduação e pós-graduação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC: Sílvia Lima, Marta Araujo e Joana Barbosa.

A todos os professores, técnicos e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC.

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) pela concessão de liberação de atividades acadêmicas.

A CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xx
1. REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Mediadores da ovulação, nidação e gravidez: papel das prostaglandinas e citocinas	3
1.2.1. Período pré-implantação	3
1.2.2. Período de implantação	9
1.2.3. Período pós-implantação	13
1.3. Evolução do conceito de artrite reumatóide e de seu tratamento farmacológico	21
1.4. Doença inflamatória crônica e fertilidade	41
2. OBJETIVOS	51
3. MATERIAL	53
3.1. Animais experimentais	53
3.2. Aparelhos e instrumentos laboratoriais	53
3.3. Drogas e reagentes	54

4. MÉTODOS.....	56
4.1. Criação dos animais para estudos da fertilidade e doença inflamatória crônica.....	56
4.2. Coleta de sangue e obtenção das amostras de soro.....	57
4.3. Ensaio farmacológicos.....	58
4.3.1. Indução de artrite por adjuvante completo de Freund.....	58
4.3.2. Efeito da artrite no ciclo estral e no peso dos órgãos reprodutivos da rata.....	58
4.3.3. Efeito da artrite na implantação do blastocisto na rata.....	59
4.3.4. Efeito de inibidores da síntese de $TNF\alpha$ em ratas com artrite.....	59
4.3.5. Efeito de inibidores da ciclooxigenase em ratas com artrite.....	60
4.3.6. Efeito da associação de um inibidor de ciclooxigenase tipo 2 e um inibidor de $TNF\alpha$ em ratas com artrite.....	60
4.3.7. Dosagem de $IL-1\beta$ em ratas com artrite.....	61
4.3.8. Dosagem de $TNF\alpha$ em ratas com artrite.....	63
4.3.9. Dosagem de $IL-1\beta$ e $TNF\alpha$ durante o ciclo estral da rata.....	64
4.3.10. Efeito de inibidores de ciclooxigenase e da síntese de $TNF\alpha$ no ciclo estral em ratas com artrite.....	65
4.3.11. Efeito de inibidores da síntese de $TNF\alpha$ na implantação do blastocisto na rata.....	66
4.3.12. Efeito de inibidores da ciclooxigenase 1 e 2 na implantação do blastocisto na rata.....	66
4.3.13. Efeito de inibidores da ciclooxigenase 1 e 2 na gravidez da rata.....	67

4.3.14. Efeito do extrato de placenta humana em ratas com artrite.....	68
4.3.15. Efeito da indução de artrite na gestação da rata.....	68
4.3.16. Efeito da indução de gravidez em ratas com artrite.....	69
4.3.17. Efeito de inibidores da síntese de $TNF\alpha$ e ciclooxigenase na gravidez em ratas com artrite.....	69
4.4. Estudo histopatológico.....	70
4.5. Análise estatística.....	71
5. RESULTADOS.....	72
5.1. Curso temporal do desenvolvimento da lesão inflamatória secundária e do ganho de peso corporal em ratas com artrite.....	72
5.2. Perfil hematológico e bioquímica sérica em ratas com artrite.....	72
5.3. Peso dos órgãos do sistema reprodutor e histologia do útero e ovários em ratas com artrite.....	73
5.4. Efeito da artrite na duração do ciclo estral da rata.....	73
5.5. Efeito da artrite na implantação do blastocisto na rata.....	74
5.6. Efeito de inibidores da síntese de $TNF\alpha$ na lesão inflamatória articular e no ganho de peso corporal em ratas com artrite.....	74
5.7. Efeito de inibidores da ciclooxigenase na lesão inflamatória articular e no ganho de peso corporal em ratas com artrite.....	75
5.8. Efeito da associação de um inibidor de ciclooxigenase 2 e um inibidor de $TNF\alpha$ na lesão inflamatória articular e no ganho de peso corporal em ratas com artrite.....	76

5.9. Análise histopatológica das lesões inflamatórias na articulação tibiotársica em ratas com artrite.....	76
5.10. Efeito de inibidores de ciclooxigenase e da síntese de TNF α no ciclo estral da rata com artrite.....	77
5.11. Níveis circulantes de IL-1 β e TNF α no ciclo estral da rata.....	78
5.12. Níveis circulantes de IL-1 β e TNF α em ratas com artrite.....	78
5.13. Efeito de inibidores da ciclooxigenase e da síntese de TNF α nos níveis circulantes de IL-1 β e TNF α na rata com artrite.....	79
5.14. Efeito da gravidez nos níveis circulantes de IL-1 β e TNF α na rata com artrite no dia do parto.....	80
5.15. Efeito da gravidez na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite.....	80
5.16. Efeito da gravidez no desenvolvimento da lesão inflamatória primária na rata com artrite.....	81
5.17. Efeito de inibidores da síntese de TNF α na implantação do blastocisto na rata.....	81
5.18. Efeito de inibidores da ciclooxigenase 1 e 2 na implantação do blastocisto na rata.....	82
5.19. Efeito de inibidores da ciclooxigenase 1 e 2 na gravidez da rata.....	82
5.20. Efeito da indução de artrite com ACF na gestação da rata.....	84
5.21. Efeito da gravidez, do extrato de placenta humana e da indometacina na lesão inflamatória articular e no ganho de peso corporal em ratas com artrite.....	86

6. DISCUSSÃO.....	124
7. CONCLUSÕES.....	145
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	146
9. ANEXOS.....	184

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Curso temporal do desenvolvimento da lesão inflamatória secundária em ratas com artrite	88
2	Curso temporal do ganho de peso corporal em ratas com artrite	89
3	Histologia do útero e ovário em ratas com artrite	94-95
4	Efeito da artrite no ciclo estral da rata	96
5	Efeito da artrite na implantação do blastocisto na rata	97
6	Sítios de implantação fetal no útero da rata com artrite	98
7	Efeito de inibidores da síntese de $\text{TNF}\alpha$ na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite	99
8	Efeito de inibidores da síntese de $\text{TNF}\alpha$ no ganho de peso corporal em ratas com artrite	100
9	Efeito de inibidores da ciclooxigenase na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite	101
10	Efeito de inibidores da ciclooxigenase no ganho de peso corporal em ratas com artrite	102
11	Efeito da associação de um inibidor de ciclooxigenase 2 e um inibidor da síntese de $\text{TNF}\alpha$ na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite	103
12	Efeito da associação de um inibidor da ciclooxigenase e da síntese de $\text{TNF}\alpha$ no ganho de peso corporal em ratas com artrite	104
13	Histopatologia da lesões inflamatórias em secções sagitais da articulação tibiotársica em ratas com artrite	105-106

14	Efeito de inibidores da ciclooxigenase e da síntese de TNF α no ciclo estral da rata com artrite	108
15	Níveis circulantes de IL-1 β e TNF α no ciclo estral da rata normal	109
16	Níveis circulantes de IL-1 β e TNF α em ratas com artrite	110
17	Efeito de inibidores de ciclooxigenase e da síntese de TNF α nos níveis circulantes de IL-1 β e TNF α em ratas com artrite	111
18	Efeito da gravidez nos níveis circulantes de IL-1 β e TNF α em ratas com artrite no dia do parto	112
19	Efeito da gravidez na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite	113
20	Efeito da gravidez na lesão inflamatória primária em ratas com artrite	114
21	Efeito de inibidores da síntese de TNF α na implantação do blastocisto na rata	115
22	Efeito dos inibidores de ciclooxigenase 1 e 2 na ovoimplantação em ratas	116
23	Efeito de inibidores da ciclooxigenase 1 e 2 na gravidez da rata	117
24	Fetos no útero de ratas normais e tratadas com inibidores da ciclooxigenase	119
25	Efeito da indução da gravidez na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite	121
26	Efeito do EPH e da indometacina na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite	122
27	Efeito da gravidez e do EPH no ganho de peso corporal em ratas com artrite	123

ABREVIATURAS

ACF – adjuvante completo de Freund

AMPc – monofosfato de adenosina cíclico

AR – artrite reumatóide

COX-1 – ciclooxigenase 1

COX-2 – ciclooxigenase 2

CPZ – clorpromazina

CSF-1 – fator estimulador de colônia tipo 1

DAINES – drogas antiinflamatórias não-esteroidais

dL – decilitro

ELISA – *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*

EPH – extrato de placenta humana

EPM – erro padrão da média

fL – fentolitro

g – grama

GM-CSF – fator estimulador de colônia – granulócito/macrófago

GMPc – monofosfato de guanosina cíclico

IgG – imunoglobulina G

Ikkbeta – proteína inibitória capa capa beta

IL – interleucina

IL-1 – interleucina 1

IL-6 – interleucina 6

IL-1 β – interleucina 1 beta

IL-1ra – receptor solúvel de interleucina 1

IFN γ – interferon gama

INDO – indometacina

i.p. – via intraperitoneal

μ L – microlitro

MCF – fator de células mononucleares

mm³ – milímetro cúbico

n – número de animais por grupo experimental

NAB – nabumetona

NF-k β – fator nuclear capa beta

nm – nanômetro

pg – picograma

PDE – fosfodiesterase

PDE3 – fosfodiesterase tipo 3

PDE4 – fosfodiesterase tipo 4

PDE4D – fosfodiesterase tipo 4D

PDEs – fosfodiesterases

PGE2 – prostaglandina E2

PGI2 – prostaciclina

PTF – pentoxifilina

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro

TNF – fator de necrose tumoral

TNF α – fator de necrose tumoral alfa

v.o. – via oral

RESUMO

O presente estudo examinou a influência da doença inflamatória crônica na reprodução, empregando a artrite induzida por adjuvante como modelo animal que simula a artrite reumatóide humana. A artrite foi induzida pela injeção subplantar de Adjuvante Completo de Freund (ACF) na pata traseira direita de ratas Wistar. O curso temporal da reação inflamatória foi avaliado pela medida pletismográfica do volume da pata contralateral (reação secundária), alterações de peso corporal, parâmetros hematológicos e bioquímicos, níveis séricos de citocinas IL-1 β e TNF α e análise histopatológica da articulação tíbio-társica, do ovário e do útero. Além disso, verificamos as possíveis diferenças existentes entre ratas normais ou com artrite no padrão do ciclo estral, fecundação e gravidez. Foi avaliado também o efeito do tratamento com inibidores mais seletivos para ciclooxigenase 1 (COX-1), indometacina (INDO 2 mg/kg, v.o.), e ciclooxigenase 2 (COX-2), nabumetona (NAB 20 mg/kg, v.o.) respectivamente, ou pentoxifilina (PTF 20 mg/kg, v.o.), um composto capaz de inibir a síntese de TNF α , na inflamação da articulação e nos níveis séricos de IL-1 β e TNF α . No intuito de avaliar se a gravidez exerce alguma influência no desenvolvimento da artrite, ratas com artrite foram acasaladas com machos férteis entre o 10^o e o 15^o dias após a indução da doença, sendo confirmada a presença de gravidez pelo exame do esfregaço vaginal. Foi testada também a possível eficácia anti-artrítica de um extrato de placenta humana padronizado, administrado do 10^o ao 20^o dia após a injeção de ACF. Nas ratas com artrite, os níveis séricos de IL-1 β e TNF α elevaram-se no 1^o dia após a injeção de ACF e, a seguir, a IL-1 β diminuiu progressivamente, enquanto o TNF α manteve-se elevado até o 30^o dia após o ACF. A reação artrítica secundária começou a se desenvolver no 14^o dia, atingindo o pico no 21^o após a inoculação de ACF. A lesão no pico da reação secundária foi significativamente menor nos animais tratados com os inibidores de ciclooxigenase e de TNF α . As ratas que receberam PTF (20 mg/kg, v.o.) ou sua associação com NAB (20 mg/kg, v.o.), mas não a NAB isoladamente, apresentaram significativa redução dos níveis séricos de TNF α no 20^o dia após ACF. Ao contrário do TNF α , IL-1 β sérica não variou significativamente. Embora tendo promovido efeitos diferentes nos níveis séricos de citocinas, a PTF e NAB foram igualmente eficazes na diminuição da progressão da artrite por ACF, indicando que os níveis séricos de IL-1 β e TNF α não refletem acuradamente a eficácia do tratamento. As ratas com artrite, além de apresentarem evidências histológicas de inflamação nas articulações, demonstraram redução do número de folículos em crescimento no ovário e infiltração de células inflamatórias, predominantemente eosinófilos e plasmócitos, no útero. Além disso, as ratas com artrite apresentaram diminuição do ganho de peso corporal, aumento da duração do ciclo estral, redução das oviimplantações uterinas e baixa fertilidade. O tratamento com INDO (2 mg/kg, v.o.), NAB (20 mg/kg, v.o.) ou PTF (20 mg/kg, v.o.) não reverteu a baixa fertilidade das ratas com artrite. As fêmeas grávidas ou tratadas com o extrato de placenta (400 mg/kg, i.p.) entre o 10^o e 20^o dia após ACF apresentaram significativa inibição da lesão no pico da reação artrítica secundária. Além disso, o extrato de placenta foi o único tratamento a reverter o baixo ganho de peso corporal das fêmeas com artrite. Em conclusão, este estudo demonstra que a artrite por adjuvante afeta negativamente a reprodução na rata e sugere que a gravidez tem uma influência modulatória na artrite, envolvendo provavelmente fatores de origem placentária, cuja identidade permanece a ser elucidada. O uso potencial de inibidores da COX e antagonistas do TNF, embora seja promissor para tratar a artrite, não parece melhorar a baixa fertilidade associada à doença.

ABSTRACT

This study examined the role of chronic inflammatory disease in reproduction using adjuvant-induced arthritis in rat as an animal model that simulates human rheumatoid arthritis. Arthritis was induced by subplantar injection of Freund's Complete Adjuvant (FCA) into the right hind paw of Wistar female rats. The time-course of inflammatory reaction as measured by plethysmography of the increment in contralateral paw volume (secondary reaction), body weight changes, haematological and biochemical alterations, levels of serum cytokines IL-1 β and TNF α and the histopathological changes in tibio-tarsal joint, ovary and uterus were documented. Besides, we verified the differences, if any, between the arthritic and non-arthritic rats on the pattern of oestrus cycle, fecundation and pregnancy outcome. Furthermore, the treatment effects of more selective cyclooxygenase 1 (COX-1) and cyclooxygenase 2 (COX-2) inhibitors, indomethacin and nabumetone, respectively, and pentoxifylline, a compound that inhibits TNF α production, were analysed on joint inflammation and serum cytokines IL-1 β and TNF α levels. In order to know whether pregnancy has some influence on the development of arthritis, adjuvant arthritic female rats were mated with proven fertile males between day 10 and 15 post-FCA injection and the pregnancy was confirmed by examination of vaginal smears. It was also investigated the possible anti-arthritic efficacy of a standardized human placental extract administered between day 10 and 20 after FCA. In arthritic rats, the serum IL-1 β and TNF α levels were greatly elevated on the very first day i.e. 5 h after FCA, and thereupon a progressive decrease in IL-1 β but not TNF α was observed until day 30. The secondary arthritic reaction began to increase on day 14 and attained its peak on day 21 post-adjuvant injection. The peak arthritic lesion was significantly less in rats that received cyclooxygenase and TNF α inhibitors. When serum cytokine levels were analysed on day 20 post-adjuvant injection, rats treated with pentoxifylline or its association with nabumetone but not nabumetone alone showed significantly lowered levels of serum TNF α . Unlike TNF α , serum IL-1 β did not vary significantly. The drugs nabumetone and pentoxifylline although produced differential effects on serum cytokine levels, they showed equal efficacy in attenuating the progression of FCA-induced arthritis. It implies that serum cytokine levels do not accurately reflect the treatment efficacy. The arthritic rats besides showing histologic evidences of joint inflammation, presented reduced number of growing follicles in ovary and infiltration of inflammatory cells predominantly eosinophils and plasma cells in uterus. Besides, arthritic rats showed body weight loss, prolongation of oestrus cycle, decreased number of uterine ovoimplantations and low fertility. Indomethacin (2 mg/kg, p.o.), nabumetone (20 mg/kg, p.o.) or pentoxifylline (20 mg/kg, p.o.) treatments, however, failed to reverse the reduced fertility seen in arthritic rats. The peak paw inflammatory response was significantly less in the rats on pregnancy and in those that received placental extract (400 mg/kg, i.p.) between days 10 to 20 of adjuvant arthritis. Furthermore, the placental extract was the only treatment that reversed the low body weight gain seen in arthritic rats. In conclusion, this study shows that adjuvant arthritis affects negatively the reproduction in the rat and suggests that pregnancy has a modulatory influence on arthritis probably involving placental-related factors, whose identity remains to be studied. The potential use of COX inhibitors and TNF antagonists to suppress arthritis although appear rewarding, do not seem to alleviate the arthritis associated low fertility.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Generalidades

Até a metade do século XX havia a concepção errônea de que o feto humano estaria completamente livre de quaisquer ameaças enquanto no ambiente uterino, graças à eficácia da proteção das barreiras placentária e uterina. Segundo esta visão, os problemas fetais seriam unicamente de natureza genética. Entretanto, havia relatos demonstrando o contrário, como o de GREGG, em 1941, onde mostrava que a ocorrência de sarampo em mulheres, nos estágios iniciais da gestação, poderia causar malformações congênitas, um fato atualmente bem estabelecido. Estas opiniões eram resquícios de conceitos sem qualquer fundamentação científica, oriundos dos antigos gregos e romanos, e assimilados pelos europeus do século XV e XVII, em que se relacionava, por exemplo, os fetos defeituosos a seres divinos, em algumas civilizações, ou demoníacos, em outras, mas não à presença de doenças ou anormalidades maternas (LEVI, 1997).

Tais idéias modificaram-se dramaticamente a partir da observação de LENZ, na Alemanha, e McBRIDE, na Austrália, ambos em 1961, que associaram o grande aumento da frequência de amelia e meromelia nos filhos das mulheres tratadas durante a gravidez com talidomida, uma droga hipnosedativa aparentemente sem efeitos colaterais graves (LENZ, 1961; LENZ, 1962; LENZ, 1988). De fato, a talidomida é bastante espécie específica: os humanos, por

exemplo, apresentam efeitos teratogênicos com doses baixas de 0,5 a 1,0 mg/kg, enquanto que não há efeitos semelhantes nas linhagens de ratos ou camundongos com doses tão altas quanto 4000 mg/kg. Os únicos animais que demonstram respostas similares aos humanos são certas linhagens de coelhos e de macacos (LEVI, 1997). Sabe-se, atualmente, que a placenta é um órgão de origem embrionária essencial à vida do feto por facilitar as transferências de moléculas materno-fetais e que mesmo células de origem materna tais como eritrócitos, plaquetas, granulócitos e linfócitos passam em pequenas quantidades para a circulação fetal, principalmente nas placentas hemocoriais (DESAY e CREGER, 1963; OBER, 1998). Está claro, atualmente, a existência de uma passagem bidirecional de células e moléculas na interface materno-fetal mas, nos tecidos fetais, grande parte destas células são destruídas por apoptose (HUNT et al., 1997).

O objetivo final do processo de gestação é permitir o desenvolvimento do conceito até um ponto em que possa sobreviver no ambiente extra-uterino. Assim sendo, os mecanismos fisiológicos que permitem o desenvolvimento fetal não devem comprometer as defesas maternas e, portanto, são em grande parte mediados localmente, possivelmente através de citocinas, eicosanóides e esteróides reprodutivos (ROBERTS et al., 1996), produzidos por células hematopoiéticas ou por outras fontes como o células uterinas e ovarianas (HUNT, 1994). É razoável se cogitar que distúrbios possam surgir por falha na expressão ou função destas moléculas. As funções específicas destas moléculas no sistema reprodutor em condições de saúde e doença, bem como a

possibilidade de sua manipulação farmacológica ou genética, são atualmente objeto de amplo estudo.

1.2. Mediadores da ovulação, nidação e gravidez: papel das prostaglandinas e citocinas

A maioria das moléculas mediadores dos processos reprodutivos participam das reações inflamatórias, incluindo-se as prostaglandinas, leucotrienos, fator de ativação plaquetária (PAF), histamina, bradicinina, óxido nítrico, citocinas entre outros (TAWFIK et al., 1987; AHMED e SMITH, 1992; TERRANOVA et al., 1995), sendo produzidas por inúmeras células, dentre as quais incluem-se leucócitos polimorfonucleares, mastócitos, macrófagos, células decíduais etc. Coletivamente, os eventos bioquímicos resultantes da ação destes mediadores no sistema reprodutor promovem vasodilatação, hiperemia, exudação, edema, colagenólise, proliferação celular, remodelação tecidual e outras alterações típicas dos tecidos inflamados. É interessante salientar também que, como regra geral, os fenômenos reprodutivos normais parecem requerer pelo menos algum grau de lesão tecidual, como ocorre por exemplo durante a ovulação, menstruação, ovoimplantação uterina e parto.

1.2.1. Período pré-implantação

As prostaglandinas são reconhecidas há bastante tempo como importantes reguladoras dos processos reprodutivos (LAU et al., 1973) e nos

anos recentes têm recebido considerável atenção como mediadoras da função ovariana. Foi descrito que a concentração das prostaglandinas da série E e F aumenta nos folículos ovarianos durante as primeiras horas do processo ovulatório, atingindo o pico no período de ruptura folicular e, logo após, declinam aos valores pré-ovulatórios (ESPEY, 1994). Está também estabelecido que estas moléculas podem agir como pró- ou antiinflamatórias nos tecidos ovarianos, onde sua produção é estimulada pelas gonadotropinas, mas não parecem regular o aumento da síntese de progesterona durante a ovulação, tendo em vista que a luteinização progride nos animais tratados com indometacina (ESPEY, 1994). Todavia, na rata e em várias espécies domésticas, as prostaglandinas estão claramente envolvidas na regressão do corpo lúteo, um fenômeno intensamente mediado pela prostaglandina F2 α (MOTA et al., 1999). Durante o processo ovulatório, as prostaglandinas participam presumivelmente da degradação proteolítica do tecido conjuntivo da teca na parede folicular, mas a natureza desta mediação ainda não foi esclarecida. ESPEY (1994) sugere que as DAINES sejam capazes de inibir a ovulação por impedir a motilidade dos fibroblastos e, assim, reduzir a dissociação celular da túnica albugínea e da teca externa no ápice folicular ou, alternativamente, possam alterar a vasculatura ovariana de modo a diminuir a pressão sangüínea e atenuar a pressão hidrostática dentro do folículo, que é essencial à sua ruptura. Deve ser levado em conta, entretanto, que várias outras moléculas associadas à cascata inflamatória têm sido estudadas e parecem também ter papel no desenvolvimento folicular, ovulação e controle da função do corpo lúteo, incluindo-se o fator de ativação plaquetária,

histamina, bradicinina e outras cininas, leucotrienos, óxido nítrico, citocinas etc (ESPEY, 1992). Informações recentes sugerem que IL-1 β e TNF α estão implicados como mediadores da ovulação, por promover desenvolvimento e maturação folicular e luteólise, podendo ser produzidos pelos oócitos, células da granulosa, células lúteas e endoteliais e pelos macrófagos no ovário (RUTANEN, 1993). Em condições normais, a concentração plasmática de IL-1 β na mulher encontra-se abaixo do nível de detecção, exceto após a ovulação (CANNON e DINARELLO, 1985). Além disso, estudos com várias espécies de animais mostram que os ovários são sítios de ação de IL-1 (SIMÓN e POLAN, 1994) e nos modelos animais a IL-1 demonstra efeito antigonadotrópico (FUKUOKA et al., 1988; GOTTSCHALL, 1987) e esteroidogênico (NAKAMURA et al., 1990). Mais recentemente, BILI et al. (1998) evidenciaram que IL-1 β e TNF α podem participar do processo de degradação da parede dos folículos normais, tendo sugerido que a concentração desta citocinas no líquido folicular se correlaciona positivamente com a fertilização dos oócitos. De fato, durante a embriogênese, as células germinativas primordiais, já visíveis no saco vitelínico na quarta semana de gestação, são mantidas inicialmente por citocinas através de mecanismos autócrinos e parácrinos, e não por gonadotrofinas ou esteróides sexuais de origem hipotálamo-hipofisária. Portanto, as citocinas estão entre os primeiros fatores reguladores do desenvolvimento gonadal (GOSDEN e SPEARS, 1997) e, assim sendo, não é surpreendente que continuem a participar do controle da função ovulatória após o nascimento. No animal animal adulto, contudo, está claro que as gonadotrofinas hipofisárias são necessárias para a maturação

folicular, ovulação, produção de esteróides e manutenção do corpo lúteo, mas suas ações, parecem ser mediadas por moléculas intraovarianas (HUNT, 1993; SIMÓN e PÓLAN, 1994; NIE et al., 1997). As citocinas podem também agir de forma autócrina, parácrina ou endócrina e atuar em diversos níveis do eixo hipotálamo-hipófisário-gonadal, por mecanismos diretos e indiretos (RIVIER e VALE, 1989; SIMÓN e POLAN, 1994).

Ao final do ciclo reprodutivo normal da mulher, em virtude da queda dos níveis de progesterona resultante da destruição do corpo lúteo, ocorre a menstruação, que também tem sido comparada a uma reação inflamatória onde participam mastócitos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos, interagindo com as células do estroma e epitélio endometrial, levando a uma produção abundante de citocinas, prostaglandinas e metaloproteinases, as quais, por sua vez, conduzem à degradação tissular (SALAMONSEN e WOOLEY, 1999). A progesterona parece participar da regulação da expressão dos mediadores inflamatórios como IL-8 e proteína quimioatrativa tipo 1 derivada de monócitos e da expressão de COX-2, além do recrutamento das subpopulações de leucócitos para o endométrio, principalmente os linfócitos granulares grandes CD56+ e macrófagos, durante o ciclo menstrual e início da gravidez (CRITCHEY et al., 1999). HUNT, em 1993, propôs um modelo básico de regulação do ciclo menstrual em que o $\text{TNF}\alpha$ em baixas concentrações, sob estímulo dos estrógenos durante a fase inicial do ciclo, promoveria a síntese de DNA nas células do epitélio e do estroma uterino agindo em receptores para $\text{TNF}\alpha$ tipo II, em seguida, altos níveis de $\text{TNF}\alpha$ produzidos pelas células endometriais pela ação

combinada de estrógeno mais progesterona, culminaria com citólise e menstruação atuando em receptores de $\text{TNF}\alpha$ tipo I. Há também estudos demonstrado que o $\text{TNF}\alpha$ pode influenciar a migração de leucócitos para o endométrio e apoptose das células endometriais (TERRANOVA et al., 1995).

Se houver fertilização do oócito após a ovulação, contudo, a preparação uterina que se segue à ovulação deve estar temporariamente em fase com o desenvolvimento do blastocisto para o sucesso da gravidez, principalmente nos animais nos quais a ovulação é induzida pelo coito (NIE et al., 1997). Assim sendo, o sucesso da gravidez depende também do transporte dos zigotos através do oviduto num ritmo apropriado, de tal modo que cheguem ao útero no estágio de blastocisto. A passagem dos zigotos nos roedores é influenciada pelos esteróides ovarianos: os estrógenos facilitam a motilidade do oviduto, enquanto a progesterona, em menor grau, retarda a contratilidade do órgão (KAPLAN-KRAICER et al., 1996). Durante o ciclo estral da rata, os oócitos ficam retidos no oviduto quando a concentração de estradiol na veia uterina diminui, em virtude da menor taxa de síntese deste hormônio (FORCELLEDO e CROXATTO, 1986). Na rata grávida, em função do alto nível circulante de estradiol, ocorre um transporte mais acelerado do zigoto através do trato genital (FORCELLEDO et al., 1986). Além disso, a taxa de crescimento dos embriões no oviduto também é influenciada pelo ambiente hormonal (KAPLAN-KRAICER et al., 1996). Em que pese não haver ainda trabalhos com experimentos sistemáticos estabelecendo os mecanismos regulatórios para a expressão de citocinas nos vários tipos de células do oviduto, observações

preliminares sugerem que a progesterona pode promover a expressão de $\text{TNF}\alpha$ no oviduto de roedores (TERRANOVA et al., 1995). Consistente com a função do $\text{TNF}\alpha$ na inflamação, a indução de infecção (*Chlamydia trachomatis*) no oviduto do camundongo resulta em elevação nos níveis de RNAm para o $\text{TNF}\alpha$ nas células semelhantes a macrófagos residentes no estroma do oviduto, bem como no tecido conjuntivo adjacente às camadas de músculo liso do órgão (TERRANOVA et al., 1995), sugerindo que as citocinas possam interferir na motilidade do oviduto e no transporte do ovo fertilizado para o útero. É interessante salientar que o acasalamento em roedores desencadeia uma reação semelhante à inflamação no endométrio, mas não no oviduto, com liberação de GM-CSF pelas células endometriais, que é mediada por fatores derivados das glândulas vesiculares presentes no ejaculado, tais como o fator de crescimento transformador beta 1 ($\text{TGF}\beta 1$), e caracterizada por extensa infiltração e ativação de macrófagos, células dendríticas e granulócitos (TREMELLEN et al., 1998). Portanto, as citocinas parecem ser fatores importantes para modular de forma específica a dinâmica celular do oviduto e do útero em resposta aos hormônios sexuais durante o ciclo reprodutivo, bem como em resposta ao acasalamento no período antecede a implantação do blastocisto. O desenvolvimento pré-implantação do embrião até a formação do blastocisto parece ocorrer, contudo, independente de fatores de crescimento exógenos (STEWART e CULLINAN, 1997). De fato, na maioria dos casos, são os sinais do blastocisto, particularmente do trofoectoderma, em conjunção com hormônios da hipófise, como a prolactina, que mantém o corpo lúteo da gravidez na rata, garantindo a produção de

progesterona, um hormônio essencial tanto para a implantação do blastocisto, quanto para a manutenção da gravidez após a implantação.

1.2.2. Período de implantação

Estima-se que mais de 30% das perdas fetais em mulheres seja causada por inibição da implantação do blastocisto (TODER et al., 1991; SAVION et al., 1996), mas as razões para isso são geralmente desconhecidas. Está claro que o desenvolvimento normal da gravidez implica num delicado processo de comunicação celular entre o endométrio, o estroma uterino e o miométrio e que dentre as moléculas mediadoras envolvidas neste processo os prostanóides e as citocinas demonstram ter papel fundamental (GRAVANIS et al., 1999). Reconhece-se também que o processo de preparação uterina, que antecede a ovoimplantação, ocorre sob a influência dos esteróides sexuais, estrógeno e progesterona. Surgiram, entretanto, evidências de que os efeitos destes hormônios na proliferação e diferenciação das células uterinas sejam mediados pela produção local de fatores de crescimento, citocinas e eicosanóides (LOPATA, 1996). Os alvos primários dos esteróides ovarianos são as células epiteliais e do estroma uterino no endométrio. O estroma endometrial, além das células semelhantes a fibroblastos, consiste de endotélio vascular e de uma grande população de células linfóides residentes (TABIBZADEH, 1991), que participam dos mecanismos de reconhecimento embrionário e defesa uterina contra tumores. Portanto, durante a implantação do blastocisto, os tecidos fetais e o trofoblasto podem ser alvos para as células de defesa residentes no útero, como

os macrófagos, por exemplo, e mesmo células migrantes, como os leucócitos polimorfonucleares, que podem agir de forma direta ou indireta modulando a produção de mediadores locais. Isto sugere que, para a gravidez prosseguir com sucesso tanto o sistema antígeno-específico quanto a imunidade inespecífica devem ser inibidos, principalmente durante o início do processo de implantação.

A implantação do blastocisto é um processo complexo no qual ocorre a aposição, aderência e invasão do endométrio pelo trofoblasto, uma camada celular que envolve os tecidos do embrião. Em resposta a esta interação desencadeia-se uma reação celular no endométrio que se assemelha à invasão tumoral e tem também características semelhantes a uma reação inflamatória. Comumente, como ocorre com os tumores e a inflamação, há síntese e liberação de moléculas biologicamente ativas, incluindo as PAF, óxido nítrico, citocinas, prostaglandinas etc, no sítio de implantação e ao seu redor (GAGIOTE et al., 2000; RICE e CHARD, 1998). De uma maneira geral, na medida em que existe uma maior invasão endometrial pelo embrião, como nos roedores e humanos, o útero responde com um mais intenso crescimento e diferenciação das células do estroma e dos vasos sanguíneos. Nesse contexto, a progesterona, além de participar da preparação uterina para nidação, é capaz de suprimir e controlar a reação inflamatória decidual, que se fora exacerbada poderia ocasionar inclusive impedimento da implantação (FINN, 1998). Inúmeras citocinas têm sido implicadas na ovoimplantação, todavia, algumas parecem ser essenciais incluindo-se o fator inibidor da leucemia (LIF), CSF-1, IL-6 e IL-1 (NIE et al., 1997). O envolvimento da IL-1 na função endometrial e implantação tem sido

amplamente estudado, mas o dado mais convincente de que esta citocina participa do processo de implantação foi obtido pela inibição da ovoimplantação uterina pelo bloqueio do receptor de IL-1 tipo I com IL-1ra por SIMON et al. em 1994. Além disso, IL-1 é capaz de estimular a expressão de IL-6 no epitélio uterino (LIARD et al., 1994). SIMON et al. (1998) demonstraram que a IL-1 β produzida pelo embrião pode contribuir para a ovoimplantação uterina pela indução da expressão de integrina beta 3, um marcador de receptividade uterina. Já foi demonstrado também que a IL-1 β , bem como o receptor de IL-1 tipo I e IL-1ra são produzidos pelos embriões humanos, mas não pelos espermatozóides maduros (DE LOS SANTOS et al., 1998); o mesmo estudo sugere que a ausência do sistema da IL-1 nos oócitos não fertilizados indica que IL-1 de origem materna não contribui para o desenvolvimento embrionário na fase de pré-implantação. O CSF-1, por sua vez, aumenta de concentração em cerca de 1000 vezes durante o período de implantação no camundongo (BARTUCCI et al., 1986; POLLARD et al., 1987). Evidência direta da participação do CSF-1 na implantação foi obtida com o cruzamento de camundongos homozigotos com ausência total de CSF-1, que são inférteis (POLLARD et al., 1991). Um grande número de outras moléculas: proteases, fatores de crescimento e citocinas têm sido também associadas a invasão do blastocisto e implantação (NIE et al., 1997). No que se refere ao TNF α , está demonstrado que os oócitos de ratos e camundongos expressam TNF α (CHEN et al., 1993; MARCINKIEWICZ et al., 1994), mas esta citocina não é detectada nos estágios de duas e quatro células, mórula ou blastocisto (HUNT et al., 1993), sugerindo que o TNF α presente nos

oócitos é de origem materna. YELAVARTHY et al. (1991) foram os primeiros a demonstrar que células não-linfóides são capazes de induzir a transcrição e translação do gene de $\text{TNF}\alpha$ no trato reprodutivo feminino (TERRANOVA et al., 1995). Pouco tempo depois PAMPFER et al. (1993) demonstraram a existência de receptores tipo I e II para $\text{TNF}\alpha$ nos embriões pré-implantação em camundongos. Mais recentemente, TABIBZADEH (1998) propôs que, dentre as moléculas que tornam o endométrio receptivo encontram-se várias citocinas, integrinas, proteínas do choque térmico, tastina e trofonina, tendo sugerido também que o $\text{TNF}\alpha$ pode estar associado ao fechamento da janela de implantação, tornando o endométrio refratário para a ovoimplantação e preparando-o para a menstruação. Por outro lado, a demonstração da existência de $\text{TNF}\alpha$ na decídua, sobrenadantes de decídua e placenta e fluido amniótico (JAATTELA et al., 1988), bem como a identificação de receptores de TNF nas células da placenta (EADES et al., 1988), e RNAm para $\text{TNF}\alpha$ em mulheres sem qualquer sinal de infecção, sugere que esta citocina participa da função endometrial e na interação endométrio-trofoblasto (TABIBZADEH, 1991). Além disso, já foram detectados os dois tipos de receptores para $\text{TNF}\alpha$ no plasma e urina maternos, urina fetal e líquido amniótico durante a gravidez normal (MAYMON et al., 1999). Certamente os esteróides sexuais são importantes para a regulação dos níveis teciduais das citocinas nos órgãos reprodutivos, mas se torna difícil testar esta hipótese porque a gravidez não se mantém em animais na ausência destes hormônios; o mesmo ocorrendo em relação aos estudos com o metabolismo do ácido araquidônico. Paralelamente, foi descrito que durante a

maior parte da gravidez, o RNAm para o TNF α e a própria proteína parecem ser estocadas nos macrófagos e células assassinas naturais (*Natural Killer cells*) uterinos e, além disso, como a IL-10 é a citocina mais abundante do útero do camundongo durante a gravidez, esta molécula tem sido apontada como sendo capaz regular a síntese de TNF α no útero grávido por um mecanismo de retroalimentação negativa (TERRANOVA et al., 1995). É interessante salientar que a gestação progride normalmente no camundongo transgênico deficiente do receptor de TNF α tipo I (PFEFFER et al., 1993). Esta observação, aparentemente contraditória, sugere que fatores com atividades similares ao TNF α , tais como a IL-1, podem compensar sua ausência (TARTAKOVSKY e BEM-YEAR, 1991). Ao se estudar a rede de citocinas verifica-se outras evidências de redundância, pois sabe-se que camundongos deficientes de genes expressos no útero, placenta e/ou embrião durante a gravidez reproduzem-se normalmente (SHULL et al., 1992; DALTON et al., 1993; HUANG et al., 1993). O TNF α e a IL-1 β também têm sido implicados em certos cânceres de epitélio ovariano (TERRANOVA et al., 1995). Assim sendo, drogas que bloqueiem a ação das citocinas podem ser úteis como instrumentos para estudo da função do sistema reprodutor ou na terapêutica das doenças reprodutivas.

1.2.3. Período pós-implantação

Recentemente, as citocinas derivadas das células Th2 (IL-3, IL-4, IL-10 etc) foram apontadas como parte da barreira placentária que contribui para o sucesso da gravidez alogênica, sendo o trofoblasto sua fonte principal na

interface materno-fetal (CHAOUAT et al., 1999). Por outro lado, nas mulheres com preeclâmpsia ocorre a diminuição do nível de IL-10 no soro e no trofoblasto viloso, com concomitante aumento do TNF α na placenta, o que tem sido associado a uma elevada imunidade antifetal e inadequado desenvolvimento placentário (HENNESSY et al., 1999). Sabe-se também que na gravidez ocorre um estado de equilíbrio imunológico em que o sistema imunológico materno deve ser tolerante aos antígenos do complexo de histocompatibilidade principal paternos, mas manter-se competente para defender-se de microorganismos, tumores etc. Nesse sentido, as células do trofoblasto não expressam moléculas do complexo de histocompatibilidade das classes I ou II e, além disso, o citotrofoblasto extraviloso expressa um complexo de histocompatibilidade denominado HLA-G, que é capaz de reduzir a atividade das células assassinas naturais (*Natural killer cells*) e linfócitos T citotóxicos. Além disso, o trofoblasto expressa o ligante Fas: as células imunológicas maternas que expressam receptor para o Fas na interface placenta/decídua entram em apoptose. Num estudo bastante recente, PHILLIPS et al. (1999) descrevem que o sinciciotrofoblasto, uma camada tecidual continuamente exposta ao sangue materno, expressa o sistema TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2L*) e seus receptores, que também participam da indução de apoptose em macrófagos e linfócitos, contribuindo para a proteção fetal. Um terceiro mecanismo de proteção usado pelo trofoblasto é a expressão de proteínas regulatórias do complemento CD46, CD55 e CD59. Acrescente-se a isso a ação dos hormônios da gravidez no timo e linfócitos B que tendem a contribuir para a

imunossupressão e alterar os níveis de células T locais e sistêmicas (WEETMAN, 1999). É importante destacar que, embora as citocinas derivadas das células Th1 (IL-2, IFN γ) não sejam expressas pelos vilos coriônicos no início da gravidez (provavelmente pela ação inibitória da IL-10), as citocinas derivadas de macrófagos, TNF α e IL-1 β , são expressas no cório e sua regulação parece ser crítica para a sobrevivência do feto.

Várias revisões recentes documentam que IL-1 β e TNF α são sintetizados no trato reprodutivo feminino, na placenta e no embrião, tendo sido implicados como mediadoras centrais no desenvolvimento de folículos e gametas, esteroidogênese, ciclicidade uterina, diferenciação placentária, desenvolvimento embrionário e parto (HUNT, 1993; RUTANEN, 1993; SIMÓN e POLAN, 1994; TERRANOVA et al., 1995). Os níveis de IL-1 e TNF nos tecidos reprodutivos, por sua vez, parecem ser controlados de forma complexa pelos esteróides sexuais femininos, estrógenos e progesterona durante a gestação (TABIBZADEH et al., 1999). Recentemente, ROBY et al. (1999), contrariando o achado de PFEFFER et al. (1993), demonstraram que camundongos deficientes do receptor de TNF α tipo I apresentam baixa fertilidade e senescência reprodutiva precoce: aos 6 meses de vida somente 40% destes animais apresentam ciclos estrais. NAITO et al. (1999), por sua vez, mostraram que camundongos deficientes de TRAF-6, um membro da família de fatores associados ao receptor de TNF, dentre outros distúrbios, apresentam falha na organogênese dos linfonodos. Além disso, camundongos deficientes na enzima conversora de TNF apresentam alta letalidade perinatal (KILLAR et al., 1999). Nesta mesma linha de raciocínio, LI

et al. (1999) mostraram que camundongos com deleção no *locus* IKKbeta morrem na metade da gestação, por apoptose hepática descontrolada, de forma semelhantes aos camundongos deficientes do NFkappaB (DOI et al., 1999). IKKbeta é uma das três subunidades componentes da IKKbeta quinase, sendo o componente principal envolvido na indução desta enzima e na sinalização através de NF-kappaB, um mecanismo fundamental na ação de citocinas. Assim sendo, além da atuação direta das próprias citocinas, alguns elementos que participam das vias de sinalização celular desencadeadas por citocinas ou que participam de sua produção, também parecem ter importância durante várias fases da gestação. Estudos demonstram também que IL-1 β e TNF α participam da regulação da função reprodutiva através de mecanismos indiretos mediados por prostaglandinas (POLLARD et al., 1994; ARSLAN e ZINGG, 1996; POMINI et al., 1999).

PSYCHOYOS (1966) foi um dos primeiros a reconhecer que uma reação pró-inflamatória, acompanhada por aumento de permeabilidade vascular, é geralmente observada nos sítios de implantação uterina, tendo sido considerada um pré-requisito para a ovoimplantação. Posteriormente, foi demonstrado que esta reação é em grande parte mediada por prostaglandinas de origem materna e embrio-fetal e pode ser inibida pelas DAINES (KENNEDY, 1980; HAMILTON e KENNEDY, 1994; PAKRASI, 1997). De fato, atualmente está muito bem estabelecido que as prostaglandinas E, F e I participam na ovoimplantação e decidualização (NAVARO et al., 1996; KENNEDY et al., 1999; LIM et al., 1999), gravidez e parto na rata (BRODT-EPPLEY e MYATT, 1998). Além

disso, a deficiência ou produção exagerada das prostaglandinas tem sido associada à infertilidade (RAITER-TENENBAUM et al., 1998) e ao câncer de mama (BADAWI e ARCHER 1998). Por outro lado, a inibição da biossíntese de prostaglandinas tem sido considerada a base para o uso das DAINES tradicionais no tratamento de distúrbios menstruais, como a dismenorréia e a menorragia (LINDNER et al., 1980), e também para explicar seus efeitos adversos associados à reprodução, tais como prolongamento da gestação e do parto na mulher e a persistência do *ductus arteriosus*, disfunção renal e anormalidades hemostáticas no feto e no neonato (OSTENSEN, 1998).

A biossíntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico é dependente da expressão da enzima prostaglandina H₂ sintetase, também denominada ciclooxigenase (COX), a partir da qual, recentemente, foram identificadas, caracterizadas e clonadas duas isoformas, às quais se denominou COX-1 e COX-2 (SMITH e DEWITT, 1996). Estudos demonstram que seu padrão de expressão e regulação difere de acordo com a célula em que se encontra (HERSCHMAN, 1994; WILLIAMS e DUBOIS, 1996), do mesmo modo que sua sensibilidade às DAINES (BOERBOOM e SIROIS, 1998). A isoforma COX-1 é amplamente distribuída no corpo e sua expressão constitutiva é tida como necessária às funções normais do organismo, tais como proteção do estômago, homeostase vascular e função renal, ao passo que a isoforma COX-2 é altamente induzível sob a influência de muitos fatores de crescimento e citocinas, encontrando-se expressa em elevados níveis nos sítios inflamatórios (MITCHELL et al., 1993; VANE e BOTTING, 1998). Em face ao conhecimento

atual, tem sido sugerido que os efeitos colaterais das DAINES, tais como a ulceração gastrointestinal e a hemorragia, por exemplo, são uma consequência direta da inibição da COX-1 (SMITH, 1998), de modo que, os compostos mais seletivos para a COX-2 podem ter maior eficácia e tolerabilidade (VANE, 1994; WARNER et al., 1999). Além disso, foi recentemente descrito que o uso crônico das DAINES está associado a um retardo na progressão do câncer de cólon e da doença de Alzheimer em seres humanos (VANE e BOTTING, 1998). Estes fatos abriram a possibilidade para o desenvolvimento de novos compostos que apresentem maior seletividade de inibição para a isoforma COX-2, a serem utilizados na terapêutica da inflamação, dor e doenças degenerativas. Contudo, foi também observado que a expressão da COX-2 é crítica para a manutenção da função do rim, pulmão, intestino, cérebro, medula espinhal, ovários e útero, em condições fisiológicas e fisiopatológicas (LIPSKY, 1999), o que ainda sugere a necessidade de cautela com o uso clínico de inibidores seletivos de COX-2.

Crescentes evidências demonstram que as enzimas COX desempenham um papel fundamental na reprodução, o que inclui seu envolvimento no processo de ovulação e regressão do corpo lúteo (BOERBOOM e SIROIS, 1998; CHARPIGNY et al., 1997), decidualização (YEE e KENNEDY, 1988), desenvolvimento embrionário e feto-placentário (SONG et al., 1998), gravidez (SLATER et al., 1999) e no parto (MACCHIA et al., 1997) de inúmeras espécies, inclusive a humana. O aumento da síntese de prostaglandinas no útero durante o parto normal tem sido associado à expressão e atividade da isoforma COX-2, tendo sido proposto que as DAINES mais seletivas para esta isoforma enzimática

podem ter eficácia como tocolíticas, com ação semelhante às DAINES não-seletivas, sem, contudo, apresentarem as limitações comuns a estas drogas, tais como efeitos colaterais maternos e fetais, que se crê serem mediados pela inibição da COX-1 (SLATER et al., 1998). Em roedores, a enzima COX-1 é expressa no endométrio durante todas as fases do ciclo estral normal, enquanto que a COX-2 foi detectada somente no diestro, proestro e estro, sugerindo um mecanismo de indução dependente de estradiol (SHODA et al., 1995). É importante considerar, entretanto, que as funções da COX-1 e da COX-2 não podem ser tão estritamente separadas, pois a COX-2 também pode ser expressa como reação a vários estímulos fisiológicos, não relacionados a inflamação (BIJLSMA e VAN DE PUTTE, 1998).

Recentemente, estudos com camundongos deficientes de COX têm permitido a investigação da participação das isoformas de COX-1 e COX-2 na susceptibilidade ao câncer, ulceração gástrica, na resposta inflamatória e no processo reprodutivo feminino, visando estabelecer, quando possível, uma comparação entre a ablação genética da COX e a inibição farmacológica da atividade desta enzima pelas DAINES (LANGENBACH et al., 1995). Estudos de MORHAM et al. (1995) e de DINCHUK et al. (1995) indicam que o camundongo deficiente de COX-2, produzido por ablação genética do gene específico da enzima por recombinação homóloga, apresenta uma baixa sobrevivência causada primariamente por hipoplasia do néfron e displasia renal. Aos 3 dias de vida os rins deste animal apresentam-se morfológicamente normais, mas demonstram hipoplasia do néfron no 6^o dia de vida e fibrose intersticial

secundária na vida adulta, sugerindo que o desenvolvimento renal pós-natal neste animal depende pelo menos em parte da indução da COX-2. DINCHUK et al. (1995) também demonstraram a presença de fibrose cardíaca em 50% dos camundongos deficientes de COX-2, enquanto que o estudo de MORHAM et al. (1995) não discutiu este achado. Estes autores demonstraram também que o camundongo do sexo feminino deficiente da COX-2 apresenta infertilidade: seus ovários são menores, com ausência de corpos lúteos, em comparação ao animal normal. Este resultado é consistente com o papel da COX-2 na indução da ovulação proposto por SIROIS et al. (1993), no qual demonstram que o estrógeno induz a expressão de COX-2 nas células da granulosa no ovário e que esta enzima tem importância crítica na indução da ovulação.

Ao final do período de gestação inicia-se a via terminal do parto, que envolve a contratilidade miometrial, degradação da matriz extracelular nas membranas fetais levando a ativação e ruptura destas membranas, relaxamento cervical e possivelmente apoptose. O parto normal é, portanto, o resultado da atuação seqüencial de numerosos mediadores, incluindo-se hormônios esteróides e peptídicos, prostaglandinas, citocinas etc. Apoiando esta visão, estudos em camundongos com deleção de genes da esteróide 5α -redutase tipo I, receptor de $\text{PGF}2\alpha$, fosfolipase A2 citosólica ou relaxina resultaram em distúrbios durante o parto (KIMURA et al., 1999). Além disso, recentemente THOMSON et al. (1999) demonstram que neutrófilos e macrófagos infiltram-se no miométrio durante o trabalho de parto, indicando que as células inflamatórias também fazem parte do mecanismo fisiológico do parto. É importante salientar que, ao contrário

do que ocorre em roedores, a concentração de progesterona não diminui no sangue periférico durante o parto normal em mulheres (NISHIZAWA et al., 2000). Todavia, foi proposto um modelo mecanístico para o parto na mulher em que, após o processo de remodelação e relaxamento da cérvix pela ação da progesterona e relaxina ao longo do período final da gravidez, as ações da progesterona, como, por exemplo, a redução da expressão de conexinas no miométrio, sejam antagonizadas por citocinas como $TGF\beta$, $IL-1\beta$ e $TNF\alpha$ (uterotropinas) produzidas pelo feto, decídua e mesmo pelo miométrio durante o processo de trabalho de parto, favorecendo a atuação das uterotoninas (PGE , $PGF2\alpha$, PAF, endotelina-1 etc) na contratilidade miometrial (KNISS e IAMS, 1998; HATTHACHOTE e GILLESPIE, 1999). Neste contexto, é plausível se supor que as citocinas e prostaglandinas possam ter importância também como desencadeadoras do parto prematuro e no prolongamento anormal da gravidez.

1.3. Evolução do conceito de artrite reumatóide e de seu tratamento farmacológico

Embora as evidências de existência da doenças similares à AR sejam tão antigas que já tenham sido descritas inclusive nas múmias egípcias, somente no século XVI SYDENHAM foi capaz de diferenciar o “reumatismo” agudo e o crônico. Muitos anos depois, em 1859, o termo artrite reumatóide foi introduzido por Sir ARCHIBALD B. GARROD, médico do West London Hospital. É

preciso ter em mente que, com esta terminologia, GARROD pretendia dizer que, em algumas de suas características, a doença que ele chamou de artrite reumatóide – e que até então era conhecida como gota reumática – era semelhante à febre reumática. O mérito de GARROD ao criar o termo artrite reumatóide foi reconhecer que esses pacientes não tinham nem gota nem “reumatismo” (febre reumática). “Reumatismo”, um termo introduzido por Dioscórides e relacionado às idéias medievais e pré-medievais das “reumas”, de fato, não existe como entidade clínica. Existe sim um coletivo de mais de cem doenças tratadas de forma diferenciada na reumatologia e classificadas como fruto do desenvolvimento científico e da observação perspicaz (SILVA, 1999).

Os conceitos de autoimunidade e autoanticorpos, por exemplo, oriundos de estudos com a imunologia da glândula tireóide, foram estendidos no início da década de 50 às doenças crônicas como a AR. Entretanto, somente no final dos anos 50 a membrana sinovial passou a ser vista como um sítio privilegiado para a resposta imunológica, por possuir uma camada de revestimento de células fagocitárias e um estroma vascular adaptado para a mobilização e proliferação de linfócitos. Propunha-se que antígenos não-identificados, localizados na cavidade articular estimulariam a produção local de anticorpos, os quais combinavam-se na membrana sinovial, ativando o sistema complemento e gerando vários materiais biologicamente ativos, dentre os quais incluiriam-se alguns potentes agentes quimiotáticos. Estes agentes seriam responsáveis pela atração de leucócitos polimorfonucleares para a articulação onde estas células passariam a ingerir os complexos e, durante a fagocitose, os neutrófilos e outras células

fagocitárias liberariam seus grânulos lisossômicos contendo enzimas hidrolíticas, que seriam as moléculas responsáveis pela proliferação e destruição vistas na AR (HOLLANDER et al., 1965; WEISSMAN, 1972; ZIFF, 1965; ZVAIFLER, 1965).

Subseqüentemente um esforço considerável foi dirigido à identificação dos fatores quimiotáticos presentes no fluido articular. Contudo, não estava esclarecido se uma hipótese única – uma doença causada por imune-complexos extravasculares (ZVAIFLER, 1973) – poderia explicar toda a patologia da AR, ou, alternativamente, se ocorreriam eventos específicos na sinóvia, fluido articular, cartilagem etc. Era difícil explicar, por exemplo, certos eventos como a invasão da cartilagem pelas células da membrana sinovial, um processo no qual as células migrantes parecem ter importância menor. Verificou-se, então, que os imune-complexos eram capazes de penetrar a matriz cartilaginosa e se acumular abaixo da superfície articular (COOKE et al., 1975). Ainda assim, isto não explicava adequadamente a destruição generalizada dos condrócitos observada na artrite, um processo que, atualmente, se atribue à participação de citocinas e óxido nítrico (BLANCO et al., 1995; CLANCY et al., 1998). Não havia também uma hipótese plausível para explicar o fato de os sinoviócitos saírem de sua localização normal no recesso da articulação e invadirem a cartilagem articular. A fixação do complemento e a geração de fatores quimiotáticos não são suficientes para explicar tal evento, pois a distância a ser percorrida pelos sinoviócitos é muito grande. Sabe-se hoje que o ambiente inflamatório no qual residem pode induzir a produção de moléculas de adesão de superfície celular

(integrinas) e a ativação de certos genes que favorecem a ligação dos sinoviócitos à superfície da cartilagem (ELICES et al., 1994; HUMPHRIES et al., 1987; RUOSLAHTI, 1988; SCHIOZAWA, 1992). WAHL et al. (1994) demonstraram que determinados peptídeos derivados da fibronectina reduzem o aumento de volume articular no modelo de artrite induzido por parede celular de *streptococcus* no rato. Esta ação antiinflamatória foi atribuída a uma diminuição da adesão e recrutamento de leucócitos para a articulação, mas o bloqueio da fibronectina CS-1, um contra-receptor para a integrina $\alpha 4\beta 1$, nas células endoteliais e sinoviócitos sugere que também pode haver interferência com a migração celular internamente nos tecidos inflamados (ZVAIFLER, 1996).

Existe há muitos anos uma concordância geral de que o *pannus* inflamatório seja responsável pela destruição da cartilagem articular, mas não existe consenso a respeito dos mecanismos através dos quais isso ocorre. KRANE e colegas, na metade da década de 60, demonstraram que, quando fragmentos da sinóvia inflamada são mantidos em cultura com géis de colágeno, o substrato é lisado ao redor dos fragmentos. Colagenases ativas e latentes foram identificadas tanto na sinóvia quanto no fluido sinovial. O tecido sinovial foi, então, digerido enzimaticamente e separado em duas subpopulações celulares: aderentes e não-aderentes, no intuito de definir a contribuição das células individuais. As células aderentes foram posteriormente classificadas em dois grupos: células pequenas redondas com características de monócitos e células semelhantes a fibroblastos. Distribuídas entre os sinoviócitos tipo fibroblasto,

foram notadas outras células grandes apresentando processos longos, às quais foram denominadas células estreladas (ZVAIFLER, 1996).

Inicialmente foram estudados dois marcadores de função celular na sinóvia: collagenase e prostaglandina E_2 ; produtos provavelmente envolvidos na destruição da cartilagem articular. Contraditoriamente, os fibroblastos sinoviais não produziram collagenase em níveis detectáveis. A combinação das duas populações de células aderentes, presentes na cultura primária da sinóvia inflamada, promoveu uma produção abundante de collagenase mas, após algumas semanas, a quantidade de collagenase e prostaglandina E_2 produzida diminuiu até desaparecer inteiramente. Pouco tempo depois os monócitos/macrófagos também desapareciam completamente da cultura. Os investigadores propuseram que a síntese da enzima era dependente da comunicação intercelular, por contato direto ou através de mediadores solúveis, e que a relação entre as células da sinóvia inflamada eram complexas: os macrófagos eram ativados por linfócitos e estes por sua vez estimulavam as células sinoviais estreladas (fibroblastos) a produzir moléculas modificadoras da matriz (KRANE, 1981; DAYER et al., 1986). Ainda mais importante foi o reconhecimento de que estas interações eram mediadas, pelo menos em parte, por fatores solúveis, dentre os quais estava um princípio derivado de monócitos com peso molecular de 14-25 kDa, denominado de fator de células mononucleares (MCF). Foi observado logo a seguir que o MCF tinha propriedades semelhantes à recentemente descrita molécula de IL-1; DAYER demonstrou que o MCF e a IL-1 recombinante humana eram idênticos

(KRANE, 1981). Assim se iniciou o período de análise de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento presentes na AR (ZVAIFLER, 1996).

Um aspecto importante evidenciado nos estudos subsequentes foi a demonstração de que os produtos derivados de linfócitos T, tais como IFN γ e IL-2 (proteínas ou níveis de RNAm) ou mesmo produtos exclusivos de linfócitos T como a IL-4, eram escassos no líquido sinovial e nos tecidos inflamados (FIRESTEIN e ZVAIFLER, 1987; FIRESTEIN et al., 1988; MIOSSEC et al., 1990). Quando fatores produzidos por múltiplos tipos celulares, tais como IL-6 ou TNF, foram analisados, sua fonte era sempre outras células, mas não os linfócitos T (FIRESTEIN et al., 1990). Os fatores derivados de macrófagos e sinoviócitos, por outro lado, eram abundantes e seu papel central na inflamação articular foi demonstrado em animais experimentais e humanos por estudos como o de FELDMANN et al. (1996). Foi proposto, então, que a interação autócrina/parácrina entre citocinas de fibroblastos e macrófagos poderia perpetuar a AR, mesmo na ausência de estimulação antigênica, sem excluir a participação do linfócito T na iniciação da doença, mas implicando numa importância menor do linfócito à medida em que a mesma progride. Destes trabalhos resultaram estratégias promissoras para o tratamento da AR. Por exemplo, o tratamento clínico empregando anticorpos monoclonais contra o TNF α em pacientes com AR promoveu uma considerável melhora clínica, comparado às terapias tradicionais dirigidas aos linfócitos T (ELLIOTT et al., 1994). Permanece, contudo, a ser determinado, se as terapias anti-TNF poderão

controlar a longo prazo a inflamação articular e eliminar a destruição da cartilagem observadas durante a AR.

Ainda hoje, continua há haver desacordo em relação à contribuição das citocinas produzidas pelos linfócitos T na patogênese da AR. É inquestionável que, na maioria dos casos de AR há grande número de linfócitos T CD4+ de memória no tecido sinovial, bem como a associação da doença com antígenos do complexo de histocompatibilidade principal da classe II (STASTNY, 1978; GREGERSEN et al., 1987; WEYAND et al., 1992; WEYAND e GORONZY, 1994). Por outro lado, tem sido sugerido que é a anatomia da articulação inflamada que favorece o ingresso e a retenção destas células, mas frustra sua expressão funcional. Por exemplo, foi demonstrado que a co-cultura de linfócitos e sinoviócitos diminui a resposta proliferativa dos linfócitos a mitógenos e outros estímulos, interferindo também com a ocorrência da apoptose (SCOTT et al., 1990).

A apoptose ou morte celular programada é um fenômeno em que as células individuais morrem em meio às outras células teciduais normais, servindo para manter a remodelação e homeostase tissular que acompanha, por exemplo, a atrofia de tecidos que se segue à retirada de um estímulo endócrino ou no timo para destruição normal de linfócitos B e T (WYLLIE et al, 1980). Após a iniciação do processo de apoptose as células e os fragmentos nucleares são rapidamente fagocitados pelas células vizinhas ou pelos macrófagos e, assim, o meio extracelular não é exposto aos restos celulares; esta rápida remoção explica a razão para que as características morfológicas da apoptose não tenham sido

apreciadas anteriormente até o trabalho clássico de KERR, WYLLIE e CURRIE em 1972. Dentre as células do fluido sinovial durante a AR aparecem comumente leucócitos polimorfonucleares com características morfológicas de apoptose (MALININ et al., 1967). Alterações similares ocorrem na artrite reativa, mas as características típicas são a ingestão de leucócitos intactos e restos nucleares pelos macrófagos (PEKIN et al., 1967); estas células grandes foram denominadas células de Reiter em virtude de sua presença mais frequente naquela forma particular de artrite inflamatória. Cerca de 20 anos depois, estudos *in vitro* demonstraram que a resolução da inflamação era dependente do reconhecimento, captação e degradação pelos neutrófilos por mecanismos fagocíticos (SAVILL et al., 1989). Na década de 90 foi confirmado que as efusões sinoviais na AR contêm leucócitos com múltiplos núcleos apoptóticos mas, ao contrário de outras doenças inflamatórias articulares, as células e restos celulares não são fagocitados pelas células vizinhas, sendo proposto que o impedimento do *clearance* dos linfócitos na cavidade articular poderia contribuir para a cronicidade da doença (JONES et al., 1993). Uma melhor compreensão da resolução da inflamação e da limitação da lesão tecidual pela apoptose poderá ser útil para o possível desenvolvimento de formas de intervenção terapêutica na AR.

A relevância da apoptose para a AR pode ser uma alternativa interessante para explicar a expansão em massa da membrana sinovial. Esta expansão pode dever-se tanto a acumulação celular resultante do recrutamento, quanto a proliferação de sinoviócitos. Entretanto, estudos demonstram que as células de revestimento geralmente apresentam ausência de mitose, baixa incorporação de

timidina triciada (timidina 3H) ou com marcadores imunohistoquímicos de proliferação (QU et al., 1994; KINNE et al., 1995). Uma hipótese alternativa à proliferação celular é a falha da apoptose. Mas, foi demonstrado que, ao contrário desta expectativa, a apoptose, medida em termos da presença de fragmentos do DNA em secções de tecido sinovial congeladas, está muito aumentada na sinóvia reumatóide (FIRESTEIN et al., 1995). Esta medida, contudo, está fora de proporção com o número de células que progridem para a aparência morfológica de apoptose; estudos empregando microscopia eletrônica demonstraram que menos de 1% das células da camada sinovial exibem características ultraestruturais típicas de morte celular programada (FIRESTEIN et al., 1995; NAKAJIMA et al., 1995). Logo, se as células em apoptose forem removidas tão rapidamente (baseando-se na quantidade de fragmentação de DNA vista na sinóvia inflamada e considerando-se que estas células progridiriam para a apoptose completa) deve haver uma taxa de reposição celular extraordinariamente elevada, o que sugere a possibilidade de um defeito no processo de apoptose na camada sinovial inflamada (ZVAIFLER, 1996). Existem nas articulações muitas substâncias que danificam o DNA, tais como espécies reativas de oxigênio geradas por isquemia seguida de reperfusão ou citocinas como o $TNF\alpha$, mas a análise por Western blot do tecido sinovial inflamado revelou a presença de grandes quantidades da proteína p53, que é supressora tumoral e um regulador importante do reparo de DNA e replicação celular (FIRESTEIN et al., 1996). Estes são achados aparentemente paradoxais, pois na sinóvia inflamada é comum a abundância de fragmentos de DNA ao mesmo

tempo em que ocorre indução da proteína p53, que deveria lentificar o ciclo celular e permitir o reparo do DNA. Uma explicação pode ser a possível mutação (ou mutações) do gene da p53 no microambiente da articulação inflamada durante a AR, que pode resultar em elevada expressão, mas impedimento da função da proteína (GREENBLATT et al., 1994). Estudos dessa natureza podem conduzir a explicações alternativas, não-inflamatórias não-imunológicas, para a persistência auto-sustentada de muitas formas de inflamação crônica e podem também explicar os casos de cura da AR refratária em pacientes submetidos a transplante de medula óssea (TYNDALL e MILLIKAN, 1999).

Embora a natureza autoimune da AR tenha sido demonstrada há mais de 50 anos, com o estudo pioneiro de WAALER (1940) ao evidenciar a presença do fator reumatóide no soro de pacientes com AR, mesmo após pelo menos 40 anos de intensa investigação científica não foi ainda possível definir com exatidão o antígeno iniciador da AR e, muito menos, quais fatores específicos são responsáveis pelas exacerbações e progressão da patogênese associada à doença. Entretanto, estudos realizados repetidamente, confirmam que as moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) da classe II, em particular certos subtipos HLA DR4+, parecem estar inequivocamente ligadas à AR soropositiva (STASTNY, 1978; GREGERSEN et al., 1987; WEYAND et al., 1992; WEYAND e GORONZY, 1994). Foi descrito recentemente, contudo, a ocorrência de grande número de casos de AR em que a contribuição dos alelos HLA-DR é muito limitada (THOMSON et al., 1999), tendo sido documentada também a possível associação desta doença com alelos HLA-DQ (VAN DER

HORST-BRUIJNSMA et al., 1999). A AR é, portanto, uma doença heterogênea na qual os alelos do complexo de histocompatibilidade da classe II parecem atuar tanto como fatores de susceptibilidade quanto como fatores de risco. Surgiram também evidências recentemente de que parece haver uma heterogeneidade genética, particularmente nos genes relacionados ao TNF, IL-1 e IL-10, tanto na susceptibilidade quanto na severidade da AR (KLARESKOG e McDEVITT, 1999).

Somente na década de 90, o desenvolvimento da clonagem molecular e a produção de anticorpos monoclonais altamente específicos tornou possível a identificação precisa da estrutura e propriedades das citocinas e de seus receptores específicos individualmente. Atualmente, sabe-se que as citocinas são um grupo heterogêneo de proteínas produzidas principalmente por fagócitos mononucleares ativados, mas também por fibroblastos, células endoteliais etc. A ativação destas células é um dos sinais iniciais das respostas celulares à lesão e está associada à liberação de uma grande variedade de mediadores inflamatórios, incluindo-se as próprias citocinas, além dos metabólitos do ácido araquidônico, produtos do sistema complemento, enzimas lisossômicas e radicais livres, que participam da regulação do crescimento e diferenciação celular e do reparo tecidual (BAUMANN e GAULDIE, 1994; SHEERAN and HALL, 1997). Juntamente com os mediadores inflamatórios, as moléculas de adesão celular, cujos principais membros são as selectinas e a superfamília das imunoglobulinas, aparecem no início da resposta inflamatória e funcionam como um outro

mecanismo pelo qual comunicam-se as células dos sistema imunológico (SHIMIZU et al., 1992).

As citocinas exercem inúmeros efeitos biológicos na AR. Suas múltiplas atividades são reguladas principalmente ao nível da secreção pela expressão de seus receptores, pela ação concomitante de várias citocinas e pela ocorrência de proteínas inibidoras e moléculas carreadoras específicas (FERNÁNDEZ-BOTRAN, 1992). Foram identificados nos fluidos biológicos e sobrenadantes de culturas de célula vários fatores, aos quais se denominou inibidores, capazes de modular a ação e a produção/degradação de várias citocinas, com alta especificidade, tendo sido classificados em *moléculas não-peptídicas*, que interferem com a síntese, ligação ao receptor ou transdução de sinal; *receptores solúveis*, que neutralizam e previnem o escape extravascular; *IL-1ra/proteínas modificadas*, que impedem a indução de transdução de sinal através do receptor; e *autoanticorpos*, que neutralizam, mas podem também aumentar a destruição, mediada pelo complemento, de células apresentando citocinas ligadas à membrana ou ligadas ao receptor (DEBETS e SVELKOU, 1994). A existência destes inibidores naturais sugere que o organismo apresenta mecanismos complexos de controle da resposta inflamatória (DINARELLO e THOMPSON, 1991), de modo que o envolvimento das citocinas nas doenças inflamatórias crônicas pode ser decorrente da produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e/ou da inadequada inibição de seus efeitos (AREND e DAYER, 1990; DUFF, 1993; MIOSEC, 1993).

Na AR crê-se que células apresentadoras de antígeno que expressam o complexo de histocompatibilidade da classe II são capazes de ativar linfócitos T para liberar IFN- γ e outras citocinas que, por sua vez, estimulam os macrófagos a sintetizar e liberar IL-1 β , TNF α e IL-6. A seguir, o TNF α e a IL-1 β estimulam a proliferação de sinoviócitos B, que produzem metaloproteinases, GM-CSF e outros fatores. Também sob estímulo de IL-1 β , TNF α e IL-6, os fibroblastos sinoviais secretam enzimas, tais como a collagenase e outras proteases neutras, ocorrendo destruição do osso, cartilagem e estruturas periarticulares (AREND e DAYER, 1990). Em decorrência disso, no tratamento das doenças autoimunes, são empregadas drogas imunossupressoras tais como antimetabólitos, ciclosporina A ou corticosteróides capazes de inibir a produção de várias citocinas inespecificamente (AREND e DAYER, 1990). Parece haver, contudo, uma hierarquia na função destas moléculas na AR, onde destacam-se a IL-1 β e o TNF α . O TNF α , para exemplificar, pode ser bloqueado com anticorpos monoclonais específicos para reduzir a produção de IL-1, GM-CSF e IL-8 (MAINI et al., 1993). A IL-1 β pode contribuir para a lesão articular pela estimulação de PGE₂ e collagenase pelos fibroblastos sinoviais e condrócitos (WECKMANN e ALCOCER-VARELA, 1996). A IL-1 β pode também ativar o endotélio vascular e aumentar a expressão de moléculas de adesão e induzir reabsorção do osso e da cartilagem na AR (DUFF, 1993). A produção dos inibidores endógenos de IL-1 β ocorre simultaneamente com a síntese desta citocina, sugerindo que estas moléculas podem ser liberadas ao mesmo tempo

(LARRICK, 1989). Este efeito aparentemente paradoxal parece dever-se à fraca inibição pela IL-1ra, a qual deve encontrar-se em excesso para ter efeito biológico (AREND e DAYER, 1990). Trabalhos demonstram também que a IgG solúvel e o GM-CSF podem aumentar a produção de IL-1ra sem estimular a produção de IL-1 β (AREND et al., 1991; POUTSLAKA et al., 1991). De fato, a inibição fisiológica de IL-1 β pode ocorrer em vários níveis (AREND e DAYER, 1990; LARRICK, 1989; DAYER e FENNER, 1992), tendo sido demonstrado que os receptores solúveis de IL-1 tipo I (sIL-1RI) e tipo II (sIL-1RII), formados por clivagem proteolítica dos domínios extracelulares da molécula pela enzima conversora de IL-1 β , apresentam efeito inibitório na homeostase desta citocina e podem ter aplicações potenciais (DAYER e FENNER, 1992). Reconhece-se que os macrófagos sinoviais são as principais células produtoras de IL-1 β e IL-1ra durante a AR (AREND e DAYER, 1990; FIRESTEIN et al., 1992), indicando que estas células participam do processo de destruição articular. Foi demonstrado que a IL-1ra distribui-se particularmente nos tecidos perivasculares e nos agregados linfóides, mas é baixa sua expressão endotelial (FIRESTEIN et al., 1992); a coexistência de IL-1 β e seu receptor nos tecidos vasculares sinoviais e o baixo nível de IL-1ra endotelial sugere que IL-1 β tem papel como modulador da migração na sinóvia durante a AR (DELEURAN et al., 1992). Estudos experimentais e triagens clínicas preliminares indicam uma possível eficácia da IL-1ra na AR (AREND, 1991). THOMPSON et al. (1993) descreveram que IL-1ra não parece bloquear a função imunológica normal ou ter efeitos tóxicos em seres humanos já tendo sido testada clinicamente em outras doenças

inflamatórias como a asma (DINARELLO e THOMPSON, 1991), mas pode modificar outras funções normais, tais como a produção de proteínas de fase aguda (DAYER e FANNER, 1992). E, para adicionar um grau maior de complexidade, foi descrito também que os receptores solúveis de IL-1 (sIL-RI e sIL-RII) ligam-se avidamente tanto a IL-1 β quanto a IL-1ra (WECKMANN e ALCOCER-VARELA, 1996) e podem agir também como agonistas dos receptores de IL-1, sugerindo que a administração destes receptores solúveis pode diminuir o efeito antiinflamatório de IL-1ra, e, portanto, o uso clínico de IL-1ra e dos receptores solúveis de IL-1 deve ser avaliado com cautela.

O TNF α , que compartilha várias ações com a IL-1 na AR (AREND e DAYER, 1990), está presente nas células sinoviais e macrófagos intersticiais (WECKMANN e ALCOCER-VARELA, 1996), e também é produzido por células mononucleares da articulação de pacientes com AR (BUCHAM et al, 1988). A produção ou a atividade de TNF α pode ser bloqueada por altos níveis de PGE₂, corticosteróides e receptores solúveis de TNF α . Os receptores solúveis de TNF α , também denominados proteínas de ligação ao TNF α tipo I (sTNFR β ou TNF-R55-BP) e tipo II (sTNFR α ou TNF-R75-BP), são fragmentos de ambos os receptores de TNF tipo I (TNFRI ou p55) e tipo II (TNFII ou p75), produzidos por linfócitos T e B, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais, encontrando-se elevados na AR (DAYER e FENNER, 1992, COPE et al., 1992; BRENNAN e FELDMANN, 1992). Entretanto, ao contrário do que ocorre com o sistema IL-1/IL-1ra, não foi observada correlação entre os níveis de TNF α e os receptores solúveis desta citocina, indicando que estas proteínas são produzidas

independentemente, mas os níveis séricos dos receptores solúveis no fluido sinovial são maiores que no soro de pacientes com AR, sugerindo que tais moléculas sejam produzidas na articulação (WECKMANN e ALCOCER-VARELA, 1996). Estes fatores solúveis apresentam meia-vida curta na circulação, o que pode limitar seu uso terapêutico, mas sua meia-vida pode ser aumentada pela técnica do DNA recombinante (DAYER e FENNER, 1992). Por exemplo, a fusão do TNF-R55-BP com a cadeia C3 da IgG humana formou a molécula quimérica TNF-R55-BP/h γ 3, que se comporta como uma antagonista bivalente de TNF α e apresenta uma meia-vida de 20 a 30 horas maior no camundongo que os receptores solúveis naturais (FENNER, 1993). Existem também auto-anticorpos naturais, geralmente isotipos IgG1 ou IgG4, encontrados no soro, que reagem inespecificamente com várias citocinas tais como IL-1 α , IL-6, IFN α , IL-10, IL-2, IL-4, IL-8 e TNF α , não tendo sido identificados auto-anticorpos contra IL-1 β , IL-1ra, IL-3, IFN- β e IFN- γ (WECKMANN e ALCOCER-VARELA, 1996). Sua utilização terapêutica em preparações endovenosas, entretanto, demonstrou que os anticorpos anti-IL-1 α ou anti-IL-6 podem atuar como antagonistas ou agonistas (DEBETS e SAVELKOUL, 1994). Os anticorpos monoclonais anti-TNF α e o anticorpo TN3.19.2 reduziram as manifestações clínicas no modelo de artrite induzida por colágeno no camundongo (WECKMANN e ALCOCER-VARELA, 1996) e a administração de anticorpos monoclonais anti-TNF α a camundongos transgênicos para o gene de TNF α humano previne o desenvolvimento de artrite (KEFFER et al., 1991).

Além disso, nos ensaios em pacientes com AR, a aplicação endovenosa de um anticorpo quimérico (humano IgG1/murino Fv) de alta afinidade, resultou em benefício clínico para todos os pacientes, paralelamente com redução dos níveis de proteínas de fase aguda, taxa de sedimentação de eritrócitos e fator reumatóide (MAINI et al., 1993; ELLIOTT et al., 1993). A infusão de outro anticorpo monoclonal altamente específico contra o $\text{TNF}\alpha$, o cA2 quimérico humano/murino do isotipo IgG1 κ , na doses de 1, 10 e 20 mg/kg, a pacientes com AR, resultou na supressão da doença durante períodos que variaram de algumas a várias semanas, em mais de 50% dos pacientes (ELLIOTT et al., 1994; ELLIOTT et al., 1994). Entretanto, a segurança a longo prazo dos anticorpos mononucleares anti- $\text{TNF}\alpha$ deve ser examinada cuidadosamente em virtude do risco do surgimento de infecção, tumores e/ou outras complicações (MAINI et al., 1995).

Sabe-se que, no contexto da AR, o $\text{IFN-}\gamma$ é grandemente inibido por IL-4 e IL-10, mas bloqueia reciprocamente IL-10. Possivelmente este efeito inibitório recíproco entre IL-10 e $\text{IFN-}\gamma$ possa explicar a ausência de secreção desta citocina pela sinóvia durante a AR, já que as células secretoras de ambas as moléculas estão muito próximas (MIOSSEC, 1993). O benefício da terapia com $\text{IFN-}\gamma$ é modesto, provavelmente porque esta molécula pode induzir antígenos de histocompatibilidade em macrófagos e não antagoniza os efeitos da IL-1 (WECKMANN e ALCOCER-VARELA, 1996). A IL-4 tem ação antiinflamatória, que depende do tipo celular, modo de ativação e tipo de cultura (DUFF, 1993). De modo geral, IL-4 tem vários efeitos relacionados à IL-1,

demonstrando uma modulação diferenciada de IL-1 β e IL-1ra tanto nos níveis de RNAm quanto na síntese proteica (ORINO et al., 1992; VANNIER et al., 1992). Entretanto, as células sinoviais e mononucleares sangüíneas de pacientes com AR produzem baixas quantidades de IL-4 (WECKMANN e ALCOCER-VARELA, 1996). Esta citocina, contudo, reduz a severidade da artrite induzida por colágeno e por parede celular bacteriana e, além disso, a adição *in vitro* de IL-4 reduz a produção de citocinas pro-inflamatórias e bloqueia a proliferação celular de sinoviócitos estimulada por IL-1 (MIOSSEC, 1993). Outro exemplo de antagonismo mútuo ocorre entre o TNF α e o TGF β (BRENNAN e FELDMANN, 1992). O TGF β , produzido por plaquetas, monócitos, macrófagos, linfócitos e fibroblastos sinoviais (AREND e DAYER, 1990; LARRICK, 1989), existe em altas concentrações nas efusões sinoviais de pacientes com AR e é capaz de proteger ratos contra a artrite induzida por colágeno tipo II; a injeção de anticorpo anti-TGF β exacerba a doença nestes animais (AREND e DAYER, 1990). O efeito antiinflamatório do TGF β tem sido relacionado à capacidade de reduzir as funções de IL-1 e TNF β (DUBOIS et al., 1990). A IL-10, produzida principalmente por linfócitos B e monócitos, é também antiinflamatória, sendo capaz de diminuir a expressão do complexo de histocompatibilidade principal da classe II e bloquear a produção de várias citocinas pró-inflamatórias (WECKMANN e ALCOCER-VARELA, 1996). É detectada apenas em baixos níveis nos sobrenadantes de sinóvia na AR, mas o bloqueio com anticorpo monoclonal anti-IL-10 aumenta a produção de IL-1 β e TNF α (KATSIKIS et al., 1994).

Na atualidade a inflamação sinovial vista na AR tem sido atribuída em grande parte aos macrófagos ativados presentes na articulação. As células T que se infiltram na sinóvia carecem de certos marcadores de ativação e parecem produzir baixas quantidades de citocinas (SMEETS et al., 1998). Aparentemente, a expressão exagerada de $\text{TNF}\alpha$ pode contribuir para uma diminuição da ativação dos linfócitos T (COPE et al., 1994; COPE et al., 1997), de tal modo que a remoção do $\text{TNF}\alpha$ pode ocasionar uma ativação *de novo* dos linfócitos T – talvez contra diferentes autoantígenos. Pouco se sabe, contudo, sobre a identidade dos fatores que causam a extraordinária ativação dos macrófagos (uma célula representante do sistema de defesa inespecífica) nas articulações durante a AR (KLARESKOG e McCDEVITT, 1999). Tem sido proposto por vários estudos que durante a AR as citocinas pró-inflamatórias IL-11, IL-12, IL-15, IL-17 e IL-18 superam a ação das citocinas antiinflamatórias IL-4, IL-10 e IL-13 e podem atuar sinergicamente para sustentar tanto a resposta Th1 quanto a produção de IL-1, TNF, prostaglandinas e óxido nítrico pelas células residentes da articulação durante o curso da doença (ALAAEDDINE et al., 1999; MINO et al., 1998; KOTAKE et al., 1999; GRACIE et al., 1999; KIM et al., 2000).

A produção de prostaglandinas nos tecidos sinoviais é catalisada por uma cascata de enzimas que inclui a fosfolipase A2, ciclooxigenases e prostaglandinas sintetases terminais. *In vitro*, a expressão de COX-2 aumenta dramaticamente após estimulação com citocinas pró-inflamatórias, ésteres de forbol e certos receptores de superfície celular; a COX-2 localiza-se principalmente no endotélio vascular, células mononucleares e fibroblastos subsinoviais, enquanto a COX-1

encontra-se principalmente nas células do revestimento sinovial (CROFFORD, 1999). Contudo, muito ainda necessita ser esclarecido quanto à participação da COX-1/COX-2 nas doenças inflamatórias e também quanto à segurança das DAINES. O tratamento clínico com as DAINES, todavia, não evita a destruição da cartilagem e osso subcondral observada na AR, sendo também reconhecidamente capazes de promover graves distúrbios gastrintestinais. Uma questão fundamental é compreender a contribuição da COX-1/COX-2 para o *pool* total de prostaglandinas presentes nas articulações dos pacientes com AR. Sabe-se que as DAINES que exibem um completo espectro de atividades *in vitro* para COX-1/COX-2 são agentes eficazes clinicamente (BROOKS e DAY, 1991) e continuam a ser as drogas mais empregadas para o tratamento da dor e inflamação associadas à AR (SMITH, 1998; SINGH e TRIADAFILOPOULOS, 1999). É importante salientar que, além da inibição da COX, outros efeitos das DAINES incluem a supressão da migração de neutrófilos e fagocitose, modificações da atividade dos linfócitos, alterações das funções de membrana e do metabolismo da cartilagem (JAIN e LIPSKY, 1997). Assim sendo, a contribuição da isoforma COX-1, ou de mecanismos de ação alternativos, não devem ser negligenciados na busca por agentes antiinflamatórios mais eficazes.

Vários estudos clínicos e pré-clínicos atuais com inibidores de fosfodiesterase tipo 4 (PDE4) demonstraram que estes agentes podem ser úteis no tratamento de doenças inflamatórias, dentre as quais a asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, dermatite atrófica, esclerose múltipla e AR (BONTA et al., 1978; DOHERTY, 1999). A PDE é a enzima que catalisa a hidrólise da ligação

3' nos nucleotídeos cíclicos, para produzir seus derivados 5', não-cíclicos. Sua atuação é de extrema importância, pois a PDE é a única via fisiológica para a degradação do monofosfato de adenosina 3',5'-cíclico (AMPc) e do monofosfato de guanosina 3',5'-cíclico (GMPc). Agentes como o dibutilil-AMPc e moléculas que estimulam a adenilil-ciclase, tais como as prostaglandinas, forskolin, agonistas β 2-adrenérgicos, do mesmo modo que os inibidores de fosfodiesterase, são capazes de reduzir a produção de $\text{TNF}\alpha$ em monócitos e macrófagos (SEKUT et al., 1995). O rolipram, um inibidor seletivo da PDE4, reduz significativamente a expressão de $\text{TNF}\alpha$ e a progressão da artrite induzida por colágeno (NYMAN et al., 1997). O emprego futuro desta classe de drogas dependerá de sua segurança, bem como da identificação das doenças inflamatórias mais relacionadas a participação da PDE4 (DOHERTY, 1999).

1.4. Doença inflamatória crônica e fertilidade

Estudos recentes demonstram que doenças inflamatórias crônicas como a asma e a doença de Crohn, por exemplo, afetam negativamente os processos reprodutivos e a fertilidade em seres humanos (LICCARDI et al., 1998; FONAGER et al., 1998; NEIDHART et al., 1999). Paralelamente, acumulam-se evidências sobre o envolvimento de várias citocinas e de células do sistema imunológico, como linfócitos e macrófagos, nos processos reprodutivos masculinos e femininos normais e em condições fisiopatológicas (AVITSUR e

YIRMIYA, 1999; COHEN et al., 1999; HALES et al., 1999; LIM et al., 2000). A AR é uma doença imuno-inflamatória crônica com incidência marcante no sexo feminino, particularmente durante a idade reprodutiva (SILMAN, 1992; BELILOS e CARSONS, 1998), sendo atualmente considerada a mais comum dentre as doenças clássicas do tecido conjuntivo, afetando cerca de 1% da população mundial. Recentemente, NELSON et al. (1993) observaram que, comparadas às mulheres normais, as mulheres com AR apresentam diminuição da fertilidade. Posteriormente, foi demonstrado que flutuações nos sintomas da AR e de outras doenças auto-imunes se correlacionam com as fases do ciclo menstrual e também que a terapia de reposição com estrógeno melhora o quadro clínico da AR em mulheres durante a menopausa (JONHSSON e HOLMDAHL, 1998).

A AR humana caracteriza-se clinicamente pela deformação das articulações em virtude da formação do *pannus* inflamatório na membrana sinovial, além da presença de coleções de células inflamatórias chamadas nódulos reumatóides e de granulomas nodulares subcutâneos. A artrite causada por adjuvante completo de Freund é um modelo clássico para o estudo experimental da fisiopatologia da AR e de sua terapêutica, no qual é inoculada em ratos uma única injeção subcutânea contendo uma mistura de micobactérias mortas e óleo mineral (adjuvante completo de Freund - ACF), geralmente aplicada na base da cauda ou numa das patas traseiras (PEARSON, 1956). Durante muito tempo a noção prevalente foi a de que esta doença seria causada provavelmente por linfócitos capazes de reconhecer epítomos apresentados tanto

pelas micobactérias quanto por autoantígenos das articulações. Contudo, este conceito tende a mudar em vista de publicações recentes demonstrando que a artrite por adjuvante pode ser induzida em determinadas linhagens de ratos com o uso de adjuvantes simples, que não contém qualquer estrutura capaz de ser reconhecida pelos linfócitos T convencionais (KLARESKOG e McDEVITT, 1999). Considerando-se que a artrite por adjuvante seja uma doença dependente de linfócitos T, foram propostas recentemente duas hipóteses para explicar como uma inflamação órgão-específica pode resultar da injeção de adjuvantes: a primeira, sugere que os linfócitos T com alguma preferência para ligação com moléculas-alvo nas articulações sejam ativados pelo estímulo com adjuvantes inespecíficos, mas, até hoje, as especificidades destas células não foram detectadas; em vez disso, a segunda proposta sugere que as articulações possam ser alvo potencialmente especiais para a inflamação após certos tipos de ativação imunológica, envolvendo o reconhecimento de antígenos ubíquos, mas sem a necessidade da presença de reconhecimento de antígenos específicos da articulação por linfócitos T. De fato, não há evidências atuais que possibilitem discriminar especificamente entre as duas hipóteses, mas dados obtidos com outros modelos de artrite apontam para a segunda hipótese: por exemplo, nos camundongos transgênicos que expressam grandes quantidades de $TNF\alpha$, este mediador é expresso preferencialmente nas células do revestimento sinovial, mas não em macrófagos, linfócitos T ou B do baço e dos linfonodos (BUTLER et al., 1997; KLARESKOG e McDEVITT, 1999). Além disso, PLOWS et al. (1999) demonstraram que o colágeno tipo II nativo pode promover artrite sem a

contribuição dos linfócitos T e B, mas não inflamação generalizada, de modo que o próprio colágeno presente nas articulações parece ser capaz de ativar a imunidade inespecífica. Os dados combinados oriundos de vários modelos animais sugerem que a artrite pode se desenvolver secundariamente a diferentes antígenos e com o uso de diferentes mecanismos efetores e, se este raciocínio for aplicável a AR humana, pode-se supor que vários tipos de infecção e/ou exposição a fatores ambientais com propriedades de adjuvante e com capacidade de induzir produção de $\text{TNF}\alpha$ podem exercer efeito em indivíduos geneticamente susceptíveis, contribuindo para promover AR, tanto conjuntamente com mecanismos autoimunes, quanto isoladamente. Alguns já identificados como fatores de risco para AR incluem: a exposição à sílica, transfusões sanguíneas e fumo (SIMMONS et al., 1997; KARLSON et al., 1999). A idéia de que a imunidade inespecífica seja responsável pela iniciação e/ou perpetuação em certos casos de AR tem repercussões terapêuticas, como pode ser visto atualmente com o tratamento de pacientes com anticorpos monoclonais contra o $\text{TNF}\alpha$ (MAINI et al., 1998; WEINBLATT et al., 1999).

Na prática, a base que fundamenta o envolvimento do $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , bem como outros mediadores inflamatórios, tais como as prostaglandinas, na fisiopatologia da AR é a produção elevada destas moléculas nas articulações afetadas pela doença (HUSBY e WILLIAMS, 1988; HISHINUMA et al., 1999). O fator de necrose tumoral (TNF), identificado originalmente como antitumoral, é agora reconhecido como um regulador central da resposta inflamatória e imunológica (BEYAERT e FIERIS, 1994). É secretado como um pró-hormônio e

sua clivagem resulta num polipeptídeo de 157 aminoácidos (MOLLOY et al., 1993). Reconhece-se dois polipeptídeos antígenicamente diferentes, o $\text{TNF}\alpha$ e o $\text{TNF}\beta$. O $\text{TNF}\alpha$ existe em duas formas biologicamente ativas, uma transmembrana de 26 kDa e outra secretada após clivagem proteolítica, com funções distintas no curso da resposta imunológica, como demonstrado nos camundongos transgênicos (MEULLER et al., 1999). Em condições normais, o $\text{TNF}\alpha$ juntamente com a $\text{IL-1}\beta$, são moléculas fundamentais na iniciação da cascata de mediadores inflamatórios, produção de outras citocinas, complemento, ativação de leucócitos, linfócitos e macrófagos, que orquestram a resposta imunológica normal. Entretanto, sua produção exagerada pode ser desastrosa para o hospedeiro como observado, por exemplo, durante a caquexia (BEUTLER e CERAMI, 1988) e as doenças autoimunes (PUJOL-BORREL et al., 1987). Por outro lado, estudos demonstram que cerca de 30% dos pacientes tratados com anticorpos monoclonais contra o $\text{TNF}\alpha$ não respondem a terapêutica e apresentam baixos níveis desta citocina nas articulações (KLARESKOG e McDEVITT, 1999). Se estas informações forem confirmadas em estudos futuros, abre-se a possibilidade para o uso de terapias alternativas no tratamento da doença.

Está claro atualmente que a ativação do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal é um componente fundamental da resposta fisiológica à inflamação, existindo uma ampla comunicação bidirecional entre o sistema imune e o sistema endócrino (MUNCK et al., 1984; CHOWDREY e LIGHTMAN, 1993; MASI et al., 1999). Estudos mais recentes, sugerem que alterações na função do eixo

hipotálamo-hipofisário-adrenal e dos hormônios sexuais contribuem para o desenvolvimento e a persistência das doenças imuno-inflamatórias (PERRETTI, 1993; CASTAGNETTA et al., 1999). A secreção de glicocorticóides, por exemplo, está reciprocamente interrelacionada à inflamação, de modo que, em muitas formas de artrite causadas por mecanismos imunológicos, existe uma insuficiência adrenal. Contudo, ainda há divergências acerca da contribuição dos níveis plasmáticos de cortisol nos pacientes com AR, haja visto que alguns pacientes apresentam resposta normal ao ACTH e cortisol após injeção de hormônio liberador de corticotrofina (CHOWDREY e LIGHTMAN, 1993). Ao mesmo tempo, os esteróides gonadais parecem ter um papel fundamental como fatores predisponentes a muitas formas de artrite: os estrógenos demonstram ações imunoestimulantes e os andrógenos atuam como imunossuppressores naturais (CERINIC et al., 1998). Clinicamente, o tratamento com glicocorticóides melhora os sintomas e sinais da inflamação na AR, mas não as lesões estruturais da doença e, de forma semelhante, os esteróides sexuais também têm efeitos limitados; os estrógenos têm um pequeno efeito benéfico na densidade óssea das mulheres com AR após a menopausa e os andrógenos promovem uma melhora discreta nos homens e nas mulheres após a menopausa, especialmente no bem estar geral e na densidade óssea (BIJLSMA, 1999). O controle adequado dos fatores de risco imunológicos, hormonais e hereditários, que se apresentam muitos anos antes do aparecimento dos sinais e sintomas clínicos da doença, é um desafio prioritário no controle preventivo da AR (MASI et al., 1999).

Têm também surgido explicações para caracterizar a relação entre a AR e a interação entre altos níveis de prolactina e a função imunológica (BRENNAN e SILMAN, 1995). Foi demonstrado que, fora do período gestacional e pós-parto, as concentrações séricas de prolactina estão geralmente abaixo de 20 ng/mL, sendo levemente mais altas nas mulheres que nos homens (NAGY et al., 1991). A síntese de prolactina durante a gravidez parece ser regulada pelos estrógenos: o aumento da prolactina plasmática (150-200 ng/mL) acompanha-se pelo aumento correspondente dos estrógenos. Ao final da gravidez, os níveis de estrógeno diminuem e, assim, o principal fator inibitório da lactação é removido. Não há risco excessivo para o desenvolvimento de AR durante a gravidez, provavelmente em virtude do grande aumento nos níveis plasmáticos de estrógenos. Evidências de que a prolactina é pró-inflamatória incluem o achado de que o camundongo hipofisectomizado não desenvolve a artrite induzida por adjuvante de Freund, mas a reposição com o hormônio permite o desenvolvimento da doença (JARA et al., 1991). Além disso, os pacientes com AR demonstram um padrão diurno de atividade da doença que se correlaciona com o pico de concentração plasmática de prolactina (CHIKANZA et al., 1990). Estudos preliminares sugerem que a bromocriptina pode ser útil na terapia de doenças autoimunes (McMURRAY et al., 1994; WEBER e FREY, 1987).

É interessante salientar que por muitos anos o estudo dos mecanismos de imunossobrevivência fetal durante a gravidez em mamíferos tem focalizado sua atenção nas interações imunológicas materno-fetais específicas. Entretanto, pouca ênfase tem sido dada ao papel das respostas inflamatórias que, em

essência, são inespecíficas e estimuladas por qualquer forma de lesão tissular ou ativação imunológica. De fato, a resposta inflamatória engloba não somente a ativação de efetores não-adaptativos das reações imunológicas, monócitos e macrófagos, mas também o sistema complemento e o sistema de coagulação, como descrito por SACKS et al. (1998), que demonstraram que a gravidez normal em mulheres está associada a certas alterações fenotípicas nos leucócitos sanguíneos periféricos (granulócitos, monócitos e linfócitos), tais como aumento da expressão de CD11b, CD14 e CD64 e espécies reativas de oxigênio, que sugerem que a gravidez por si só envolve uma intensa resposta inflamatória generalizada, em alguns casos comparável em grau àquela observada na sepse sob tratamento intensivo. Estes autores sugeriram também que durante a gravidez normal ocorre uma exposição crônica do sistema imunológico materno a baixos níveis de lipídios e proteínas de origem fetoplacentária, capazes de induzir ativação do sistema imunológico materno, em contraposição à idéia de que a gravidez seja um estado fisiológico inteiramente dominado pelas células tipo “Th2”, produtoras de citocinas antiinflamatórias. Atualmente, ainda não está esclarecida a razão pela qual a interface placenta-decídua funciona como um sítio imunoprivilegiado durante a gravidez. HENCH, em 1938, foi o primeiro a descrever a remissão da AR durante a gravidez, tendo demonstrado que dentre 18 mulheres grávidas com a doença, 90% obtiveram melhora. As alterações hormonais que acompanham a gravidez levaram a sugestão de que o eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal pudesse também participar na fisiopatologia da AR (SCHUURS e VERHEUL, 1990). Trabalhos recentes confirmam que a

gravidez melhora a sintomatologia em 70% das pacientes com AR, mas a doença reaparece dentro de seis meses no período pós-parto em 90% dos casos (OSTENSEN, 1999). Outras doenças autoimunes exarcebam-se ou iniciam-se após o parto, tais como doença de Graves, tireoidite de Hashimoto, insuficiência renal pós-parto ou síndrome hemolítica-urêmica pós-gravidez, síndrome pós-parto com anticorpos antifosfolipídeos e miocardite autoimune pós-parto (AMINO et al., 1999). Por outro lado, a mulher nulípara é considerada duas vezes mais propensa ao desenvolvimento da AR (SPECTOR et al., 1990). Recentemente, os investigadores detectaram algumas alterações imunológicas humorais e celulares importantes durante a gestação, incluindo a elevação sérica da α_2 -globulina associada à gravidez (OSTENSEN et al., 1983), síntese de fatores supressores pelo feto e alteração do perfil de citocinas pró-inflamatórias/antiinflamatórias (BELILOS e CARSONS, 1998), as quais em conjunto com os níveis plasmáticos elevados de progesterona, estradiol e testosterona podem ser responsáveis pela melhora do quadro clínico da AR durante a gravidez. Entretanto, quando a medicação antiinflamatória se faz necessária durante a gestação, geralmente são utilizadas DAINES, isoladamente ou em combinação com uma droga remissiva de ação lenta ou mesmo corticosteróides mas, em função da documentação insuficiente acerca da possível toxicidade destes compostos na gravidez, tem havido certo desacordo sobre o emprego destas drogas na mulher gestante (NELSON e OSTENSEN, 1997). Estudos recentes demonstram que a pentoxifilina, a talidomida e a clorpromazina induzem a supressão da produção de $\text{TNF}\alpha$ por macrófagos ativados, inibição da

resposta Th1 pelos linfócitos T, proliferação de fibroblastos e metaloproteinases, atividade antioxidante, bem como apresentam efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores em modelos animais de artrite, sugerindo uma eficácia potencial na terapia da AR (GHEZZI et al., 1996; MAKSYMOWYCH et al., 1995; HUIZINGA et al., 1996; ISHII et al., 1997). Todavia, ainda há carência de estudos sobre seus efeitos reprodutivos, o mesmo ocorrendo com as novas drogas inibidoras mais seletivas de ciclooxigenase tipo 2, nimesulide, meloxicam e nabumetona, estas já em uso para o tratamento clínico na população em geral.

2. OBJETIVOS

Estudos recentes têm demonstrado a participação de citocinas na fisiopatologia da AR (SEITZ et al., 1993). Embora a patogênese da AR ainda não seja compreendida inteiramente, sabe-se que a inflamação e a hiperplasia da membrana sinovial, além da degradação da cartilagem articular decorrem, em grande parte, da ativação de sinoviócitos e condrócitos por citocinas produzidas por macrófagos, tais como a IL-1 β e o TNF α que, acredita-se, sejam os principais mediadores participantes na fisiopatologia da AR (AREND e DAYER, 1995). Considerando-se que a ovulação, a formação e regressão do corpo lúteo, bem como a reação tecidual durante a nidadação envolvem extensa remodelagem tecidual e uma seqüência ordenada de eventos similares a uma reação inflamatória (SEOW et al., 1988; ROMERO et al, 1989; ESPEY, 1994) é possível que, além de participarem da fisiopatologia da AR, IL-1 β e o TNF α , produzidas em grandes quantidades e cronicamente nas articulações inflamadas, possam atingir a circulação sistêmica e afetar negativamente os processos reprodutivos.

Assim sendo, foi estabelecido um esquema de estudo baseado nos seguintes objetivos:

1. Examinar as características fisiopatológicas da AR no modelo de artrite induzida por ACF na rata

2. Investigar se o desenvolvimento das lesões nas articulações está correlacionado com o aumento nos níveis séricos de IL-1 β e TNF α .
3. Verificar o efeito do tratamento com inibidores de COX e de TNF na artrite induzida por ACF na rata.
4. Determinar se a gravidez ou se o tratamento com o EPH modificam o desenvolvimento da artrite.
5. Verificar até que ponto a artrite contribui para a infertilidade ou subfertilidade.

3. MATERIAL:

3.1. Animais Experimentais

Foram utilizadas ratas albinas (*Rattus norvegicus*) da variedade Wistar, adultas com 180 a 200 gramas, uníparas, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Durante todo o estudo, os animais foram criados em gaiolas de polipropileno e mantidos em condições ambientais semelhantes àquelas anteriores aos experimentos, com uma temperatura de aproximadamente 25°C e ciclos de 12 horas/luz/dia, recebendo água à vontade e ração padrão tipo “purina”.

Antes da realização dos experimentos os animais eram submetidos a um período de adaptação às condições de manipulação laboratorial durante uma semana.

3.2. Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais

Aagitador magnético	Fanen - 251
Agulhas de Calibres Variados	B.D.
Autoclave	Fabbe - 103
Balança Analítica	Marte AL - 200
Balança para pesagem de animais	Filizola ID - 1500
Banho maria	Fanen - 100
Capilares Venosos de Vidro	Perfecta 1.0x 1.5mm

Centrífuga	Fanen - 215
Cronômetros	Technos Quartz - 965
Espectrofotômetro	Beckman DU® 640B
Estantes para Tubos de Ensaio	---
Freezer Doméstico	Brastemp FF - 260
Leitor de ELISA	Molecular Devices - E08453
Material Cirúrgico	Professoonal
Medidor de pH	Analion PM - 608
Microscópio Ótico	Nikon SE - 102
Pipetas de Pasteur	Samco
Pletismógrafo	Ugo Basile - 7150
Ponteiras plásticas 200 e 1000 µl	Oxford
Régua comum	---
Seringas de Volumes Variados	Unaplic
Sist. de automação - análises bioquímicas	RATX Technicon-Bayer
Sist. de automação – análises hematológicas	H1 Technicon-Bayer
Tubos de Ensaio	---

3.3. Drogas e Reagentes:

Ácido nítrico (HNO ₃)	Cinética Química LTDA.
Adjuvante de Freund	Sigma
Água destilada	CEME
Água destilada	UFC

Álcool etílico (etanol)	Reagen
Clorpromazina	Rhodia
Dexametasona	CEME
Éter etílico	Reagen
Fluoreto de fenilmetilsulfonila	Sigma
Extrato de placenta Humana (EPH)	Placentex® - Albert David Limited
Indometacina	Prodome
Inibidor de tripsina tipo I-S	Sigma
Lauril sulfato de sódio	Reagen
Nabumetona	SmithKline Beecham
Nimesulide	Lab. Asta Médica Ltda.
Meloxicam	Boehring Ingelheim
Pentoxifilina	Hoechst
Piroxicam	Pfizer
Salina normal 154mM	CEME
Salina normal 154mM	UFC

4. MÉTODOS

4.1. Criação dos animais para estudos da fertilidade e doença inflamatória crônica.

Antes da indução da doença inflamatória crônica e dos estudos da reprodução, seguia-se uma fase de preparo dos animais. Aos 21 dias de nascida a rata ainda impúbere era desmamada. Se passasse pelo controle do fenótipo (caracteres externos como pelagem, extensão do corpo e conformação corporal geral) e se fosse descendente de uma mãe que tivesse dado cria de 10 a 12 filhotes, no mínimo, era escolhida para o futuro acasalamento. O peso ideal escolhido para o primeiro acasalamento era atingido quando os animais estavam com cerca de 58 dias de vida. As ratas eram então mantidas com ração balanceada e água à vontade, sendo, nestas condições, consideradas aptas para o acasalamento por cerca de seis gerações (7 meses e meio). O acasalamento era sempre do tipo poligâmico, com um macho para duas fêmeas, sendo realizado na sala do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Procurou-se evitar também o acasalamento entre animais da mesma família.

O intuito foi garantir a fertilidade destes animais, a serem utilizados tanto nos estudos subseqüentes de reprodução e inflamação crônica, sempre a partir do segundo acasalamento.

4.2. Coleta de sangue e obtenção das amostras de soro

As amostras de sangue para dosagem de glicose sangüínea, transaminases séricas, desidrogenase láctica e proteínas totais, bem como para a determinação do eritrograma e leucograma, foram colhidas através de punção do plexo orbital dos animais com artrite no 35^o dia após a injeção de ACF e dos animais normais, ambos os grupos sob leve anestesia com éter etílico.

Para obtenção do soro sangüíneo utilizado nas dosagens das citocinas IL-1 β e TNF α , o sangue foi mantido durante 45 minutos à temperatura ambiente no laboratório ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$) em tubos de ensaio, para coagular. Logo após, foi procedida uma centrifugação a 2000 rotações por minuto durante 10 minutos para separação das amostras de soro, às quais foram imediatamente acrescentados 20 μL de inibidores de protease (fluoreto de fenilmetilsulfonila e inibidor de tripsina tipo I-S) na concentração de 1 mg/mL. A seguir as amostras de soro foram estocadas a -70°C até o momento da dosagem de citocinas. Nas ratas do grupo controle com artrite as amostras de sangue foram colhidas nos dias 1 (5 horas após inoculação de ACF), 10, 20 e 30 após injeção de adjuvante, enquanto que nos grupos com artrite tratados com diferentes drogas, as amostras sangüíneas foram colhidas apenas no 20^o dia após injeção de ACF, o que corresponde ao período de pico da reação artrítica.

4.3 Ensaios farmacológicos

4.3.1. Indução de artrite por adjuvante completo de Freund.

A artrite foi promovida por uma única injeção subplantar de 0,1 mL de adjuvante completo de Freund (ACF), uma mistura contendo 1 mg de *M. tuberculosis* morto por calor e dessecado, dissolvido em 0,85 mL de óleo de parafina e 0,15 mL de monooleato de manitol, na pata traseira direita de ratas Wistar (150-180 g; n=24). O volume da pata contralateral (reação secundária) foi medido por pletismografia nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35 após a injeção do adjuvante. O ganho de peso corporal de cada animal foi medido no início do período experimental e, a partir daí, monitorado semanalmente até o 28º dia da doença. O aumento no volume da pata que não recebeu ACF (reação secundária), em relação ao seu volume inicial (dia 0 antes do ACF), serviu como medida da reação artrítica (PEARSON, 1956).

4.3.2. Efeito da artrite por ACF no ciclo estral e no peso dos órgãos reprodutivos da rata

Este experimento tem o intuito de verificar a possível influência da indução de artrite por ACF na duração do ciclo estral da rata. Para tanto, foi inoculado 0,1 mL ACF na pata traseira direita de ratas Wistar (180-200g) apresentando ciclos estrais regulares. A partir do 14º dia após a indução da doença, os animais foram examinados diariamente através de observação da citologia vaginal, sempre às 8 horas da manhã, para detecção das fases do ciclo

estral (proestro, estro, metaestro e diestro), até o 35^o dia após inoculação do adjuvante. Nestas condições determinava-se a duração do ciclo estral das ratas artríticas em comparação às ratas controle-normais, que não receberam injeção de ACF. Além disso, foi determinado o peso do útero e do ovário na rata com artrite no 35^o dia a partir da injeção do ACF.

4.3.3. Efeito da artrite por ACF na implantação do blastocisto na rata

Neste experimento foi inoculado 0,1 mL de ACF na pata traseira direita de ratas Wistar (180-200 g; n=26) para indução de artrite. Do 10^o ao 20^o dia após a aplicação do adjuvante, estes animais foram acasalados à noite com machos de fertilidade comprovada. A partir de então, diariamente (8 h da manhã), foi procedido um exame do esfregaço vaginal para observação da presença de espermatozóides vaginais, o que caracteriza o 1^o dia de gravidez na rata. No 10^o dia de gestação, as ratas foram sacrificadas por deslocamento cervical para determinação do número de sítios de implantação uterinos e contagem de corpos lúteos nos ovários. Para fins de comparação, um grupo de ratas normais (n=11) foi avaliado paralelamente.

4.3.4. Efeito de inibidores da síntese de TNF α em ratas com artrite

Foi injetado 0,1 mL de ACF na pata traseira direita de ratas Wistar (180-200g) para indução de artrite. Em seguida, os animais foram tratados com os antagonistas de TNF α , pentoxifilina (20 mg/kg; n=18) e talidomida (10 mg/kg; n=12) por via oral, diariamente, do dia 0 ao dia 35, após injeção do adjuvante. O

aumento de volume da pata contralateral (reação secundária) foi medido nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35 após injeção de ACF e o ganho de peso corporal foi determinado nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 após a indução da doença. O efeito inibitório foi calculado em comparação aos valores do grupo controle normal e/ou tratado somente com o adjuvante.

4.3.5. Efeito de inibidores da ciclooxigenase em ratas com artrite

Ratas Wistar (180-200g) receberam injeção subplantar de 0,1 mL de ACF na pata traseira direita para indução de artrite. Em seguida, os animais foram tratados com o inibidor mais seletivo de COX-1, indometacina (2 mg/kg, v.o.; n=17), com o inibidor mais seletivo da COX-2, nabumetona (20 mg/kg, v.o.; n=11), ou com o inibidor não-seletivo da COX, piroxicam (2 mg/kg, v.o.; n=12), diariamente, do dia 0 ao dia 35, após injeção do adjuvante. O aumento de volume da pata contralateral (reação secundária) foi medido nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35 após injeção de ACF e o ganho de peso corporal avaliado semanalmente até o 28º dia da doença. O efeito inibitório foi calculado em comparação aos valores do grupo controle normal e/ou tratado somente com o adjuvante.

4.3.6. Efeito da associação de um inibidor de ciclooxigenase tipo 2 e um inibidor de TNF α em ratas com artrite

Para indução de artrite foi inoculado 0,1 mL de ACF na pata traseira direita de ratas Wistar (180-200g). Em seguida, os animais (n=11) foram tratados com a associação de nabumetona (20 mg/kg, v.o.) + pentoxifilina (20 mg/kg,

v.o.), diariamente, do dia 0 ao dia 35, após injeção do adjuvante. O aumento de volume da pata contralateral (reação secundária) e peso corporal destes animais foi medido nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35 após injeção de ACF e o ganho de peso corporal avaliado semanalmente até o 28º dia da doença. O efeito inibitório foi calculado em comparação aos valores do grupo controle normal e/ou tratado somente com o adjuvante.

4.3.7. Dosagem de IL-1 β em ratas com artrite

As amostras de soro sanguíneo aqui empregadas foram obtidas como explicado anteriormente, no item 4.2.

Foi empregado um *kit* de ELISA específico para IL-1 β de rato, com sensibilidade de 3 pg/mL (Rat IL-1 β , Biosource International, Camarillo, California, USA). Todas as determinações foram procedidas seguindo-se rigorosamente as especificações do fabricante. Inicialmente, 100 μ L do diluente-padrão foram acrescentados em cada poço, no qual encontrava-se o anticorpo anti-IL-1 β . Logo após, foram distribuídos 50 μ L das amostras séricas por poço. A placa foi coberta rapidamente e incubada por 3 horas a 37 °C. Em seguida, o conteúdo dos poços foi descartado e estes foram lavados com uma solução-tampão apropriada, quatro vezes cada poço. Após isto, foram adicionados 100 μ L de anticorpo anti-IL-1 β a cada poço, permanecendo em incubação durante 1 hora à temperatura ambiente (25 °C). Após este período, o material contido nos poços foi descartado e estes lavados mais quatro vezes com a solução-tampão. A seguir, 100 μ L de estreptavidina-HPR foram adicionados a cada poço. A placa foi

coberta, permanecendo mais 30 minutos à temperatura ambiente (25 °C), sendo a seguir esvaziada e lavada como já descrito. Adicionou-se 100 µL de solução cromógena a cada poço e a placa foi novamente incubada durante 30 minutos à temperatura de 25°C, em ambiente escuro. Após este período, 100 µL de uma solução bloqueadora da reação foram acrescentados a cada poço e, finalmente, foi procedida a leitura da absorbância com um leitor de ELISA calibrado para 450 nm, sendo os níveis de IL-1β expressos em pg/mL.

Em todos os experimentos foi construída uma curva padrão com diluições seriais de IL-1β do rato (46,9 a 3000 pg/mL), empregando-se análise de regressão linear simples das amostras específicas em relação às concentrações esperadas. O imunoensaio foi considerado válido somente quando o valor de r^2 foi de 0,95 , no mínimo. O valores dos níveis de IL-1β nos diferentes grupos experimentais foram obtidos extrapolando-se os dados a partir da curva padrão, multiplicando-se a concentração obtida pelo fator de diluição apropriado, de acordo rigorosamente com as especificações do fabricante.

Os níveis séricos de IL-1β foram estudados no 1^o, 10^o, 20^o e 30^o dia após a injeção de ACF nos animais controle com artrite. Nos animais com artrite tratados com pentoxifilina (20 mg/kg, v.o.), nabumetona (20 mg/kg, v.o.), indometacina (2 mg/kg, v.o.) ou com a combinação de nabumetona (20 mg/kg, v.o.) + pentoxifilina (20 mg/kg, v.o.) durante 35 dias, foi medido o nível de IL-1β sérico no 20^o dia após a inoculação de ACF, período correspondente ao pico da reação inflamatória secundária. Nas ratas com artrite grávidas foi determinado o nível sérico de IL-1β no 21^o dia de gestação, correspondente ao 14^o dia após

injeção de ACF. Um grupo adicional de ratas normais, sem tratamento algum, foi também incluído para fins de determinação dos valores basais circulantes de IL-1 β .

4.3.8. Dosagem de TNF α em ratas com artrite

Os níveis séricos de TNF α foram determinados empregando-se um *kit* de ELISA específico para TNF α de rato, com sensibilidade de 4 pg/mL (Rat TNF α , Biosource International, Camarillo, California, USA).

Inicialmente, foram adicionados 50 μ L do diluente padrão a cada poço contendo o anticorpo específico para o TNF α de rato. A seguir, 50 μ L das amostras e mais 50 μ L dos padrões foram distribuídos em cada poço e, logo após, adicionou-se 50 μ L do segundo anticorpo anti-TNF α . Em seguida, a placa foi submetida a incubação à temperatura ambiente (25 °C), durante 1 hora e meia. Após isso, as amostras foram descartadas e os poços lavados quatro vezes com uma solução tampão específica. Foram distribuídos, então, 100 μ L de estreptavidina-HPR por poço e a placa foi incubada durante mais 45 minutos a 25 °C. Após este período, o material foi novamente descartado, repetindo o procedimento de lavagem dos poços. Após isso, adicionou-se 100 μ L de solução cromógena a cada poço e a placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente (25 °C), no escuro. Por fim, foram acrescentados 100 μ L de solução bloqueadora da reação e, imediatamente após, foi procedida a leitura da

absorbância num leitor de ELISA calibrado a 450 nm, e os níveis de TNF α expressos em pg/mL.

Em todos os experimentos foi construída uma curva padrão com TNF α do rato nas diluições de 15,6 a 1000 pg/mL, a partir da qual extrapolava-se o valor da concentração sérica de TNF α , de acordo com as especificações do fabricante do *kit*. O imunoensaio foi considerado válido somente quando o valor de r^2 foi de 0,95, no mínimo.

O nível sérico de TNF α foi estudado no 1^o, 10^o, 20^o e 30^o dia após a injeção de ACF nos animais controle com artrite. Nas ratas com artrite tratadas com pentoxifilina (20 mg/kg, v.o.), nabumetona (20 mg/kg, v.o.), indometacina (2 mg/kg, v.o.) ou com a combinação de nabumetona (20 mg/kg, v.o.) + pentoxifilina (20 mg/kg, v.o.) durante 35 dias, o nível sérico de TNF α foi medido no 20^o dia após a inoculação de ACF, período correspondente ao pico da reação inflamatória secundária. Nas ratas grávidas com artrite foi determinada a concentração sérica de TNF α no 21^o dia de gestação, correspondente ao 14^o dia após injeção de ACF. Um grupo adicional de ratas normais, sem tratamento, foi também incluído para fins de determinação dos valores basais circulantes de TNF α .

4.3.9. Dosagem de IL-1 β e TNF α durante o ciclo estral da rata

Foram utilizadas ratas Wistar (180-200g) apresentando ciclos estrais normais. Os animais foram examinados no início da manhã (8:00 h), sendo

realizado exame de esfregaço vaginal para identificação das fases de estro e diestro. As amostras de sangue eram coletadas do plexo orbital, às 9:00 h da manhã. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas a 2000 rotações por minuto durante 10 minutos. Foi obtida, então, uma amostra de soro à qual acrescentava-se imediatamente inibidores de protease, antes da estocagem em refrigerador a -70°C . A determinação de IL-1 β e TNF α foi feita através de ELISA, como explicado anteriormente, com um número de 5 animais por grupo. A significância estatística foi avaliada através do teste 't' de Student para amostras desemparelhadas, com $p < 0,05$ no mínimo.

4.3.10. Efeito de inibidores de ciclooxigenase e da síntese de TNF α no ciclo estral em ratas com artrite

Grupos de ratas com artrite (180-200g) foram tratadas com indometacina (2mg/kg, v.o.; n=8), inibidora mais seletiva de COX-1, piroxicam (2 mg/kg, v.o.; n=8), inibidor não-seletivo de COX, ou com os inibidores da síntese de TNF α , pentoxifilina (30 mg/kg, v.o.; n=10) e talidomida (10 mg/kg, v.o.; n=11), a partir do 1^o dia após injeção de ACF e então observadas as fases do ciclo estral, do 14^o até o 35^o dia da doença, como descrito anteriormente (item 4.3.2), para o estudo da ciclicidade reprodutiva. Todas as drogas foram diluídas com salina fisiológica 154 mM imediatamente antes de sua administração, ficando o volume final ajustado para 10 mL/kg de peso corporal.

4.3.11. Efeito de inibidores da síntese de $TNF\alpha$ na implantação do blastocisto na rata

Ratas Wistar (180-200 g) normais foram acasaladas com reprodutores de comprovada fertilidade. Na manhã do dia seguinte ao acasalamento, examinava-se o esfregaço vaginal destes animais. A presença de espermatozóides no esfregaço indicava o 1^o dia de gravidez. Os animais foram então divididos em seis grupos experimentais, três dos quais receberam pentoxifilina (30 mg/kg, v.o.; n=5), talidomida (10 mg/kg, v.o.; n=6) ou clorpromazina (30 mg/kg, v.o.; n=6) do 1^o ao 3^o dia de gravidez. Os três grupos restantes foram tratados com as mesmas doses das drogas em estudo, do 4^o ao 6^o dia de gravidez. No 10^o dia de gestação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo realizada laparotomia e determinado o número de implantes fetais nos cornos uterinos. Um grupo controle com ratas grávidas normais, sem tratamento, foi também incluído para comparação.

Todas as drogas foram diluídas com salina fisiológica 154 mM imediatamente antes de sua administração, ficando o volume final ajustado para 10 mL/kg de peso corporal.

4.3.12. Efeito de inibidores da ciclooxigenase 1 e 2 na implantação do blastocisto na rata

Ratas Wistar (180-200g) normais foram acasaladas na fase de proestro do ciclo estral com machos de comprovada fertilidade. Na manhã do dia seguinte, examinava-se o esfregaço vaginal destes animais, no qual a presença de

espermatozóides revelava o 1^o dia de gravidez. Os animais foram então divididos ao acaso em grupos de 10 fêmeas grávidas em cada e tratados com salina fisiológica (controle, 154 mM) ou com inibidores mais seletivos de COX-2, nimesulide (5 mg/kg, v.o.), meloxicam (3 mg/kg, v.o.), nabumetona (20 mg/kg, v.o.), ou com um inibidor mais seletivo de COX-1, indometacina (2 mg/kg, v.o.). Todos os tratamentos foram realizados do 1^o ao 7^o dia de gravidez, uma vez por dia, exceto a indometacina, que foi administrada duas vezes por dia. O peso corporal dos animais foi medido antes do início dos experimentos e, a partir daí, a intervalos de 10 dias. Os grupos respectivos foram sacrificados por deslocamento cervical e laparotomizados no 10^o dia de gravidez, sendo determinado o número de implantes uterinos e de corpos lúteos ovarianos.

4.3.13. Efeito de inibidores da cicloxigenase 1 e 2 na gravidez da rata

Ratas Wistar (180-200g) normais foram acasaladas durante o proestro com machos de comprovada fertilidade. O primeiro dia de gravidez foi determinado pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal, como explicado anteriormente. Os animais foram a seguir divididos em grupos com 10 fêmeas grávidas em cada e tratados com salina fisiológica (controle, 154 mM) ou com inibidores mais seletivos de COX-2, nimesulide (5 mg/kg, v.o.), meloxicam (3 mg/kg, v.o.), nabumetona (20 mg/kg, v.o.), ou com um inibidor mais seletivo de COX-1, indometacina (2 mg/kg, v.o.). Todos os tratamentos foram realizados do 1^o ao 7^o dia de gravidez, uma vez por dia, exceto a indometacina, que foi administrada duas vezes por dia. No 20^o dia de gestação, os animais foram

sacrificados por deslocamento cervical e laparotomizados para determinação do número de fetos vivos/mortos, reabsorções fetais, bem como do peso dos fetos e placentas.

4.3.14. Efeito do extrato de placenta humana em ratas com artrite

Ratas Wistar (180-200g) receberam injeção de 0,1 mL de ACF na pata traseira direita para indução de artrite. Entre o 10^o e 20^o dia após a injeção de ACF, os animais foram tratados com EPH (400 mg/kg, i.p.) ou indometacina (2 mg/kg, v.o.), diariamente. O aumento de volume da pata contralateral (reação secundária) foi medido nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35 após injeção de ACF e o ganho de peso corporal determinado nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 após a indução da doença. O efeito inibitório foi calculado em comparação aos valores do grupo controle normal e/ou tratado somente com o adjuvante.

4.3.15 Efeito da indução de artrite na gestação da rata

Ratas Wistar (180-200g) normais foram acasaladas na fase de proestro do ciclo estral com machos de comprovada fertilidade. A presença de espermatozóides no esfregaço vaginal na manhã do dia seguinte ao acasalamento designava o 1^o dia de gravidez. No 7^o dia de gravidez, os animais (n=9) receberam uma injeção subplantar de 0,1 mL de ACF na pata traseira direita para indução de artrite. Verificou-se, através de pletismografia, o desenvolvimento da lesão inflamatória primária e secundária nestes animais nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35, após a injeção do adjuvante. Além disso, observou-se o peso e o tamanho dos

fetos e o peso da ninhada, bem como a ocorrência de possíveis deformidades fetais ou aborto durante a gravidez destes animais.

4.3.16. Efeito da indução de gravidez em ratas com artrite

Ratas Wistar (180-200g; n=32) receberam injeção subplantar de 0,1 mL de ACF na pata traseira direita para indução de artrite. Entre o 10^o e o 15^o após injeção de ACF, os animais foram acasalados com machos reprodutores de comprovada fertilidade. Verificou-se através de pletismografia, o desenvolvimento da lesão inflamatória secundária nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35 após a injeção do adjuvante. O ganho de peso corporal foi determinado no início do período experimental e então monitorado semanalmente até o 28^o dia da doença. Observou-se também o desenvolvimento da gravidez destes animais até o parto, verificando-se o peso e o tamanho dos fetos e o peso da ninhada, bem como a ocorrência de possíveis deformidades fetais ou aborto.

4.3.17. Efeito de inibidores da síntese de TNF α e ciclooxigenase na gravidez em ratas com artrite

Grupos adicionais de ratas com artrite foram tratados com o inibidor mais seletivo de COX-1, indometacina (2 mg/kg, v.o.; n=8), com o inibidor mais seletivo da COX-2, nabumetona (20 mg/kg, v.o.; n=8), ou com o inibidor da síntese de TNF α , pentoxifilina (20 mg/kg, v.o.; n=8) diariamente, do dia 0 ao dia 35 após injeção do adjuvante, e, em seguida, acasaladas como descrito anteriormente no item 4.3.12. Verificou-se o desenvolvimento da gravidez destes

animais até o parto, determinando-se o peso e o tamanho dos fetos, o peso da ninhada, a extensão crânio-base da cauda dos filhotes, bem como a ocorrência de possíveis deformidades ou aborto.

4.4. Estudo histopatológico

Ratas normais e com artrite foram sacrificadas no 21^o dia após injeção de ACF. Em seguida, as patas contralaterais foram amputadas acima da articulação tibiotársica e fixas em formalina neutra a 10%. Após a descalcificação em ácido nítrico a 7%, as patas foram seccionadas longitudinalmente e realizada montagem em lâminas de vidro com fragmentos de tecido com 10 µm, coradas com hematoxilina e eosina (HE) e avaliadas sob microscopia óptica. Em cada grupo experimental, as secções tissulares de quatro ratas foram escolhidas aleatoriamente para avaliação dos sinais da artrite e os resultados tabulados como se segue: animais 1-4, controles com artrite tratados com veículo (salina 154 mM); animais 5-8, ratas com artrite tratadas com nabumetona (20 mg/kg, v.o.); animais 9-12, ratas com artrite tratadas com pentoxifilina (20 mg/kg, v.o.); e animais 13-16, ratas com artrite tratadas com nabumetona (20 mg/kg, v.o.) + pentoxifilina (20 mg/kg, v.o.). Todos os tratamentos foram realizados diariamente, do dia 0 ao dia 35 após injeção do adjuvante.

Foram examinadas também secções transversais do útero e secções longitudinais do ovário obtidos de ratas com artrite no 21^o dia após a injeção de ACF, empregando-se a técnica de coloração por hematoxilina e eosina e microscopia óptica.

4.5. Análise estatística

Os dados encontram-se expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e foram submetidos a ANOVA e teste de comparação múltipla de Student-Newman-Kuels ou teste “t” de Student para amostras desemparelhadas, com um nível de significância mínimo exigido de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Curso temporal do desenvolvimento da lesão inflamatória secundária e do ganho de peso corporal em ratas com artrite

A Figura 1 e o Anexo 1 demonstram o desenvolvimento da lesão artrítica, medida como o aumento de volume da pata contralateral (reação secundária) em relação àquela em que foi injetado o ACF, em ratas controle com artrite (n=24). No grupo controle-artrite observou-se que o volume da pata contralateral começa a aumentar a partir do 14^o dia ($125 \pm 26 \mu\text{L}$), atingindo o pico no 21^o dia ($330 \pm 24 \mu\text{L}$) e, a seguir, decresce progressivamente até o 35^o dia ($126 \pm 24 \mu\text{L}$) após injeção de ACF. A Figura 2 e o Anexo 2 revelam que as ratas com artrite começam a perder peso no 7^o dia após a injeção do ACF, mantêm-se perdendo peso até o 14^o dia e, a partir daí, persiste um baixo ganho de peso corporal no decorrer do período experimental, indicando que a perda de peso precede o máximo desenvolvimento da lesão da articulação. Nos dias 21 e 28 após o ACF, o ganho de peso das ratas com artrite foi apenas 1.9 e 4% dos valores basais respectivamente, contra 20,1 e 20,3% observado nas ratas normais do grupo controle.

5.2. Perfil hematológico e bioquímica sérica em ratas com artrite

A Tabela 1 mostra que ocorreu uma redução significativa do número de leucócitos totais, principalmente linfócitos, no sangue dos animais com artrite no 35^o dia após a injeção de ACF. Os dados da Tabela 2 e da Tabela 3 demonstram

que não houve alterações significativas nos níveis de glicose sanguínea, transaminases séricas (TGO e TGP), desidrogenase láctica, proteínas totais ou nas proteínas séricas totais, albumina, globulinas (totais, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ e 2 , γ) e na relação albumina/globulina nestes animais.

5.3. Peso dos órgão do sistema reprodutor e histologia do útero e ovários em ratas com artrite

A Tabela 4 revela que não ocorre alteração significativa no peso ovariano e uterino das ratas com artrite no 35^o dia após injeção do ACF, em comparação às ratas normais. Contudo, a Figura 3b demonstra que o ovário destes animais apresenta-se com redução do número de folículos, em comparação aos animais normais na fase de estro como visto na Figura 3a. O exame histológico revelou também um aumento da infiltração de células inflamatórias, principalmente, eosinófilos e plasmócitos, no útero das ratas com artrite no 21^o dia após inoculação do ACF (Figura 3d), em relação ao útero normal durante o estro (Figura 3c).

5.4. Efeito da artrite na duração ciclo estral da rata

Verificou-se, como exposto na Figura 4 e Anexo 3, que as ratas com artrite induzida por ACF apresentam um significativo aumento na duração do ciclo estral ($p < 0,001$), $5,1 \pm 0,26$ dias ($n=18$), em comparação às fêmeas do grupo controle normal, 4 ± 0 dias ($n=8$), sem artrite.

5.5. Efeito da artrite na implantação do blastocisto na rata

Verificou-se, como descrito na Figura 5, Anexo 4 e Figura 6, que a ocorrência de gravidez nas ratas com artrite entre o 10^o e 20^o dia após injeção de ACF, resultou numa redução significativa ($p < 0,05$) do número de implantações uterinas ($8 \pm 0,7$; $n=26$) no 10^o dia de gestação, correspondente a uma inibição de 22,3%, em comparação ao grupo controle normal ($10,3 \pm 0,6$; $n=19$). O número de corpos lúteos sofreu um discreto aumento, não significativo estatisticamente, nos animais com artrite ($10,5 \pm 0,5$; $n=26$), quando comparados aos animais normais ($9,5 \pm 0,7$; $n=17$).

5.6. Efeito de inibidores da síntese de $\text{TNF}\alpha$ na lesão inflamatória articular e no ganho de peso corporal em ratas com artrite

Observa-se na Figura 7 e Anexo 5, que nas ratas com artrite induzida por ACF, tratadas durante todo o período da doença com pentoxifilina (20 mg/kg, v.o.; $n=18$) ou com talidomida (10 mg/kg, v.o.; $n=12$) ocorreu uma redução do aumento do volume da reação inflamatória secundária, correspondente a 84 e 82% de inibição, respectivamente, com valores significativos estatisticamente ($p < 0,001$) no 21^o dia após inoculação do adjuvante, em comparação às ratas com artrite do grupo controle.

Além disso, a Figura 8 e o Anexo 6 revelam que as ratas com artrite começam a perder peso no 7^o dia após a injeção do ACF, mantêm-se perdendo peso até o 14^o dia e, a partir daí, persiste um baixo ganho de peso corporal no decorrer do período experimental, indicando que a perda de peso precede o

máximo desenvolvimento da lesão da articulação. Nos dias 21 e 28 após o ACF, o ganho de peso das ratas com artrite foi apenas 1.9 e 4% dos valores basais respectivamente, contra 20.1 e 20.3% observado nas ratas normais do grupo controle. O tratamento com as drogas inibidoras da síntese de $\text{TNF}\alpha$, pentoxifilina (20 mg/kg, v.o.; n=28) ou talidomida (10 mg/kg, v.o.; n=12), diariamente, durante todo o período experimental, não reverteu o baixo ganho de peso observado nos animais com artrite.

5.7. Efeito de inibidores da ciclooxygenase na lesão inflamatória articular e no ganho de peso corporal em ratas com artrite

A Figura 9 e o Anexo 7 demonstram que a administração do inibidor mais seletivo de COX-1, indometacina (2 mg/kg, v.o.; n=17), ou do inibidor não-seletivo da COX, piroxicam (2 mg/kg, v.o.; n=12), inibe significativamente ($p<0,05$) o desenvolvimento da lesão secundária nas ratas com artrite, com uma inibição percentual de 55 e 64% respectivamente, em comparação aos animais com artrite do grupo controle, tratados com salina 154 mM. Os resultados demonstram ainda que o inibidor mais seletivo da COX-2, nabumetona (20 mg/kg, v.o.; n=11), inibe em 84% ($p<0,001$) a lesão secundária, comparado ao grupo controle com artrite.

A Figura 10 e o Anexo 8 demonstram que o tratamento com as drogas supracitadas não reverte o baixo ganho de peso corporal das ratas com artrite, em comparação ao grupo controle normal. O exame do estômago dos animais ao

final do período experimental (35^o dia após ACF) não revelou a presença de lesões macroscópicas na mucosa gástrica.

5.8. Efeito da associação de um inibidor de ciclooxigenase 2 e um inibidor de TNF α na lesão inflamatória articular e no ganho de peso corporal em ratas com artrite

O tratamento com a associação de nabumetona (20 mg/kg, v.o.) + pentoxifilina (20 mg/kg, v.o.), como exposto na Figura 11 e Anexo 9, reduziu significativamente ($p < 0,001$) o desenvolvimento da lesão secundária na ratas com artrite induzida por ACF, com valor correspondente a 80% de inibição, em comparação aos animais do grupo controle, tratados somente com salina 154 mM. Esta associação foi incapaz, entretanto, de reverter o baixo ganho de peso corporal das ratas com artrite, como visto na Figura 12 e Anexo 10. A Figura 12 e o Anexo 10 demonstram também que o tratamento de ratas normais durante 28 dias com pentoxifilina (20 mg/kg, v.o.) ou nabumetona (20 mg/kg, v.o.) isoladamente promove uma redução do ganho de peso corporal até o 14^o dia e, a partir daí, somente os animais que receberam pentoxifilina (20 mg/kg, v.o.) continuam a perder peso até o 28^o dia após a administração da droga.

5.9. Análise histopatológica das lesões inflamatórias na articulação tibiotársica em ratas com artrite.

O exame histológico das articulações tibiotársicas das ratas normais revelaram que as extremidades ósseas e a membrana sinovial permanecem

íntegras e o espaço entre os ossos é completamente claro (Figura 13a). Os animais do grupo controle com artrite demonstram uma severa infiltração leucocítica e hiperplasia da sinóvia (Figura 13b), formação do *pannus* inflamatório, inclusive com invasão dos seios medulares do osso subcondral, deposição de fibrina, bem como a presença de erosão da cartilagem articular nas áreas de expansão sinovial (Figura 13c e Tabela 5). As ratas com artrite tratadas com a nabumetona (20 mg/kg, v.o.) ou com a pentoxifilina (20 mg/kg, v.o.) manifestaram ausência de infiltração celular e hiperplasia sinovial (Figura 13d e e). Além disso, foi também observado um menor grau de deposição de fibrina, formação de vilos e degradação/destruição da cartilagem (Tabela 5). Os animais com artrite que receberam o tratamento combinado com nabumetona (20 mg/kg, v.o.) + pentoxifilina (20 mg/kg, v.o.) demonstraram uma total ausência de reação inflamatória, hiperplasia sinovial e destruição de cartilagem, mas somente discreta formação de vilos e deposição de fibrina (Figura 13f e Tabela 5).

5.10. Efeito de inibidores de ciclooxigenase e da síntese de $\text{TNF}\alpha$ no ciclo estral da rata com artrite

Os dados da Figura 14 e Anexo 11 demonstram que os animais com artrite tratados com piroxicam (2 mg/kg, v.o.; n=8), inibidor não-seletivo de COX, mas não com indometacina (2 mg/kg, v.o.; n=8), inibidor mais seletivo de COX-1, ou com os inibidores da síntese de $\text{TNF}\alpha$, pentoxifilina (20 mg/kg, v.o.; n=10) e talidomida (10 mg/kg, v.o.; n=11), demonstram ciclos estrais normais, com

duração significativamente ($p < 0,001$) menor, 4 ± 0 dias ($n=8$), comparados àqueles do grupo controle com artrite ($5,5 \pm 1,26$ dias; $n=18$).

5.11. Níveis circulantes de IL-1 β e TNF α no ciclo estral da rata

Como demonstrado na Figura 15 e Anexo 12, foram determinados os níveis séricos de IL-1 β e de TNF α nas fases de estro e diestro do ciclo estral da rata normal. Observou-se que os níveis circulantes de IL-1 β , mas não de TNF α , encontravam-se significativamente ($p < 0,05$) elevados no estro ($267 \pm 78,5$ pg/mL; $n=5$), em comparação ao diestro ($62,2 \pm 40,4$ pg/mL; $n=5$).

5.12. Níveis circulantes de IL-1 β e TNF α em ratas com artrite

A Figura 16 e o Anexo 13 demonstram que as ratas com artrite induzida por ACF apresentaram uma elevação significativa dos níveis séricos de IL-1 β ($695,3 \pm 74,9$ pg/mL; $n=5$) e de TNF α ($113,1 \pm 2,74$ pg/mL; $n=4$) já no 1^o dia (5 h após injeção de ACF) após a injeção do adjuvante, em comparação ao grupo controle normal (IL-1 β $62,2 \pm 40,4$ pg/mL; $n=5$; TNF α $34,9 \pm 8,7$ pg/mL; $n=4$), e, a partir daí, os valores de IL-1 β diminuíram progressivamente até o 30^o dia ($268 \pm 63,5$ pg/mL; $n=4$). Os níveis de TNF α , entretanto, mantiveram-se elevados durante todo o curso da doença.

5.13. Efeito de inibidores da ciclooxigenase e da síntese de $\text{TNF}\alpha$ nos níveis circulantes de $\text{IL-1}\beta$ e $\text{TNF}\alpha$ na rata com artrite

Verifica-se a partir da Figura 17 e Anexo 14 que o tratamento das ratas com artrite por ACF com a indometacina (2 mg/kg, v.o.), inibidor mais seletivo da COX-1, reduziu significativamente ($p < 0,05$) o nível sérico de $\text{IL-1}\beta$ ($125 \pm 14,5$ pg/mL; $n=4$), mas não o de $\text{TNF}\alpha$, medidos no 20^o dia após injeção de ACF, em comparação aos animais com artrite ($\text{IL-1}\beta$ $444 \pm 147,3$ pg/mL; $n=4$), tratados somente com salina 154 mM. Embora os grupos de animais que receberam nabumetona (20 mg/kg, v.o.), inibidora mais seletiva de COX-2, ou pentoxifilina (20 mg/kg, v.o.), inibidora da síntese de $\text{TNF}\alpha$, ou a associação nabumetona (20 mg/kg, v.o.) + pentoxifilina (20 mg/kg, v.o.) tenham demonstrado algum grau de inibição (44, 43 e 60%, respectivamente) nos níveis séricos de $\text{IL-1}\beta$ no 20^o dia após indução da doença, este decremento não foi estatisticamente significativo. O nível sérico de $\text{TNF}\alpha$, contudo, diminuiu significativamente ($p < 0,001$) nos animais com artrite tratados com pentoxifilina isoladamente ($31,7 \pm 7,4$ pg/mL; $n=4$), ou em associação com a nabumetona ($15,4 \pm 2,3$ pg/mL; $n=4$) quando comparados aos animais com artrite tratados com salina ($124,8 \pm 20,1$ pg/mL; $n=4$), no 20^o dia após indução da doença. A nabumetona isoladamente não demonstrou uma inibição significativa nos níveis séricos de $\text{TNF}\alpha$ no pico da reação inflamatória secundária.

5.14. Efeito da gravidez nos níveis circulantes de IL-1 β e TNF α na rata com artrite no dia do parto.

Como demonstrado na Figura 18 e Anexo 15, os níveis séricos de IL-1 β ($276 \pm 35,4$; $n=4$) e TNF α ($8,9 \pm 1,8$; $n=4$) encontram-se reduzidos de forma altamente significativa ($p<0,001$) no 21^o dia de gravidez, nas ratas grávidas nas quais foi induzida artrite com ACF no 7^o dia de gestação, em comparação aos níveis circulantes de IL-1 β ($605,9 \pm 35,6$; $n=4$) e TNF α ($126 \pm 5,97$; $n=4$) no 10^o dia após injeção de ACF nas ratas controle, tratadas somente com salina 154 mM.

5.15. Efeito da gravidez na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite

A Figura 19 e Anexo 16 apresentam o desenvolvimento da lesão artrítica, medida como o aumento de volume da pata contralateral (reação secundária) aquela em que foi injetado o ACF, em ratas controle com artrite ($n=24$), bem como em ratas grávidas ($n=15$) nas quais foi induzida artrite no 7^o dia de gestação. No grupo controle observou-se que o volume da pata contralateral começa a aumentar a partir do 14^o dia ($125 \pm 26 \mu\text{L}$), atingindo o pico no 21^o dia ($330 \pm 24 \mu\text{L}$) e, a seguir, decresce progressivamente até o 35^o dia ($126 \pm 24 \mu\text{L}$) após injeção de ACF. Nas ratas grávidas o desenvolvimento da lesão artrítica foi reduzido significativamente ($p<0,001$) no 21^o dia ($8 \pm 4 \mu\text{L}$), período correspondente ao máximo desenvolvimento da doença.

5.16. Efeito da gravidez no desenvolvimento da lesão inflamatória primária na rata com artrite

De acordo com a Figura 20 e Anexo 17, observa-se que a injeção subplantar de ACF promove um intenso aumento de volume da pata traseira direita das ratas controle com artrite (n=24), com pico no 14^o dia ($1160 \pm 100 \mu\text{L}$) após a inoculação do adjuvante, permanecendo com valores relativamente elevados até o 35^o dia ($630 \pm 40\mu\text{L}$). Nas ratas grávidas (n=9) este aumento de volume foi significativamente reduzido nos dias 14 ($830 \pm 35 \mu\text{L}$; $p<0,01$) e 21 ($640 \pm 60 \mu\text{L}$; $p<0,05$) após injeção de ACF, correspondente a uma redução de 29 e 30%, respectivamente em comparação às ratas com artrite do grupo controle, que receberam somente salina 154 mM durante o período experimental.

5.17. Efeito de inibidores da síntese de $\text{TNF}\alpha$ na implantação do blastocisto na rata

O tratamento de ratas normais com inibidores da síntese de $\text{TNF}\alpha$, pentoxifilina (30 mg/kg), talidomida (10 mg/kg) e clorpromazina (30 mg/kg), por via oral, no período do 1^o ao 3^o dia de gravidez, resulta numa diminuição significativa ($p<0,05$; $p<0,001$) do número de sítios de implantação uterina, com percentagens de inibição de 49,2, 73,9 e 46,1%, respectivamente, no 10^o dia de gravidez, em comparação ao grupo controle normal, sem tratamento. Contudo, ratas normais tratadas do 4^o ao 6^o dia de gravidez com as mesmas drogas, nas mesmas vias e dosagens, apresentaram redução do número de implantes uterinos

apenas quando tratadas com clorpromazina, correspondendo a 52,7% de inibição. Os resultados estão demonstrados na Figura 21 e Anexo 18.

5.18. Efeito de inibidores da ciclooxigenase 1 e 2 na implantação do blastocisto na rata

O tratamento de ratas normais, do 1^o ao 7^o dia de gravidez, com os inibidores mais seletivos da ciclooxigenase 2, nimesulide (5 mg/kg, v.o.; n= 11) e meloxicam (3 mg/kg, v.o.; n= 10), mas não com nabumetona (20 mg/kg, v.o.; n= 10), reduziu significativamente ($p<0,05$) o número de implantes fetais, $6,6 \pm 1,3$ e $6,8 \pm 1,3$, respectivamente, no 10^o dia de gravidez, em comparação ao grupo controle normal ($10,3 \pm 0,6$; n=19), tratado com salina 154 mM. A administração de indometacina (2 mg/kg, v.o.; n=9), inibidora mais seletiva de COX-1, no mesmo período gestacional, duas vezes ao dia, não alterou significativamente o número de implantes fetais. Dentre as drogas empregadas, apenas o NIM e o MLX reduziram o número de corpos lúteos, contudo, este efeito não foi significativo estatisticamente. Os resultados estão apresentados na Figura 22 e Anexo 19.

5.19. Efeito de inibidores da ciclooxigenase 1 e 2 na gravidez da rata

Ratas tratadas do 1^o ao 7^o dia de gravidez, por via oral, com os inibidores mais seletivos de COX-2, nimesulide (5 mg/kg), meloxicam (3 mg/kg) e nabumetona (20 mg/kg) demonstraram redução significativa ($p<0,05$) do número de fetos vivos no 20^o dia de gravidez, com valores respectivamente de $5,9 \pm 1,3$,

$6,8 \pm 1$ e $8,6 \pm 1,5$ fetos vivos por rata grávida, quando comparadas aos animais do grupo controle normal, tratados no mesmo período de tempo com salina 154 mM ($10,1 \pm 0,5$ fetos vivos/rata grávida). Estas drogas, com exceção da indometacina, não aumentaram significativamente o número de reabsorções fetais, determinado no 20^o dia de gravidez. O tratamento dos animais, do 1^o to 7^o dia de gravidez, com a indometacina (2 mg/kg, v.o.), inibidor mais seletivo de COX-1, reduziu significativamente o número de fetos vivos/rata grávida, $5,3 \pm 1,4$ ($p < 0,05$). A indometacina aumentou também significativamente ($p < 0,001$) o número de reabsorções fetais, $4,88 \pm 1,4$, no 20^o dia de gestação, em comparação aos animais normais, $1 \pm 0,37$. Estes resultados encontram-se descritos na Figura 23, Anexo 20 e Figura 24.

A Tabela 6 revela que, embora os pesos das placentas não tenham sido alterados significativamente, os pesos corporais dos fetos cujas mães foram tratadas do 1^o to 7^o dia de gravidez com os inibidores de COX-2 nimesulide (5 mg/kg, v.o.), meloxicam (3 mg/kg v.o.) e nabumetona (20 mg/kg v.o.), foram reduzidos significativamente ($p < 0,001$), correspondentes a 20, 24 e 16% de redução respectivamente, no 20^o dia de gravidez em comparação aos pesos dos fetos de ratas normais, tratadas somente com salina 154 mM. A mesma Tabela demonstra que o tratamento com os inibidores mais seletivos de COX-1, indometacina (2 mg/kg, v.o.), e de COX-2, nimesulide (5 mg/kg, v.o.), meloxicam (3 mg/kg, v.o.) e nabumetona (20 mg/kg, v.o.), promoveu uma redução do número total de fetos vivos, correspondente a 84, 42, 46, 15% respectivamente, quando comparadas ao grupo controle normal, que recebeu

salina 154 mM, no mesmo período de gestação. O número de fêmeas grávidas com fetos vivos também foi reduzido em 80, 20, 10, 10% nos grupos tratados respectivamente com indometacina, nimesulide, meloxicam e nabumetona, na mesma via, dosagens e período supracitados. Como consequência da redução do peso corporal fetal, a relação peso da placenta/peso corporal fetal aumentou proporcionalmente com o uso dos inibidores de COX-2.

Dentre um total de 317 fetos examinados em diferentes grupos, apenas no grupo tratado com meloxicam foi observada a morte de 1 feto, um valor que corresponde a 1,8% de mortalidade neste grupo. O ganho de peso corporal materno variou de 2,42 a 3,43 g/dia, não sendo observadas alterações entre os grupos ou mortalidade materna. O exame macroscópico das ninhadas, no 20^o dia de gravidez, não revelou deformidades fetais ou malformações placentárias com as dosagens e via empregadas no presente estudo em qualquer dos grupos experimentais.

5.20. Efeito da indução de artrite com ACF na gestação da rata

Os dados da Tabela 7 demonstram que a indução de artrite com ACF no 7^o dia de gestação da rata causa uma redução do número total de filhotes nascidos (21,3%), bem como uma diminuição significativa ($p < 0,01$), correspondente a 6% do peso corporal destes filhotes, quando comparados aos valores do grupo controle normal. Dentre as fêmeas grávidas neste grupo apenas 33% pariram e, além disso, morreram 13,3% dos fêmeas grávidas. A duração média da gestação nestes animais foi de 23,6 dias.

A mesma tabela mostra que as ratas com artrite que foram acasaladas entre o 10^o e o 15^o dia após a injeção de ACF, apresentaram uma redução de 66% no número de filhotes nascidos, comparado ao grupo controle normal, sem, contudo apresentar alteração significativa estatisticamente no peso corporal ou no tamanho dos filhotes e na mortalidade materna. Além disso, houve uma redução de 84% no número de ratas grávidas paridas neste grupo. A duração média da gestação nestes animais foi de 25,4 dias. A Tabela 7 demonstra também que, dentre três grupos de 8 ratas com artrite tratadas com inibidores mais seletivos de COX-1, COX-2 ou da síntese de $TNF\alpha$, respectivamente indometacina (2 mg/kg, v.o.; n=8), nabumetona (20 mg/kg, v.o.; n=8) e pentoxifilina (20 mg/kg, v.o.; n=8), a partir da indução da doença e também acasaladas entre o 10^o e 15^o dia após a inoculação de ACF, apenas 20 acasalaram e engravidaram, e, destas, apenas 3 pariram - uma em cada grupo experimental. O número total de filhotes nascidos vivos foi também reduzido drasticamente, representando uma diminuição de 93,7 , 86 e 100% para os animais tratados com indometacina, pentoxifilina e nabumetona, respectivamente, em comparação ao grupo controle normal. Dentre os filhotes nascidos, 2 mortos foram observados no grupo tratado com nabumetona. Além disso, dentre as fêmeas grávidas dos diferentes grupos, 2 morreram, uma das quais havia sido tratada com indometacina e a outra com nabumetona; não houve mortalidade materna no grupo tratado com pentoxifilina.

5.21. Efeito da gravidez, do extrato de placenta humana e da indometacina na lesão inflamatória articular e no ganho de peso corporal em ratas com a artrite

Observou-se que a ocorrência de gravidez nos animais, entre o 10^o e o 15^o dia após a inoculação de ACF, promoveu uma redução altamente significativa ($p < 0,001$) do aumento do volume da pata contralateral (reação inflamatória secundária) nos animais com artrite, no 21^o dia da doença ($157 \pm 34 \mu\text{L}$; $n=31$), um valor correspondente a 53% de inibição, em comparação ao grupo controle com artrite (Figura 25 e Anexo 21). De forma semelhante, ratas com artrite que receberam o EPH (400 mg/kg, i.p.) ou indometacina (2 mg/kg, v.o.) manifestaram uma significativa ($p < 0,001$) diminuição da lesão secundária, como evidenciado no 21^o dia após a inoculação de ACF, correspondente a uma inibição de 55 e 55%, em comparação às ratas controle com artrite, tratadas somente com salina 154 mM (Figura 26 e Anexo 22). Entretanto, a Figura 26 e Anexo 22 revelam que, subsequente à suspensão do tratamento (dia 21) com EPH, ocorreu um progressivo aumento de volume da lesão secundária, mas que não foi significativamente maior que os valores do grupo de ratas com artrite no 28 e 35 dia após injeção de ACF. ¹

Verifica-se, a partir da Figura 27 e Anexo 23, que a ocorrência de gravidez não alterou o baixo ganho de peso associado à artrite por ACF. Contudo, os animais com artrite tratados com EPH (400 mg/kg, i.p.), mas não com a indometacina (2 mg/kg, v.o.), demonstraram um progressivo aumento no ganho de peso corporal, inclusive com valores significativamente maiores ($p < 0,001$)

que aqueles dos animais do grupo controle normal, particularmente no 28^o dia após a injeção de ACF.

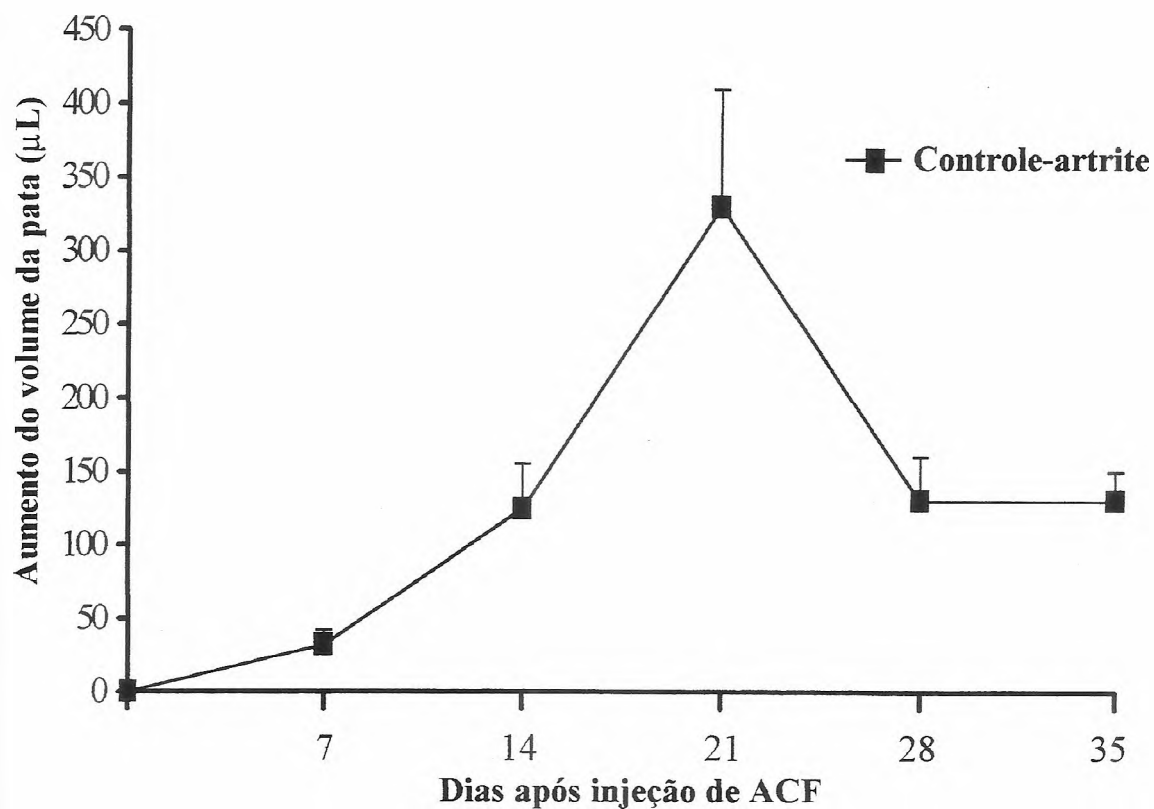


Figura 1 – Curso temporal do desenvolvimento da lesão inflamatória secundária em ratas com artrite

A artrite foi induzida através da inoculação de ACF subplantar (0,1 mL) na pata traseira direita das fêmeas controle (n= 24). O desenvolvimento da lesão na pata contralateral (reação inflamatória secundária) foi medido nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35 após a injeção de ACF. Os dados estão expressos como Média $\pm$ EPM.

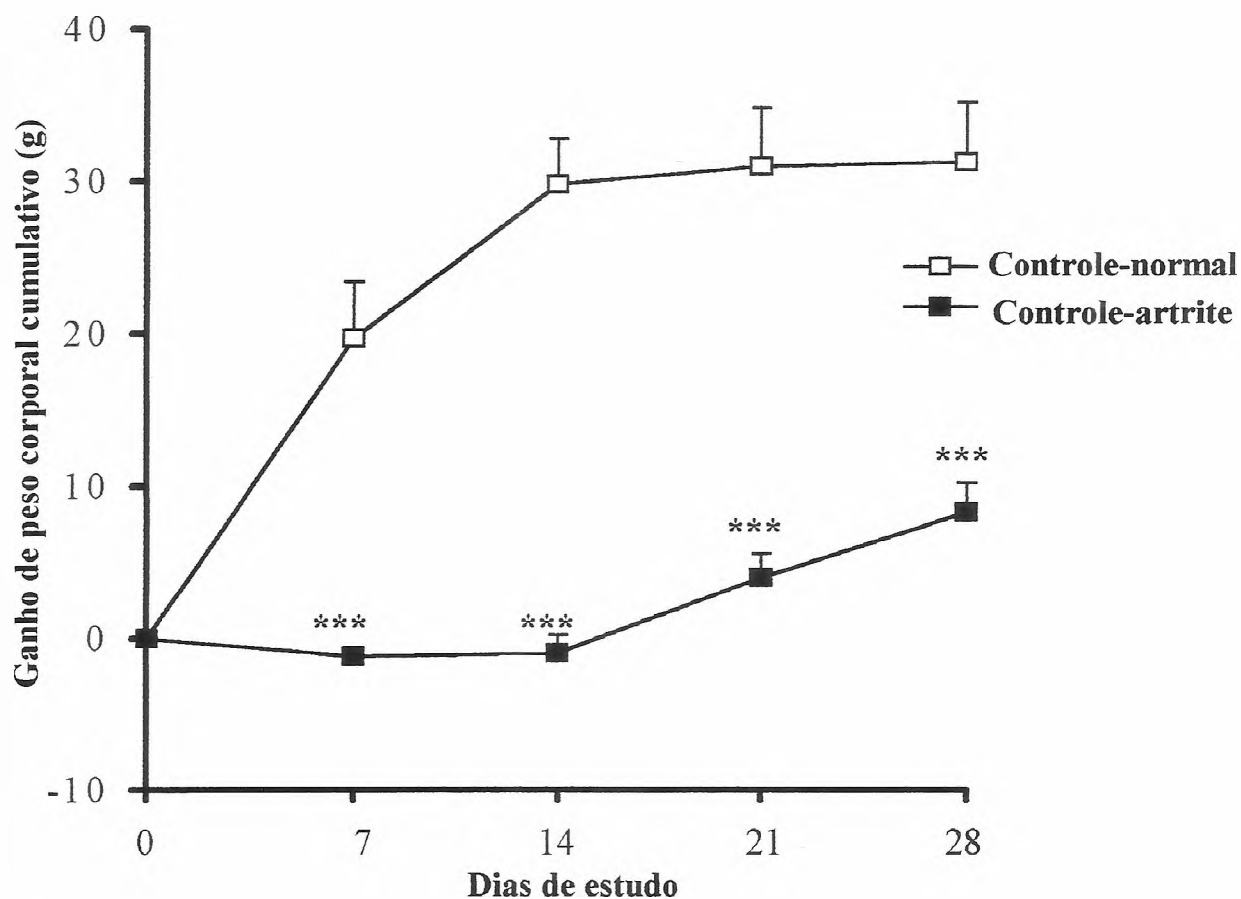


Figura 2 – Curso temporal do ganho de peso corporal em ratas com artrite

Os animais do grupo controle-artrite (n=44) foram pesados semanalmente a partir do dia da injeção do ACF (dia 0), sendo comparados a um grupo controle-normal (n=8). Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels, estando expressos como Média $\pm$ EPM. ***p<0,001, comparado ao controle normal.

Tabela 1. Alterações hematológicas em ratas com artrite no 35^o dia após injeção do ACF.

Parâmetros	Controle-normal	Controle-artrite
Eritrograma		
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	$7,38 \pm 0,09$	$7,35 \pm 0,09$
Hemoglobina (g/dL)	$14 \pm 0,16$	$14 \pm 0,19$
Hematócrito (%)	$43,75 \pm 0,75$	$44,5 \pm 0,65$
Volume corpuscular médio (fL)	$59,3 \pm 1,2$	$60,43 \pm 1,38$
Hemoglobina corpuscular média (pg)	$18,92 \pm 0,2$	$19 \pm 0,21$
Conc. de hemoglobina corpusc. média (%)	$31,98 \pm 0,31$	$31,25 \pm 0,44$
Leucograma		
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	$10,17 \pm 0,67$	$6,73 \pm 1,01^*$
Neutrófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	$2,5 \pm 0,17$	$2,03 \pm 0,51$
Eosinófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	$0,08 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,05$
Basófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0 ± 0	0 ± 0
Linfócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	$7,36 \pm 0,61$	$4,18 \pm 0,49^*$
Monócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	$0,61 \pm 0,21$	$0,29 \pm 0,08$

Os valores estão representados como Média $\pm$ EPM (n=8 animais/grupo). Teste “t” de Student (*p<0,05).

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos sanguíneos em ratas com artrite no 35^o dia após injeção do ACF.

Parâmetros	n	Controle-normal	Controle-artrite
Glicose sanguínea (mg/dL)	8	107,25 ± 9,4	92,5 ± 1,19
Transaminases séricas			
TGO (U/mL)	8	238,5 ± 14,89	202,25 ± 9,43
TGP (U/mL)	8	57,5 ± 5,85	53 ± 2,55
Desidrogenase láctica (U/L)	8	2284 ± 438	1934 ± 227
Proteínas totais (mg/dL)	8	7,10 ± 0,14	7,38 ± 0,11

Os valores estão representados como Média ± EPM (n=8 animais/grupo). ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Tabela 3. Proteínas séricas em ratas com artrite no 35^o dia após a injeção de ACF

Grupos	Proteínas totais	Albumina	Globulinas					A/G
			Total	α_1	α_2	$\beta_1 \& 2$	γ	
Controle-normal	7,18 $\pm$ 0,13	3,48 $\pm$ 0,23	3,7 $\pm$ 0,13	0,86 $\pm$ 0,13	0,42 $\pm$ 0,01	1,39 $\pm$ 0,06	1,04 $\pm$ 0,01	0,95 $\pm$ 0,09
Controle-artrite	7,48 $\pm$ 0,11	3,89 $\pm$ 0,05	3,74 $\pm$ 0,1	0,88 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,02	1,35 $\pm$ 0,03	0,94 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,02

A/G = relação albumina/globulina. Todos os valores estão expressos em g/dL e representados como Média $\pm$ EPM (n=8 animais/grupo). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

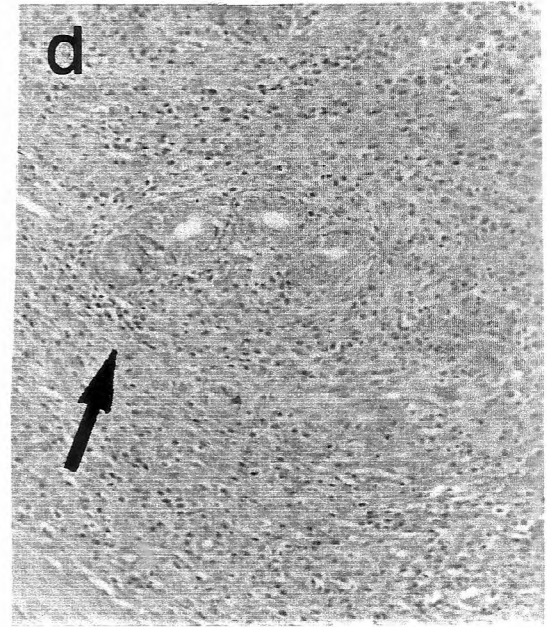
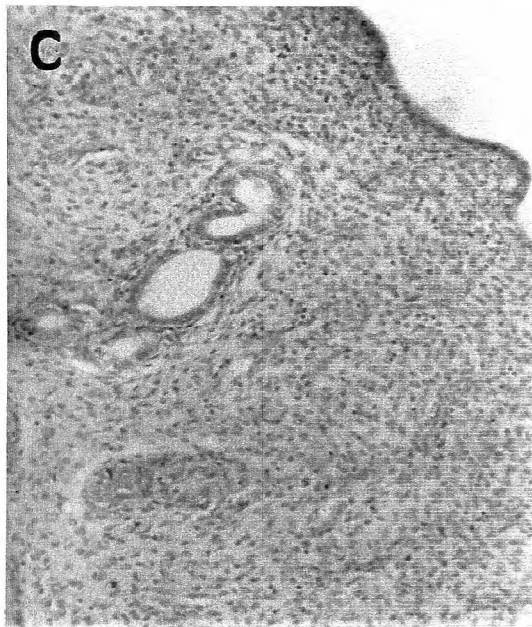
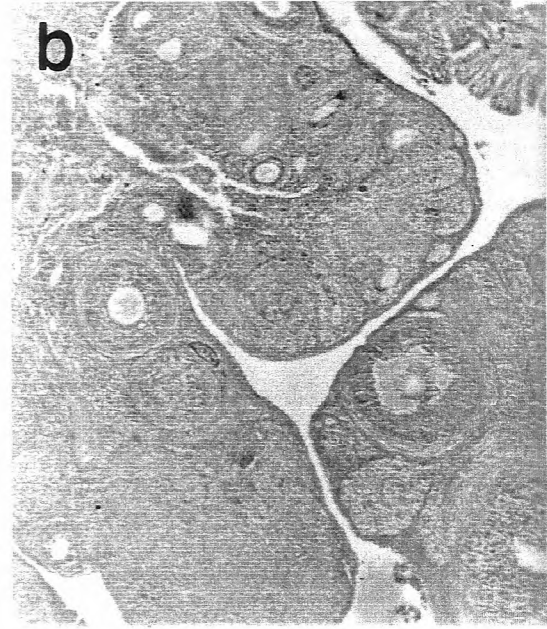
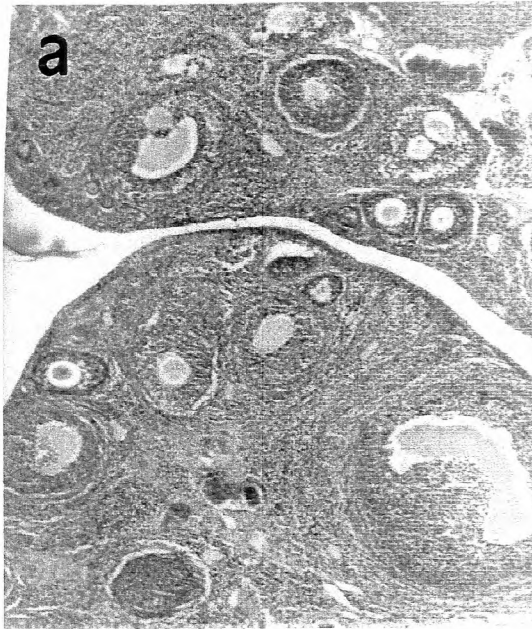
Tabela 4. Peso relativo dos órgãos do sistema reprodutor em ratas com artrite no 35^o dia após a injeção de ACF.

Parâmetros	n	Peso dos órgãos (g/100 g de peso corporal)	
		Útero	Ovários
Controle-normal	8	0,244 ± 0,024	0,080 ± 0,004
Controle-artrite	8	0,222 ± 0,022	0,058 ± 0,024

Os valores estão representados como Média ± EPM (n=8 animais/grupo). ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Figura 3 – Histologia do útero e ovário em ratas com artrite

O painel (a) mostra uma secção longitudinal do ovário normal e (b) um corte semelhante do ovário da rata com artrite onde observa-se redução do número de folículos ovarianos. O painel (c) apresenta uma secção transversal do útero de uma rata normal na fase de estro e (d) revela, empregando-se um corte similar a (c), uma intensa infiltração de eosinófilos e plasmócitos no endométrio da rata com artrite (seta). O ovário foi fotografado com aumento de 40x e o útero com aumento de 100x. Foi empregada a técnica de coloração hematoxilina-eosina.



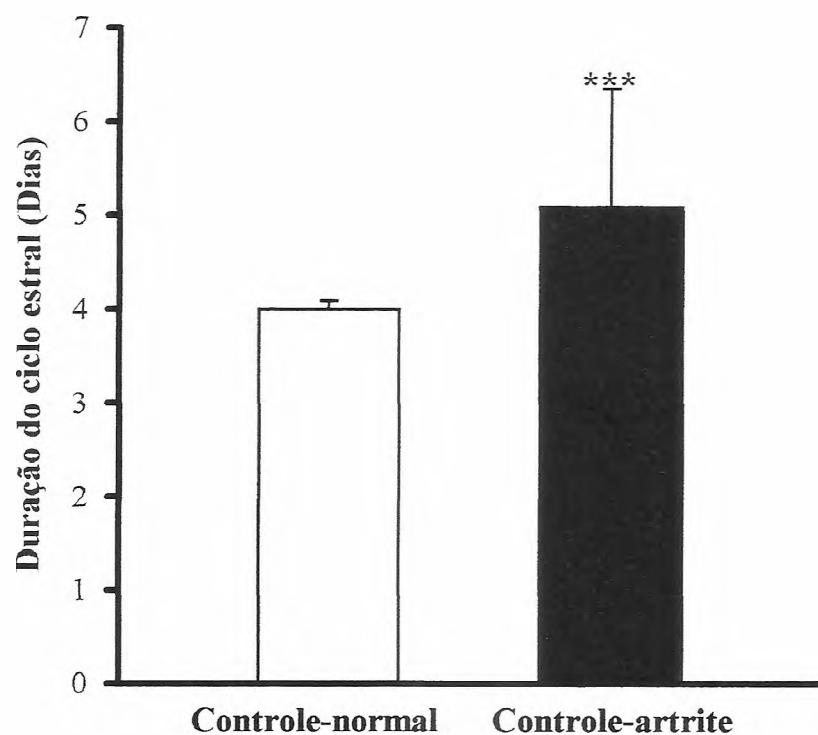


Figura 4 - Efeito da artrite no ciclo estral da rata

Foi estudada a duração do ciclo estral em fêmeas normais (n=8) e com artrite (n=18) induzida por ACF, examinando-se o esfregaço vaginal dos animais do 14^o até o 35^o dia após a injeção de ACF. Os dados foram comparados empregando-se o teste 't' de Student não-pareado e estão aqui apresentados como Média ± EPM.

***p<0,001.

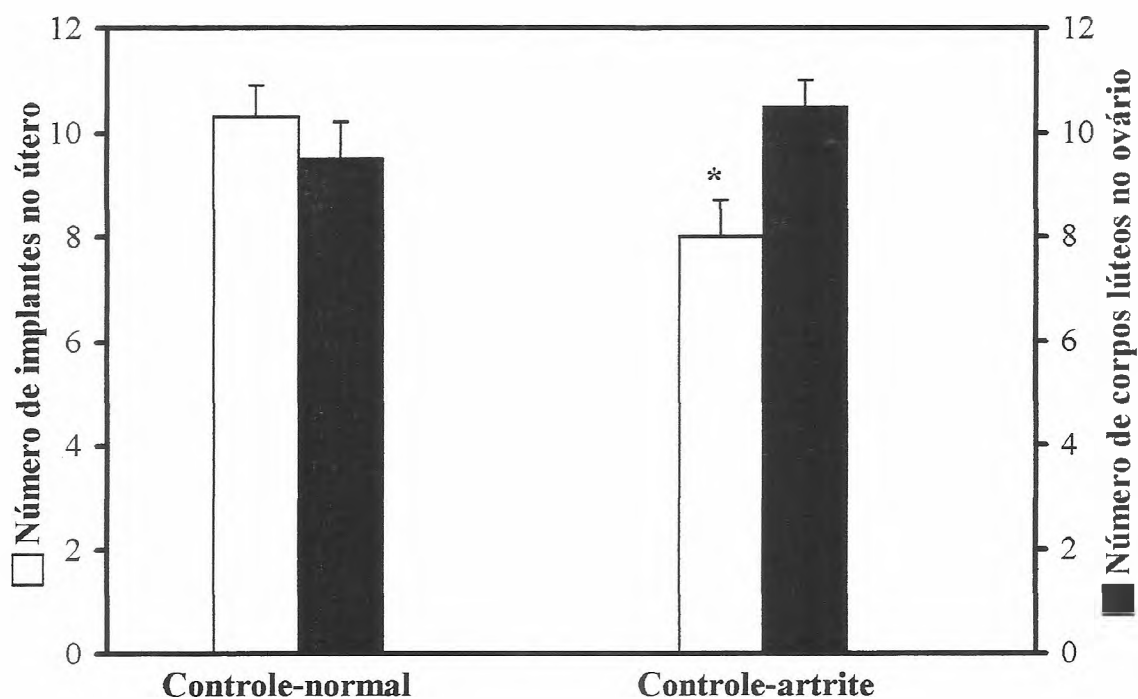


Figura 5 - Efeito da artrite na implantação do blastocisto na rata

Foi induzida gravidez entre o 10^o e 20^o dia após inoculação de ACF (grupo controle-artrite; n=26), sendo determinado o número de implantações uterinas e corpos lúteos ovarianos no 10^o dia de gestação, em comparação ao grupo controle-normal (n=19). Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels e estão representados como Média $\pm$ EPM. *p<0,05.

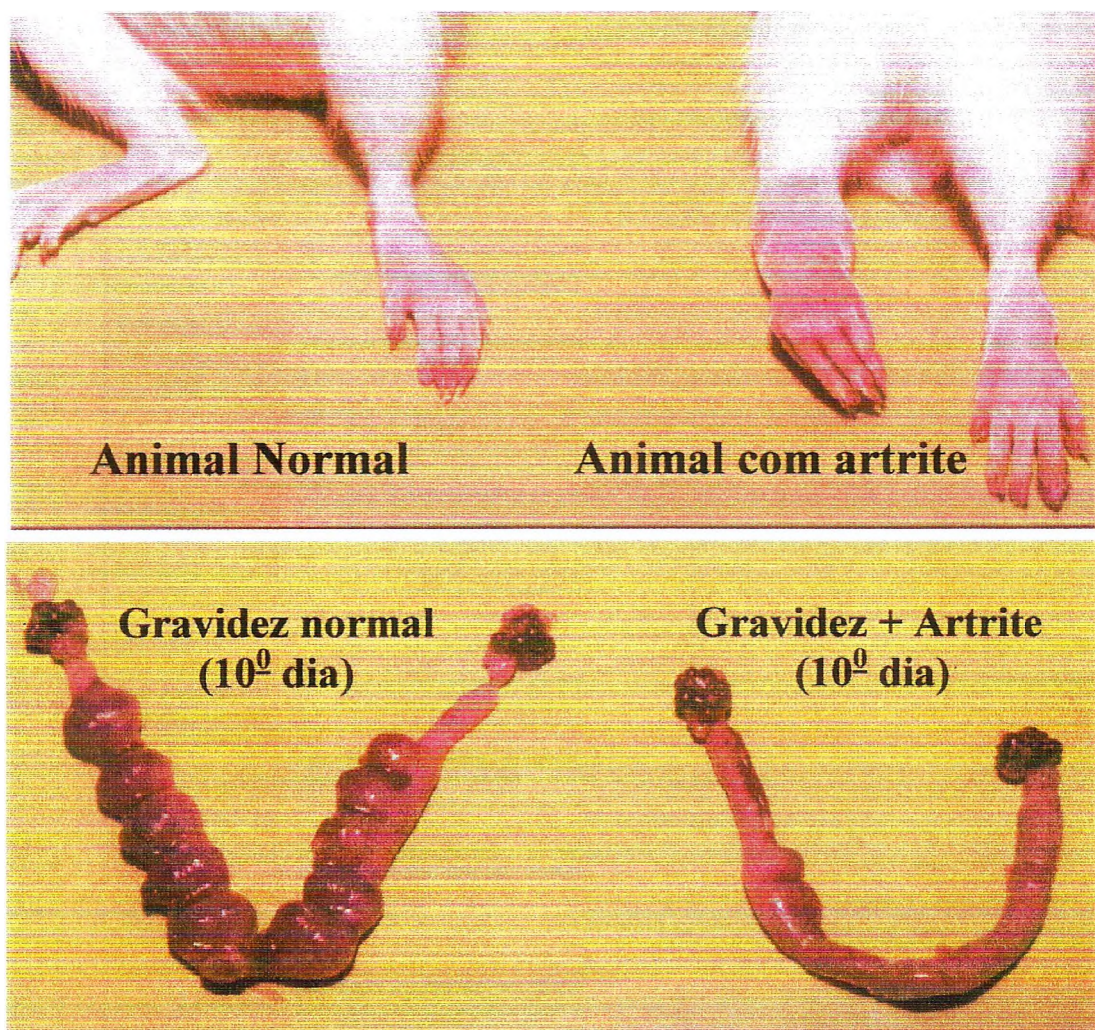


Figura 6 - Sítios de implantação fetal no útero da rata com artrite.

Foi induzida artrite pela inoculação de 0,1 mL de ACF na pata traseira direita dos animais. Observa-se que a rata com artrite apresenta um significativo aumento do volume da pata contralateral (reação inflamatória secundária) e, quando acasalada com um macho fértil entre o 10^o e 20^o dia após a inoculação de ACF, demonstra uma significativa diminuição do número de implantações uterinas no 10^o dia de gravidez, em comparação à rata normal.

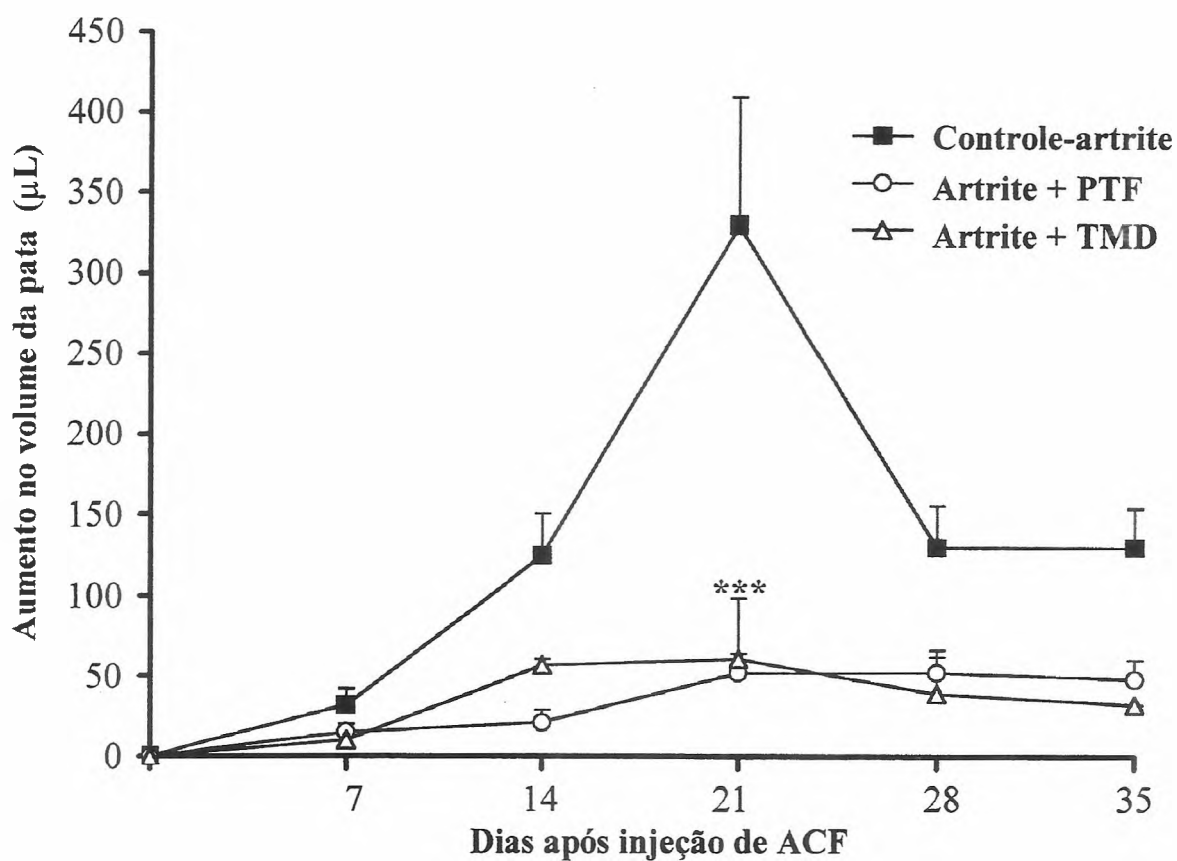


Figura 7 - Efeito de inibidores da síntese de $\text{TNF}\alpha$ na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite

Os animais foram tratados com salina 154 mM (controle-artrite; $n=24$), PTF (pentoxifilina 20 mg/kg, v.o.; $n=18$) ou TMD (talidomida 10 mg/kg, v.o.; $n=12$) durante 35 dias, após a inoculação de ACF. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels, estando expressos como Média $\pm$ EPM. *** $p<0,001$.

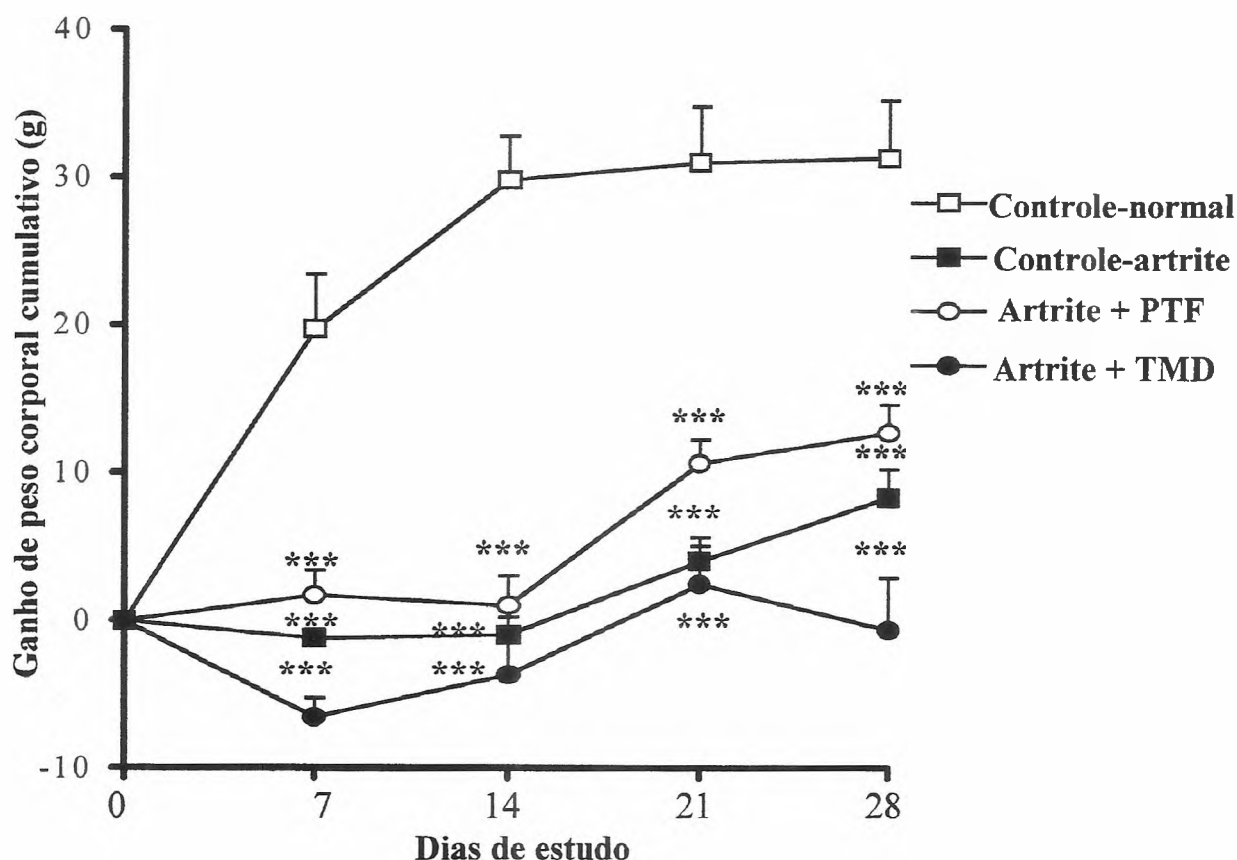


Figura 8 - Efeito de inibidores da síntese de $\text{TNF}\alpha$ no ganho de peso corporal em ratas com artrite

Os animais foram pesados semanalmente, a partir do dia da injeção do ACF, sendo tratados diariamente com salina 154 mM (controle-artrite; $n=44$), PTF (pentoxifilina 20 mg/kg, v.o.; $n=18$) ou TMD (talidomida 10 mg/kg, v.o.; $n=12$), durante todo o período experimental, sendo comparados a um grupo controle normal ($n=8$), tratado somente com salina 154 mM. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels, estando expressos como Média $\pm$ EPM. *** $p<0,001$, comparado ao controle normal.

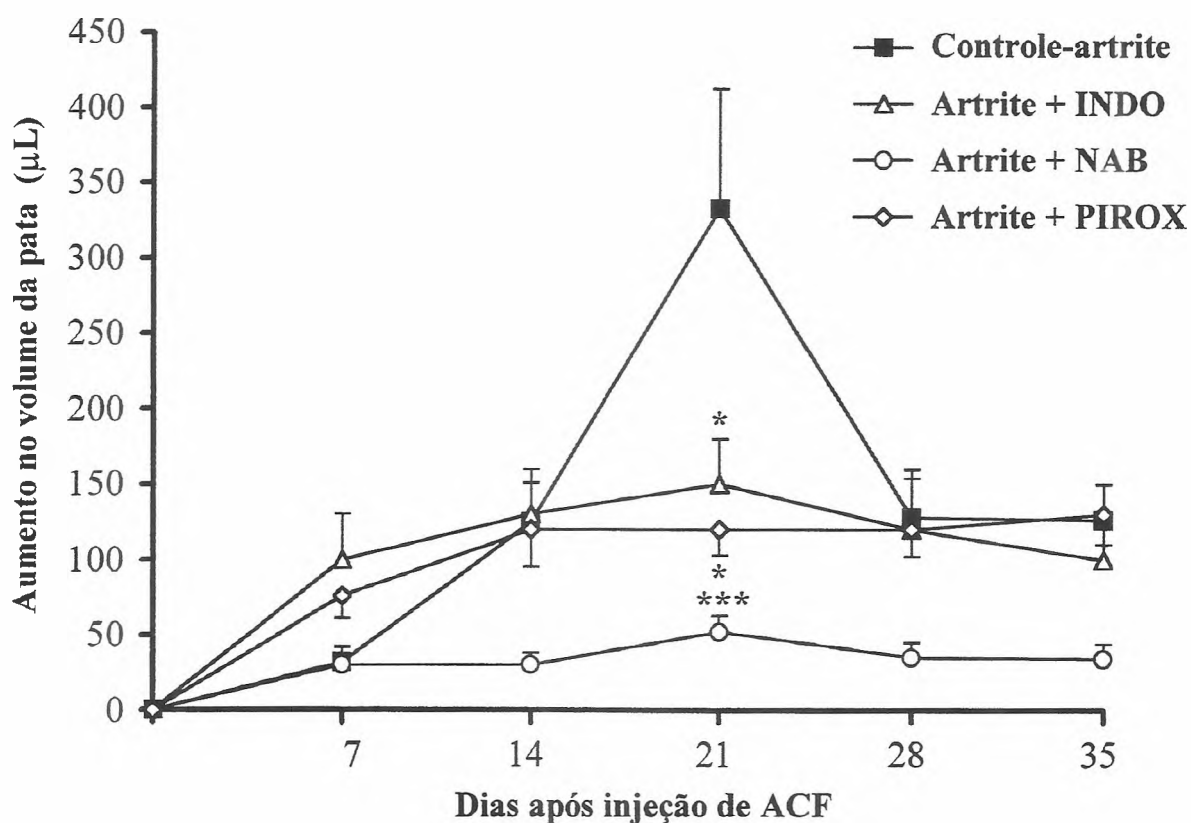


Figura 9 - Efeito de inibidores da ciclooxygenase na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite

Os animais foram tratados com salina 154 mM (controle-artrite; n=24), INDO (indometacina 2 mg/kg, v.o.; n=17), NAB (nabumetona 20 mg/kg, v.o.; n=11) ou PIROX (piroxicam 2 mg/kg, v.o.; n=12) durante 35 dias, após a inoculação de ACF. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels, estando expressos como Média $\pm$ EPM. *p<0,05 e ***p<0,001.

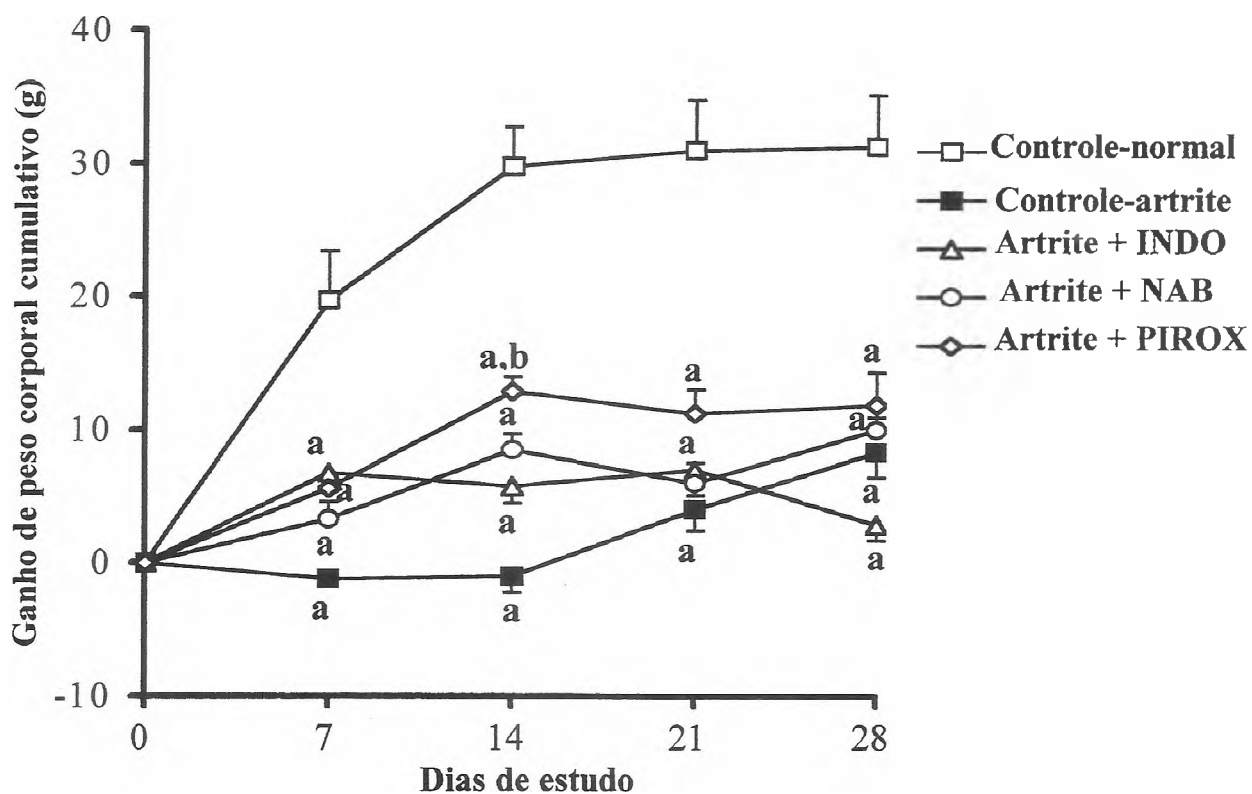


Figura 10 - Efeito de inibidores da ciclooxigenase no ganho de peso corporal em ratas com artrite

Os animais foram pesados semanalmente a partir do dia da inoculação de ACF e tratados diariamente com salina 154 mM (controle-artrite; n=44), INDO (indometacina 2 mg/kg, v.o.; n=17), NAB (nabumetona 20 mg/kg, v.o.; n=10) ou PIROX (piroxicam 2 mg/kg, v.o.; n=12), durante todo o período experimental, sendo comparados a um grupo controle-normal (n=8), tratado com salina 154 mM. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels, estando expressos como Média $\pm$ EPM. ^ap<0,001, comparado ao controle-normal; ^bp<0,01, comparado ao controle-artrite.

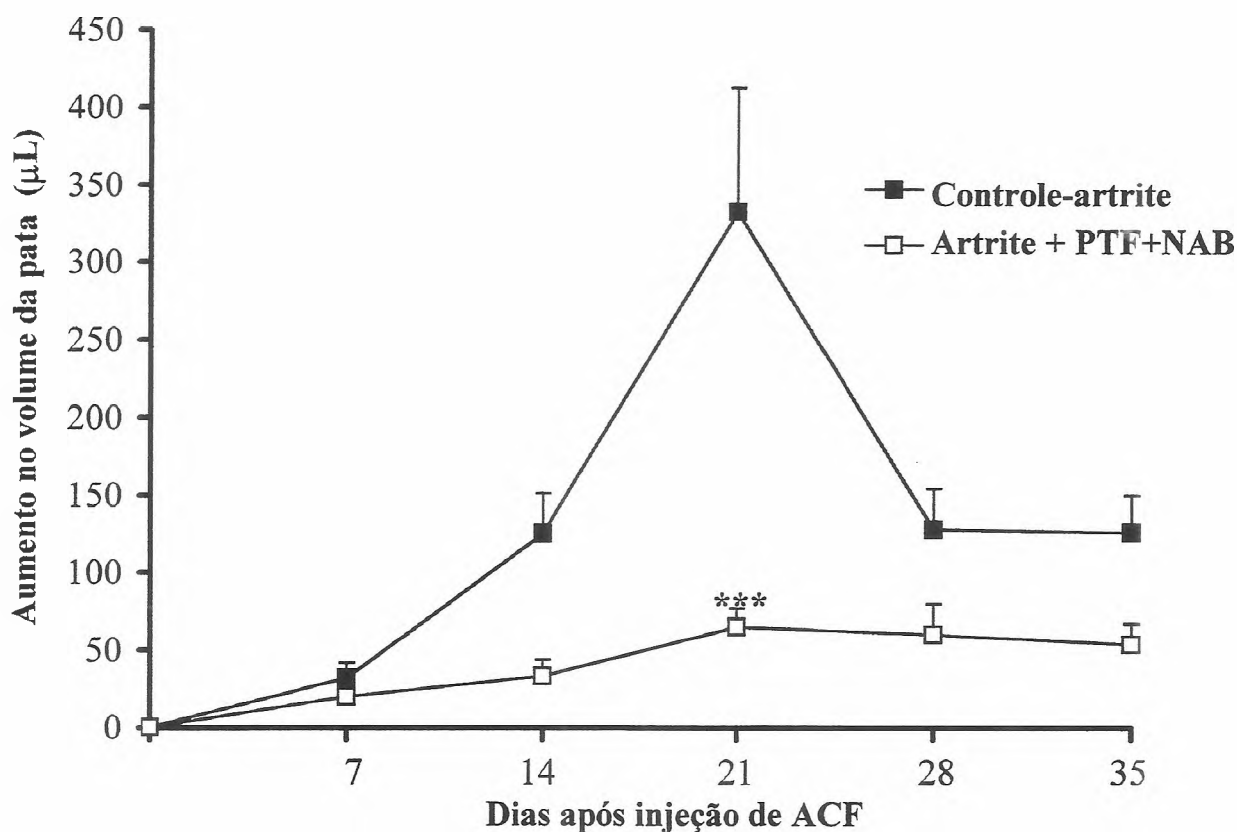


Figura 11 - Efeito da associação de um inibidor de ciclooxigenase 2 e um inibidor da síntese de $\text{TNF}\alpha$ na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite

Os animais foram tratados com salina 154 mM (controle-artrite; n=24) ou PTF+NAB (pentoxifilina 20 mg/kg, v.o. + nabumetona 20 mg/kg, v.o.; n=11) durante 35 dias, após a inoculação de ACF. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels, estando expressos como Média $\pm$ EPM. ***p<0,001.

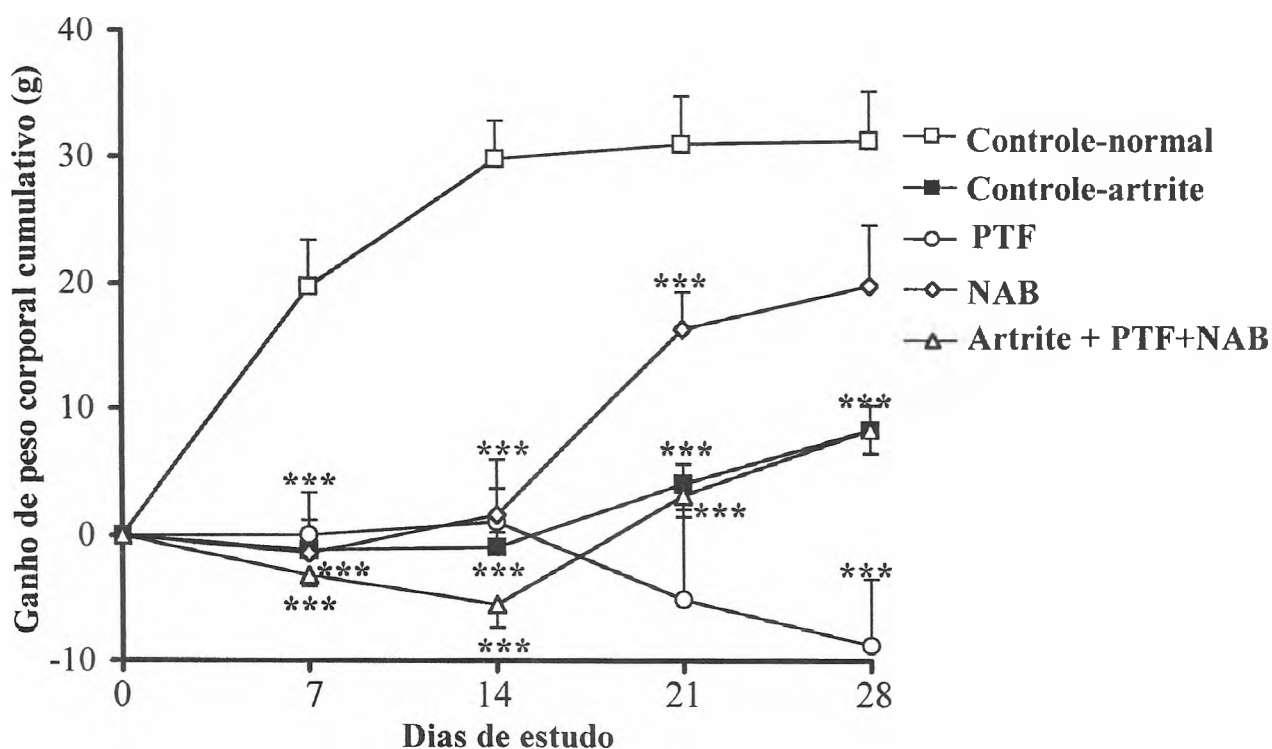


Figura 12 - Efeito da associação de um inibidor da ciclooxigenase e da síntese de $\text{TNF}\alpha$ no ganho de peso corporal em ratos com artrite

Ratas com artrite induzida por injeção de ACF foram tratadas com salina 154 mM (controle-artrite; n=24) ou com a associação PTF+NAB (pentoxifilina 20 mg/kg, v.o. + nabumetona 20 mg/kg, v.o.; n=11) durante todo o período experimental, após a inoculação de ACF. Paralelamente, ratas normais foram tratadas com PTF (pentoxifilina 20 mg/kg, v.o.; n=12) ou com NAB (nabumetona 20 mg/kg, v.o.; n=7) durante o mesmo intervalo de tempo. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels, estando expressos como Média $\pm$ EPM. ***p<0,001.

Figura 13 – Histopatologia das lesões inflamatórias em secções sagitais da articulação tibiotársica em ratas com artrite

O painel (a) mostra a aparência da articulação normal. Os painéis (b e c) mostram as alterações inflamatórias na articulação contralateral (reação secundária) no 20^o dia após a injeção de ACF: (b) hiperplasia sinovial e severa infiltração leucocítica na camada sub-sinovial (seta); (c) *pannus* inflamatório invadindo o osso subcondral (seta). Nos painéis (d, e e f) observa-se ausência de infiltração celular e hiperplasia sinovial nas articulações de ratas com artrite tratadas com (d) pentoxifilina 20 mg/kg, v.o. ou (e) nabumetona 20 mg/kg, v.o. e (f) pentoxifilina 20 mg/kg, v.o. + nabumetona 20 mg/kg, v.o.. (HE) x 100.

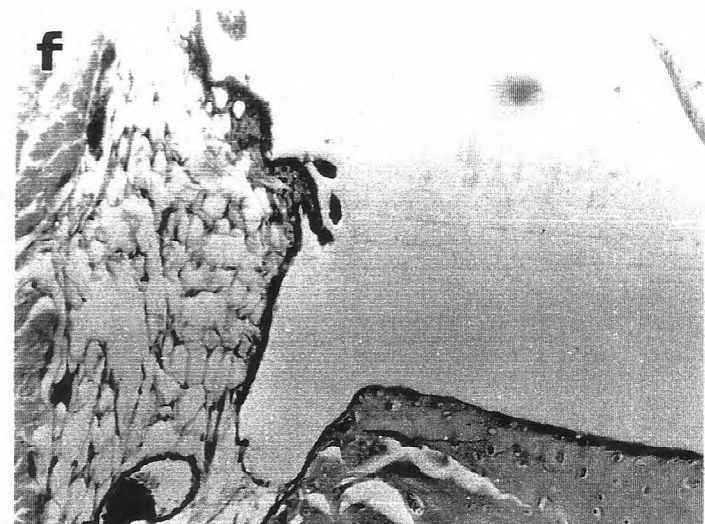
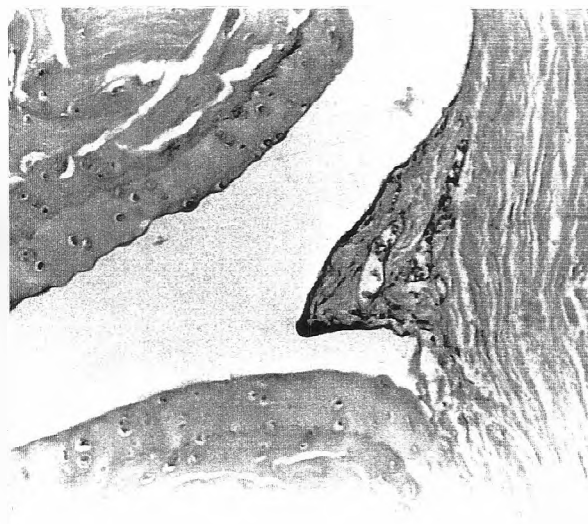
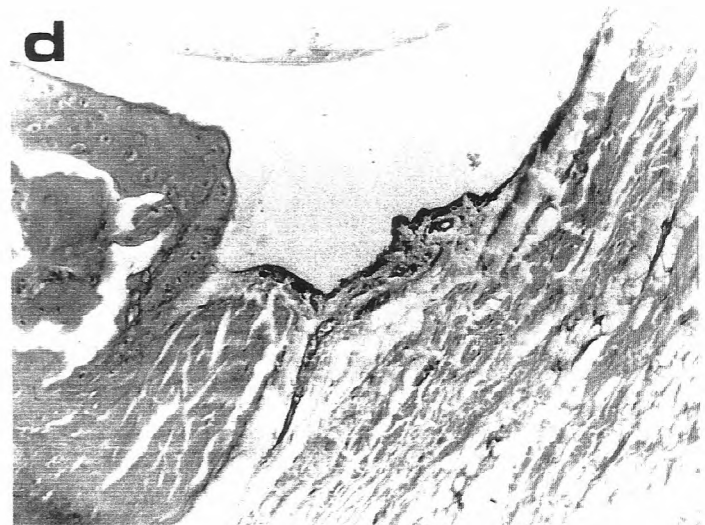
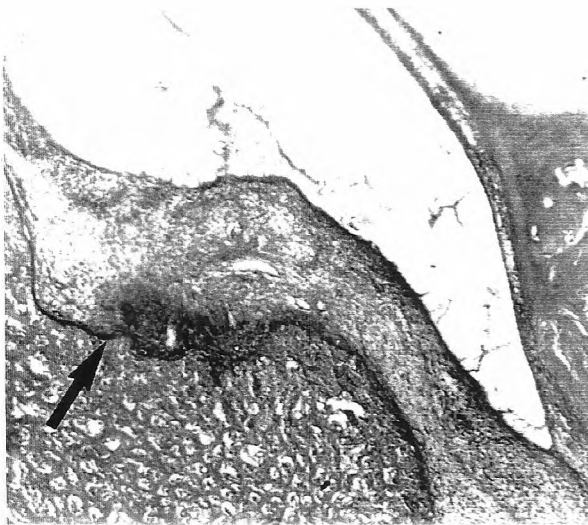
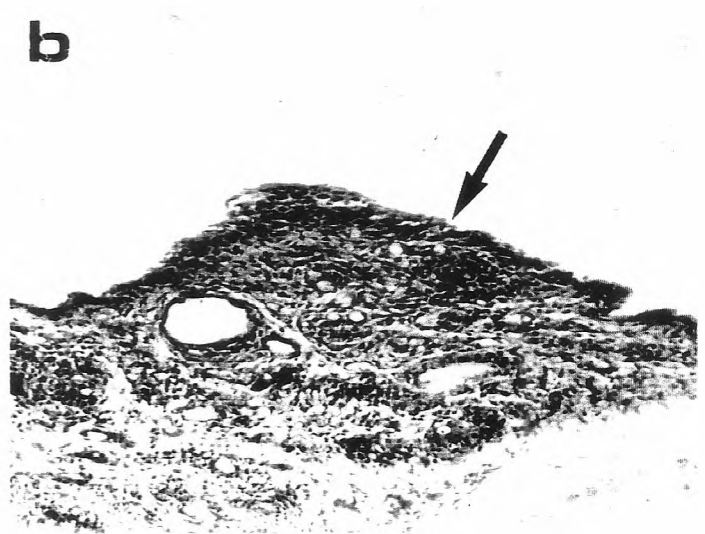


Tabela 5. Características histopatológicas observadas na articulação tibiotársica de ratas com artrite tratadas com inibidores da COX-2 e da síntese de TNF isoladamente ou em associação.

Histopatologia	Número da rata															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	Controle				NAB				PTF				PTF + NAB			
Hiperplasia sinovial	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Formação de vilos	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
Deposição de fibrina	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
Infiltração geral	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Formação de <i>pannus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erosão da cartilagem	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Destruição óssea	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Destruição de cartilagem	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Presença de artrite	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ratas com artrite foram tratadas por via oral com salina 154 mM (controle), NAB (nabumetona 20 mg/kg), PTF (pentoxifilina 20mg/kg) ou a associação PTF + NAB (pentoxifilina 20 mg/kg + nabumetona 20 mg/kg), a partir da injeção de ACF, sendo sacrificadas no 21^o dia após indução da doença e analisada por microscopia óptica a lesão da pata contralateral.

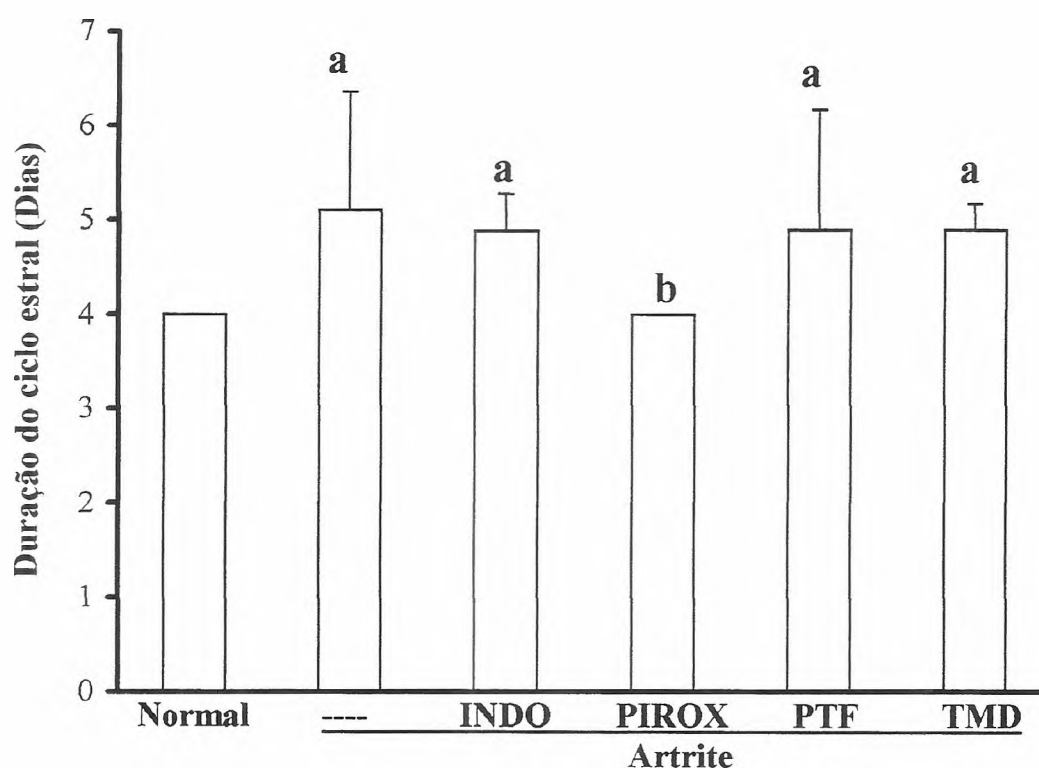


Figura 14 - Efeito de inibidores da ciclooxigenase e da síntese de $\text{TNF}\alpha$ no ciclo estral da rata com artrite

Foi estudada a duração do ciclo estral em fêmeas normais e com artrite induzida por ACF, pelo exame do esfregaço vaginal dos animais do 14^o até o 35^o dia após injeção de ACF. Os animais com artrite foram tratados com INDO (indometacina 2 mg/kg, v.o.; n=8), PIROX (piroxicam 2 mg/kg, v.o.; n=8), PTF (pentoxifilina 20 mg/kg, v.o.; n=10) ou TMD (talidomida 10 mg/kg, v.o.; n=11) sendo examinados no mesmo período de tempo. Os dados estão aqui apresentados como Média $\pm$ EPM e foram comparados através do teste 't' de Student não-pareado. ^ap<0,001, comparado ao controle normal (n=8); ^bp<0,001, comparado ao controle com artrite (n=18), tratado com salina 154 mM.

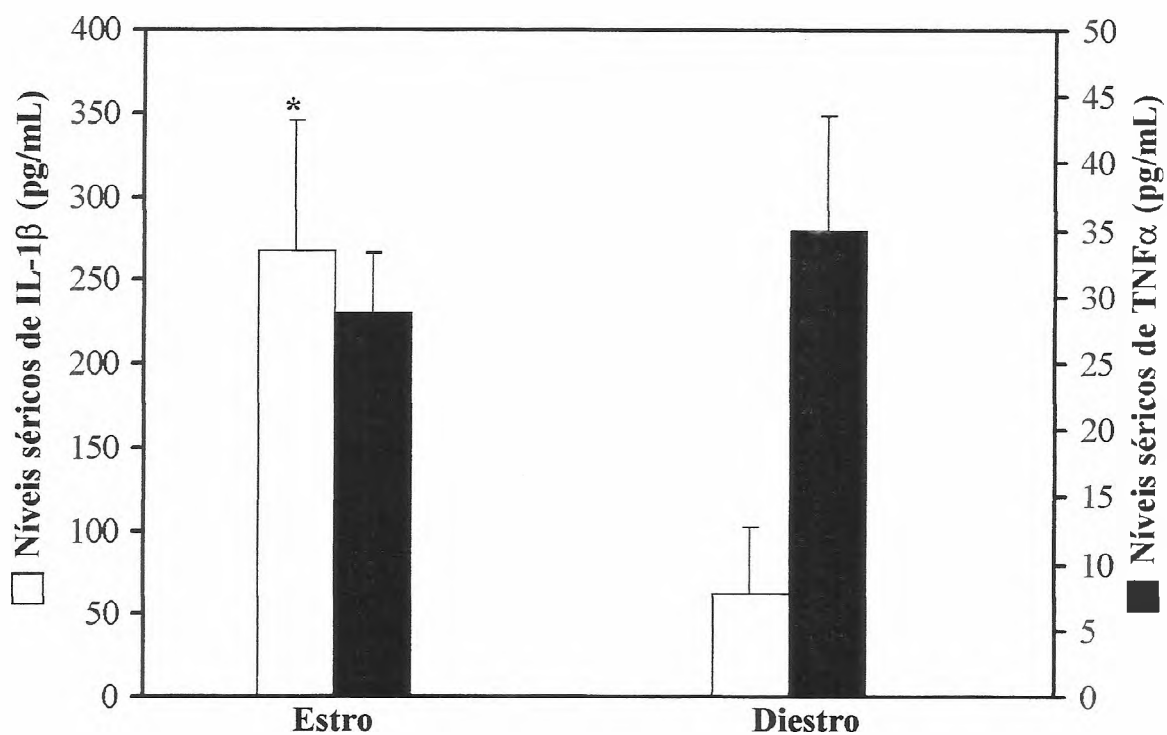


Figura 15 - Níveis circulantes de IL-1 β e TNF α no ciclo estral da rata normal

Foram medidas as concentrações séricas de IL-1 β e TNF α durante as fases de estro e diestro do ciclo estral da rata normal. Os dados estão aqui apresentados como Média $\pm$ EPM (n=5). Os grupos foram comparados com teste 't' de Student não-pareado. *p<0,05; comparado com o nível sérico de IL-1 β no diestro.

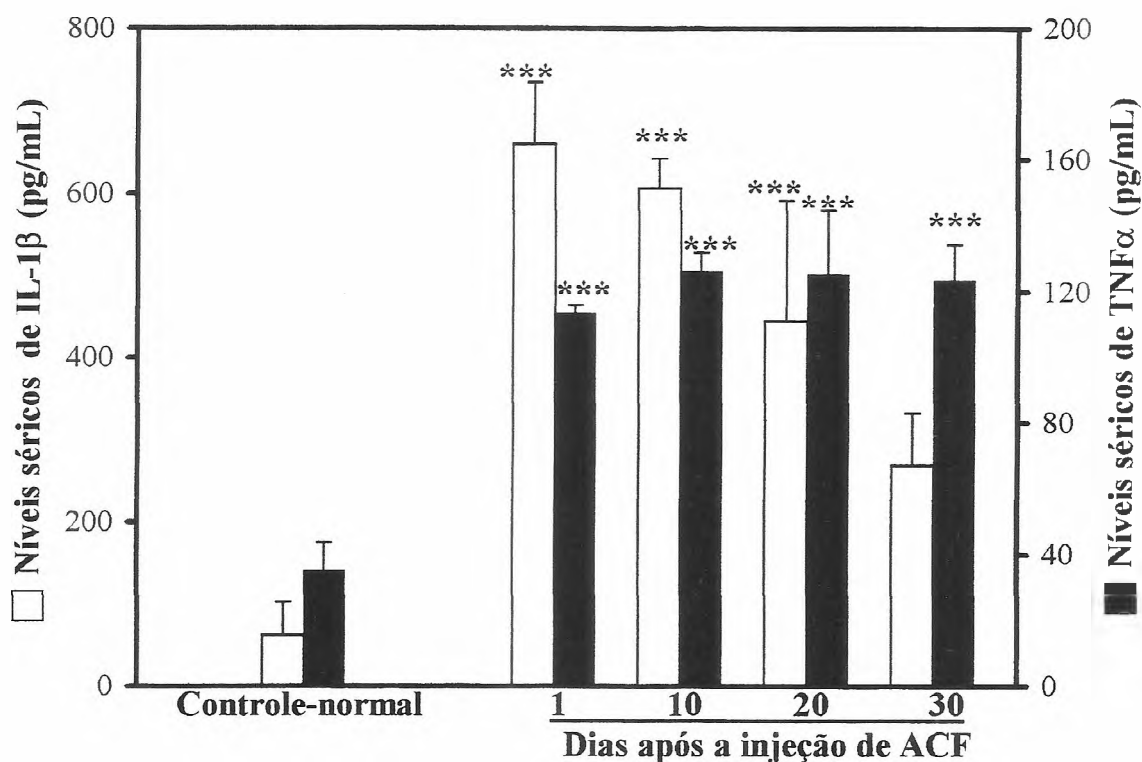


Figura 16 - Níveis circulantes de IL-1 β e TNF α em ratas com artrite

A artrite foi induzida pela inoculação subplantar de 0,1 mL de ACF na pata traseira direita das ratas e o nível sérico de citocinas foi determinado no decorrer do tempo, a partir do 1^o dia (5 h após injeção de ACF), e a seguir no 10^o, 20^o e 30^o dia após a injeção do adjuvante. Os dados representam a Média $\pm$ E.P.M. (n= 4-5 animais por grupo). ***p<0,001, comparado ao grupo controle-normal; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels.

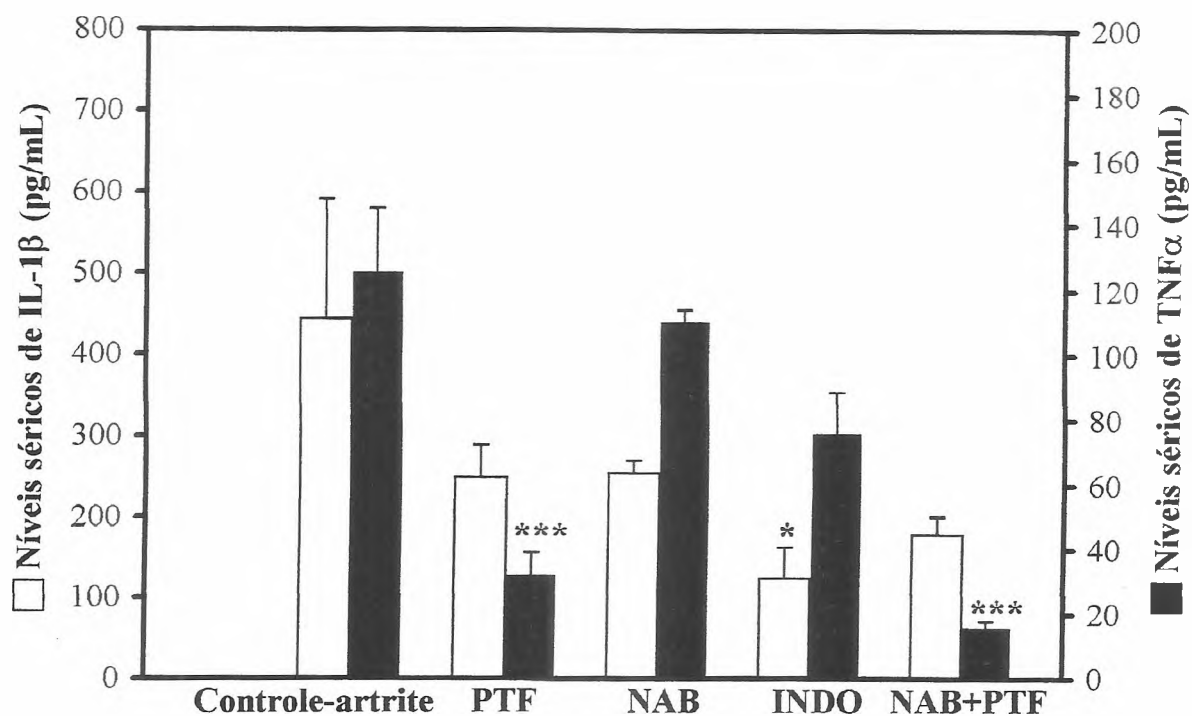


Figura 17 - Efeito de inibidores de ciclooxygenase e da síntese de TNF α nos níveis circulantes de IL-1 β e TNF α em ratas com artrite

Os níveis séricos de IL-1 β e TNF α foram medidos no 20^o dia após a inoculação de ACF (0,1 mL/animal). As ratas foram tratadas por via oral com salina 154 mM (controle-artrite), PTF (pentoxifilina 20 mg/kg), NAB (nabumetona 20 mg/kg), INDO (indometacina 2 mg/kg) ou com PTF+NAB (pentoxifilina 20 mg/kg + nabumetona 20 mg/kg). Os valores encontram-se expressos como Média $\pm$ EPM. (n= 4-5 animais por grupo). *p<0,05 e ***p<0,001, comparado ao grupo controle-artrite; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels.

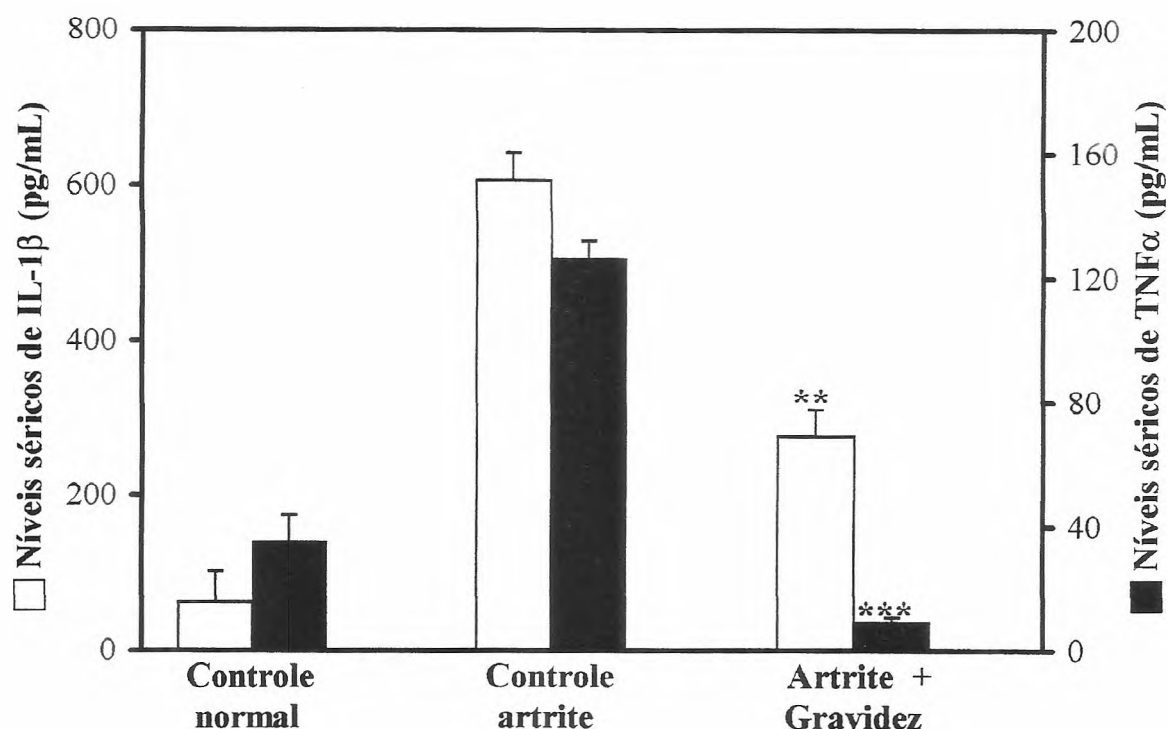


Figura 18 - Efeito da gravidez nos níveis circulantes de IL-1 β e TNF α em ratas com artrite no dia do parto

Foi medido o nível sérico de IL-1 β e TNF α no 21^o dia de gravidez, correspondente ao 14^o dia após a injeção de ACF, em ratas grávidas nas quais foi injetado ACF no 7^o dia de gestação (Artrite + gravidez), comparando-se com os níveis séricos destas citocinas no grupo controle-artrite (10 dias após injeção de ACF) e com o grupo controle-normal (animais normais). Os valores encontram-se expressos como Média $\pm$ EPM. (n= 4-5 animais por grupo). **p<0,01 e ***p<0,001, comparado ao grupo controle-artrite; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels.

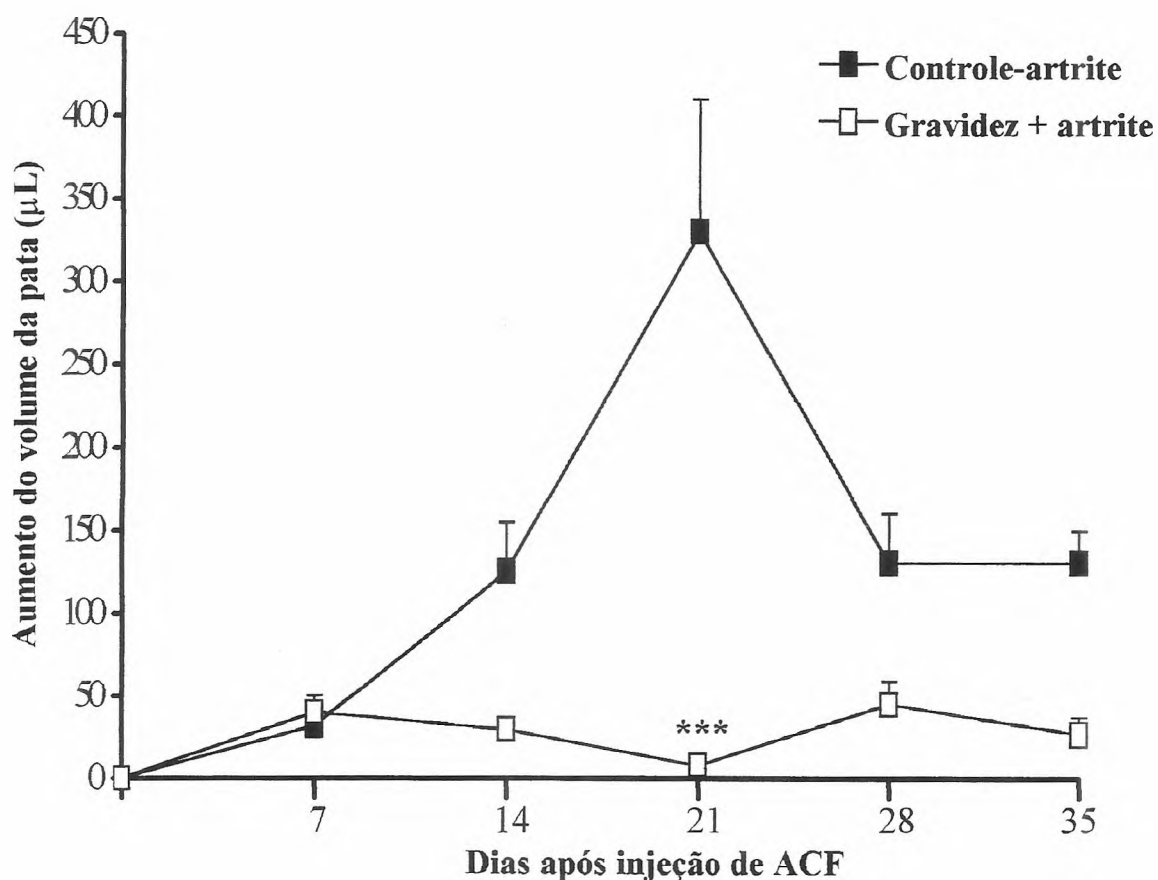


Figura 19 - Efeito da gravidez na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite

Foi induzida artrite através da inoculação de ACF subplantar (0,1 mL) nas fêmeas do grupo controle-artrite (n= 24), e grávidas (Gravidez+artrite), no 7º dia de gravidez (n=15). O desenvolvimento da lesão na pata contralateral (reação inflamatória secundária) foi medido nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35 após injeção de ACF. Os dados estão expressos como Média $\pm$ EPM. e foram submetidos a ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels. ***p<0,001.

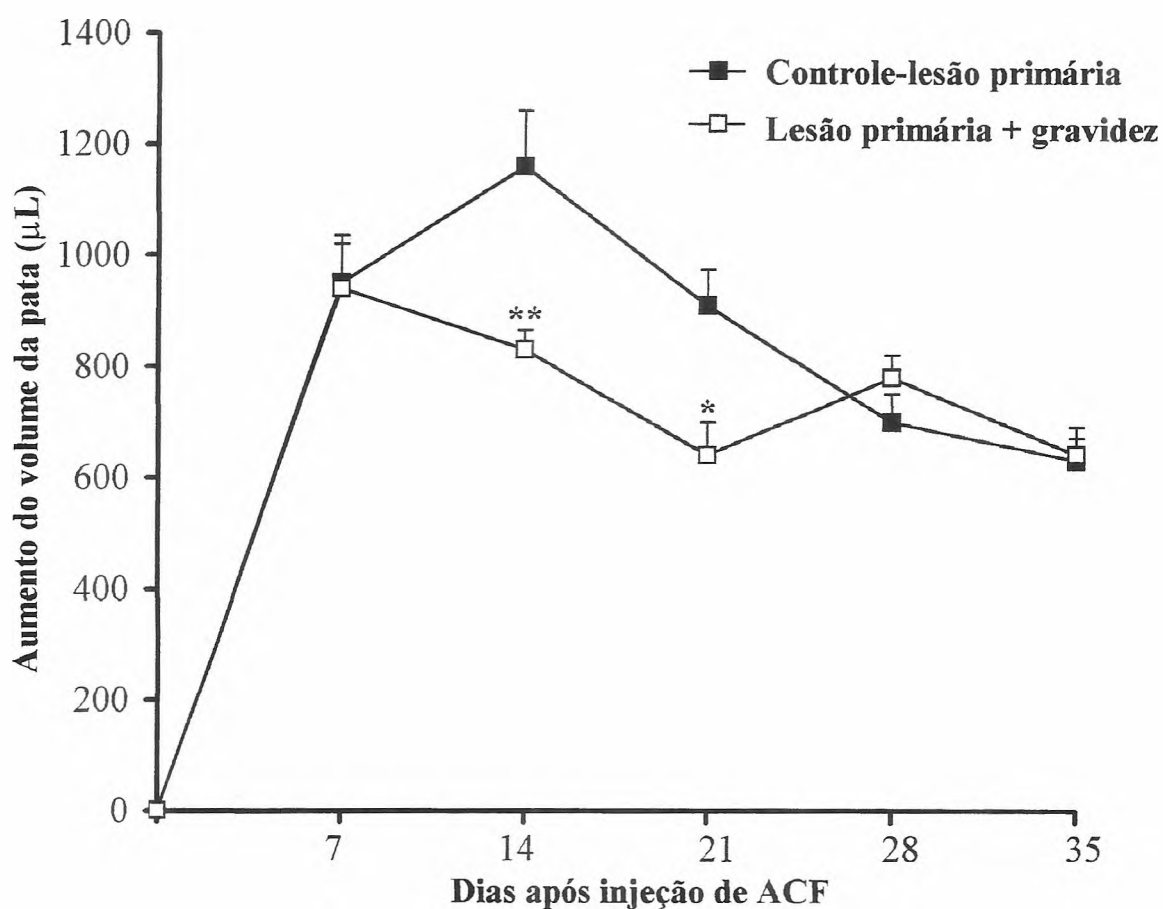


Figura 20 - Efeito da gravidez na lesão inflamatória primária em ratas com artrite

As ratas controle (controle-lesão primária; n=12) receberam injeção subplantar de ACF (0,1 mL) na pata traseira direita, sendo medido o volume da pata injetada nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35 após inoculação do adjuvante. Paralelamente, nas ratas grávidas (lesão primária+gravidez; n=9) foi inoculado o ACF, no 7^o dia de gravidez e, a partir daí, foi medido o volume da pata injetada no período de tempo supracitado. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels, estando expressos como Média $\pm$ EPM. *p<0,05 e **p<0,01.

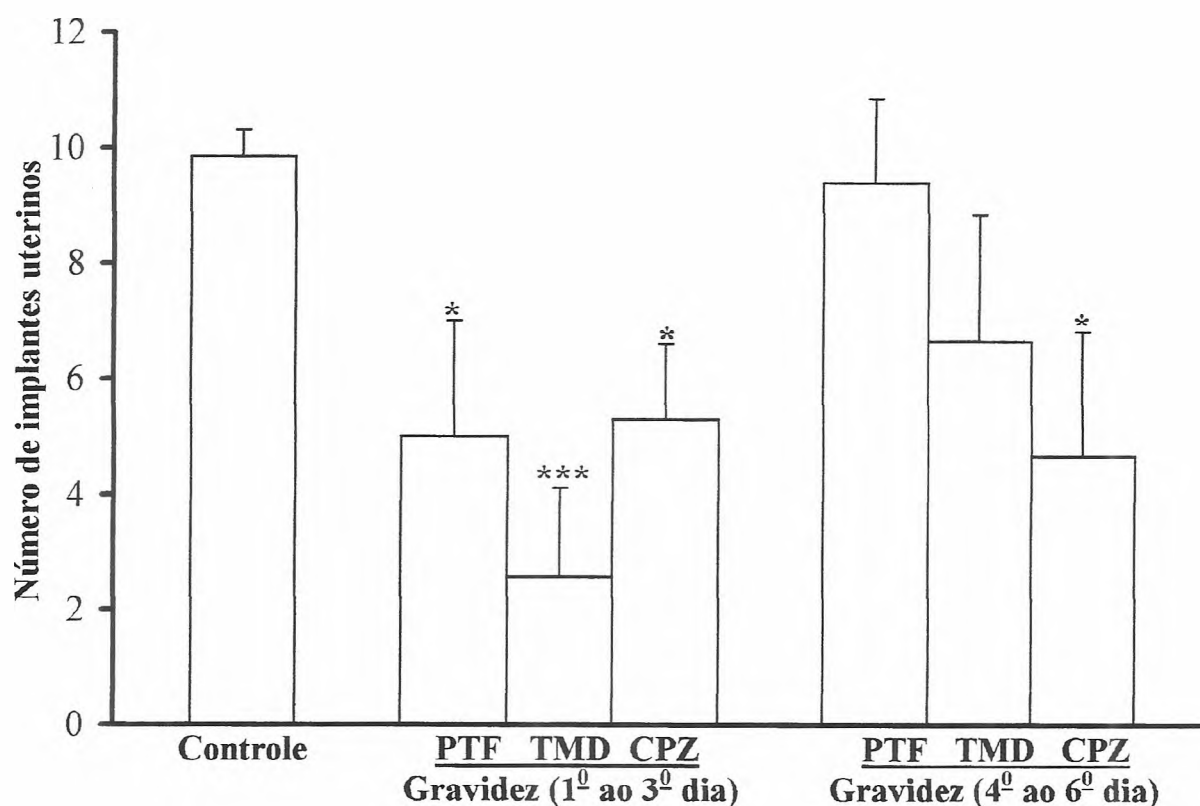


Figura 21 - Efeito de inibidores da síntese de $TNF\alpha$ na implantação do blastocisto na rata

As ratas foram tratadas do 1º ao 3º dia (n=6-7) ou do 4º ao 6º (n=5-6) de gravidez com PTF (pentoxifilina 30 mg/kg), TMD (talidomida 10 mg/kg) e CPZ (clorpromazina 30 mg/kg), por via oral, uma vez por dia, determinando-se o número de ovoimplantações no 10º dia de gravidez nos respectivos grupos. Um grupo controle normal (n=6) tratado com salina 154 mM (10 mL/kg, v.o.) foi incluído para comparação. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels e estão representados como Média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

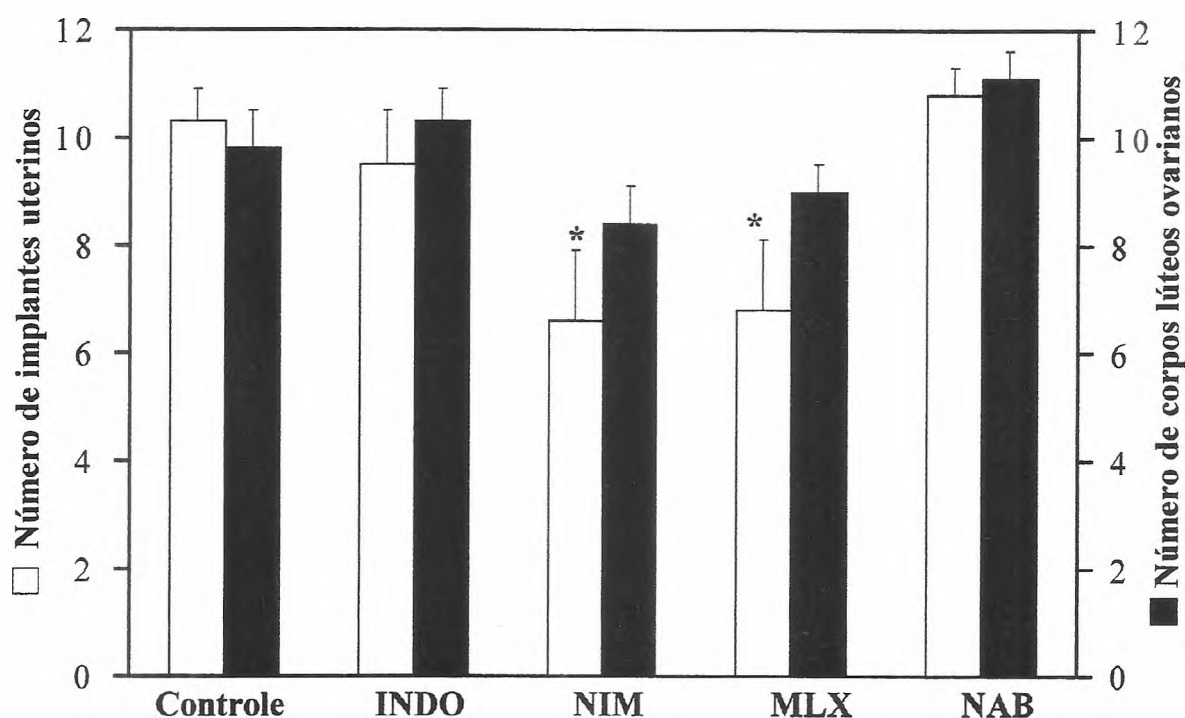


Figura 22 - Efeito dos inibidores de ciclooxigenase 1 e 2 na ovoimplantação em ratas

A INDO (indometacina 2 mg/kg, v.o., duas vezes/dia; n=9), o NIM (nimesulide 5 mg/kg, v.o.; n= 11), o MLX (meloxicam 3 mg/kg, v.o.; n= 10) e a NAB (nabumetona 20 mg/kg, v.o.; n= 10) foram administrados do 1^o ao 7^o dia de gestação da rata e comparados ao grupo controle normal (n=19), tratado somente com salina 154 mM (1 mL/kg, v.o.), no mesmo período gestacional. Os animais foram laparotomizados no 10^o dia de gravidez, determinando-se o número de ovoimplantações uterinas e corpos lúteos ovarianos. Os dados estão representados como Média $\pm$ EPM. e foram previamente submetidos a ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels. *p<0,05.

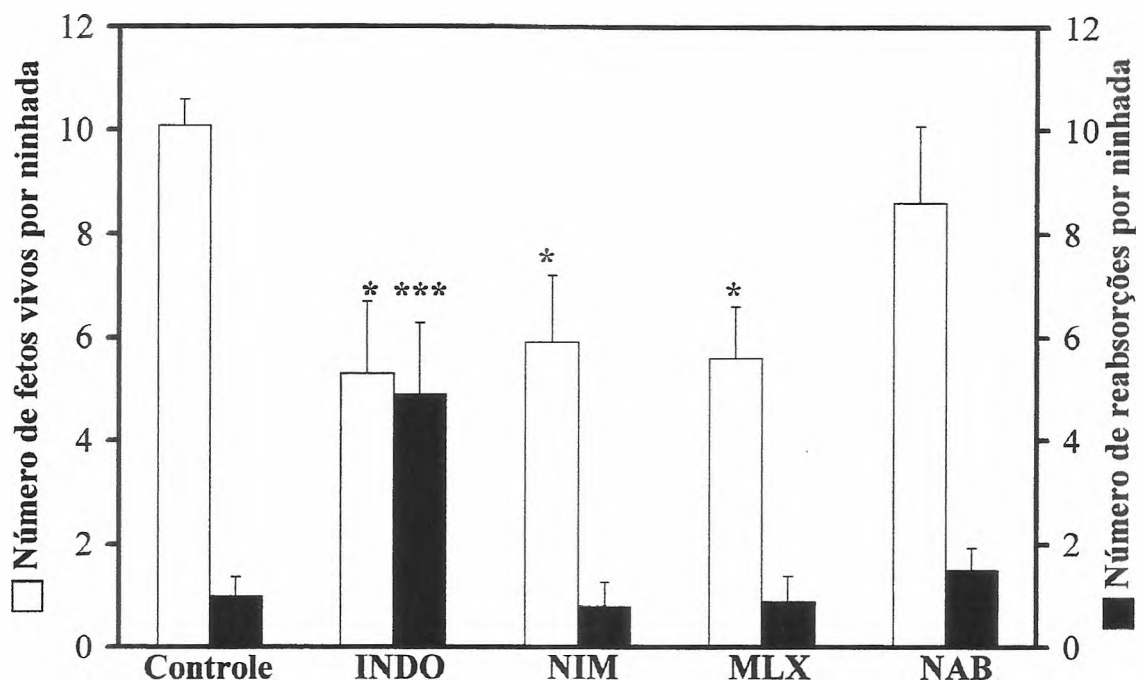


Figura 23 - Efeito de inibidores da ciclooxigenase 1 e 2 na gravidez da rata

As drogas-teste, INDO (indometacina 2 mg/kg), NIM (nimesulide 5 mg/kg), MLX (meloxicam 3 mg/kg) e NAB (nabumetona 20 mg/kg) ou salina 154 mM, foram administradas, por via oral, uma vez por dia, do 1º to 7º dia de gravidez, exceto a indometacina que foi injetada duas vezes por dia, durante o mesmo período de tempo. Todas as ratas foram laparotomizadas no 20º dia de gravidez, sendo determinado o número de fetos vivos e reabsorções fetais. Os dados estão representados como Média ± EPM (n=10). ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels. *p<0,05 e ***p<0,001.

Tabela 6. Efeitos da administração de inibidores da ciclooxigenase 1 e 2 no início da gestação sobre parâmetros avaliados no 20^o dia de gravidez

Tratamentos	Número de fêmeas com fetos vivos	Total de fetos vivos/mortos	Peso corporal fetal (g)	Peso da placenta (g)	<u>Peso da placenta</u> Peso corporal fetal
Controle	10 (10)	101/0	2.5 ± 0.07	0.44 ± 0.01	0.18 ± 0.04
Indometacina 2 mg/kg, v.o	2 (10)	16/0	2.9 ± 0.30	0.43 ± 0.02	0.17 ± 0.01
Nimesulide 5 mg/kg, v.o	8 (10)	59/0	2.0 ± 0.02***	0.41 ± 0.01	0.20 ± 0.04**
Meloxicam 3 mg/kg, v.o	9 (10)	55/1	1.9 ± 0.04***	0.42 ± 0.01	0.22 ± 0.05***
Nabumetone 20 mg/kg, v.o	9 (10)	86/0	2.1 ± 0.02***	0.44 ± 0.01	0.21 ± 0.04***

Os valores de peso corporal fetal e a relação peso da placenta/peso corporal fetal estão representados como Média ± EPM. O número total de ratas grávidas por grupo está indicado entre parênteses. Os controles receberam salina 154 mM e os demais grupos receberam os respectivos tratamentos diariamente, do 1^o ao 7^o dia de gravidez, exceto a indometacina, que foi administrada duas vezes por dia. ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls (**p<0.01 e ***p<0.001).

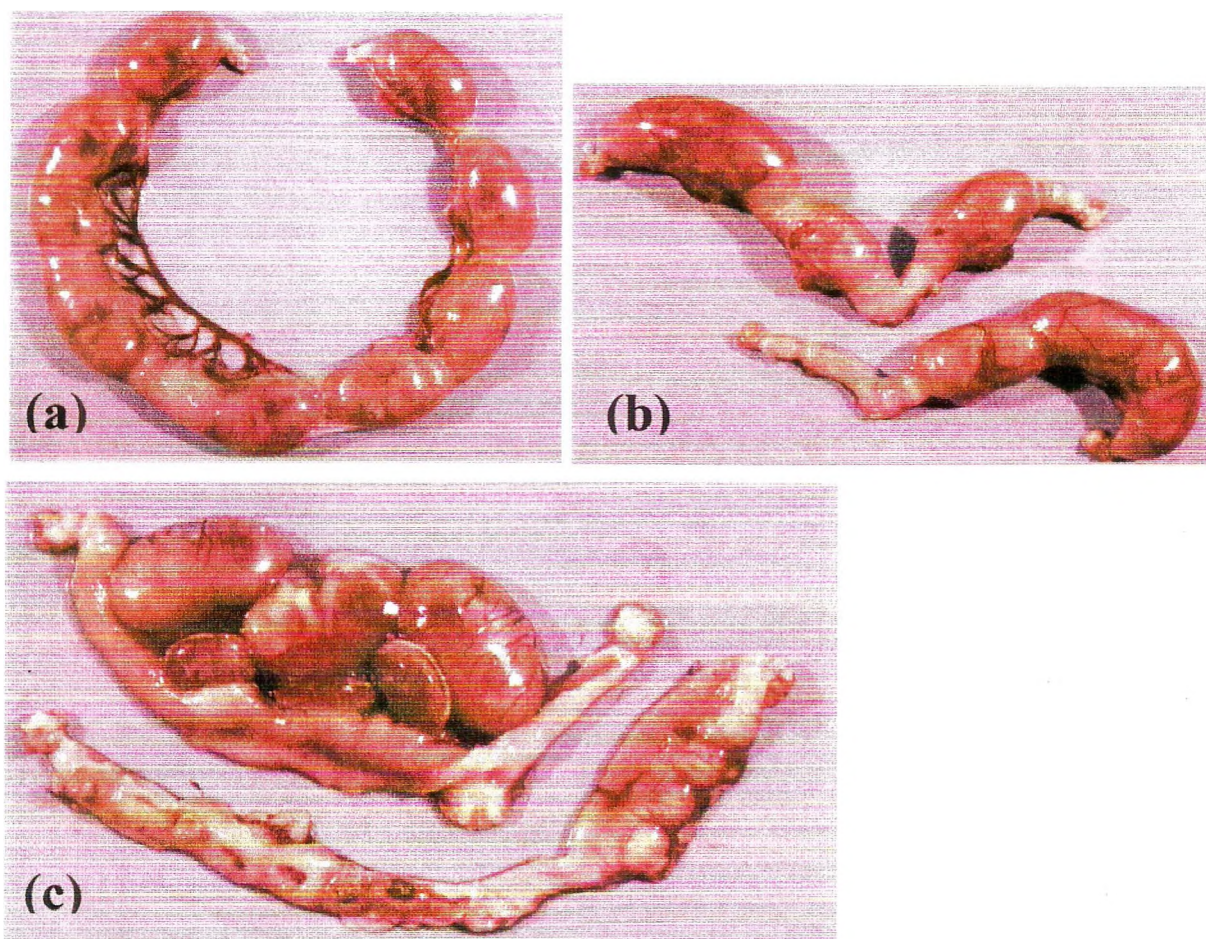


Figura 24 - Fetos no útero de ratas normais e tratadas com inibidores da ciclooxigenase.

No painel (a) vê-se o útero de uma rata normal no 20^o dia de gravidez, enquanto que (b) mostra úteros de fêmeas tratadas do 1^o ao 7^o dia de gestação com meloxicam (3 mg/kg, v.o.) no 20^o dia de gravidez, onde nota-se grande redução do número de fetos. Em (c) são mostrados os úteros de fêmeas grávidas tratadas com meloxicam (3 mg/kg, v.o.) ou indometacina (2 mg/kg, v.o. duas vezes/dia) no mesmo período gestacional que em (b): o tratamento com meloxicam (superior) promove redução do número de fetos, e com indometacina (inferior) aumenta o número de reabsorções de fetais.

Tabela 7. Efeito da indução de artrite na rata grávida (7^o dia de gestação) e da indução de gravidez na rata com artrite (10^o ao 15^o dia após ACF) nos parâmetros maternos e neonatais no dia do nascimento.

Tratamentos	Número de fêmeas acasaladas/ fêmeas grávidas	Número total de filhotes vivos/mortos	Peso corporal dos filhotes (g)	Extensão crânio-base da cauda dos filhotes (cm)	Número de fêmeas grávidas/paridas
Controle	6/6	61/0	5,65 ± 0,09	3,73 ± 0,03	6/6 (0)
Gravidez + artrite	15/15	48/0	5,32 ± 0,06***	3,99 ± 0,06	15/5 (2)
Artrite + gravidez	32/31	21/1	5,88 ± 0,17	3,86 ± 0,08	31/5 (0)
+ gravidez + INDO (2 mg/kg, v.o.)	8/7	2/0	6,45 ± 0,51	4,15 ± 0,35	7/1 (1)
+ gravidez + NAB (20 mg/kg, v.o.)	8/6	0/2	----	----	6/1 (1)
+ gravidez + PTF (20 mg/kg, v.o.)	8/7	8/0	5,81 ± 0,19	3,79 ± 0,07	7/1 (0)

Os valores de peso corporal e extensão crânio-base da cauda dos filhotes estão representados como Média ± EPM. O número de ratas grávidas mortas por grupo está indicado entre parênteses. Gravidez+Artrite = fêmeas grávidas nas quais foi induzida artrite no 7^o dia de gravidez. Artrite+gravidez = ratas com artrite nas quais foi induzida gravidez entre o 10^o e 15^o dia após injeção de ACF. Os controles receberam salina 154mM e os demais grupos receberam os respectivos tratamentos diariamente, do 1^o ao 35^o dia após a injeção de ACF, sendo também acasalados entre o 10^o e 15^o dia após injeção de ACF. ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls. ***p<0,001; comparado ao grupo controle.

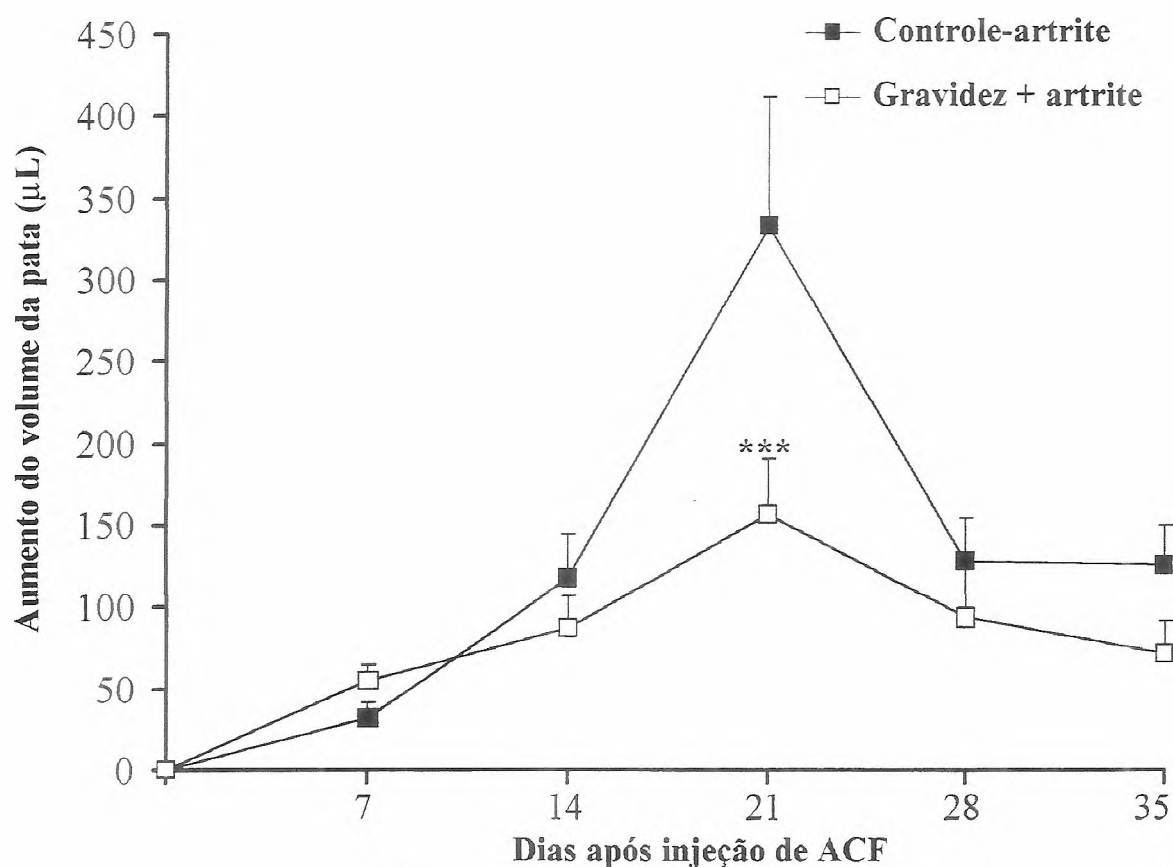


Figura 25 - Efeito da indução da gravidez na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite

O ACF foi inoculado (0,1 mL/animal) na região subplantar da pata traseira direita de ratas Wistar e, a seguir, media-se a intervalos semanais o volume da pata contralateral (reação secundária). Foi induzida gravidez nestes animais (n=31), entre o 10^o e o 15^o dia após a inoculação de ACF, comparando-se aos animais com artrite (n=24) tratados com salina 154 mM. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels e estão representados como Média $\pm$ EPM. ***p<0,001.

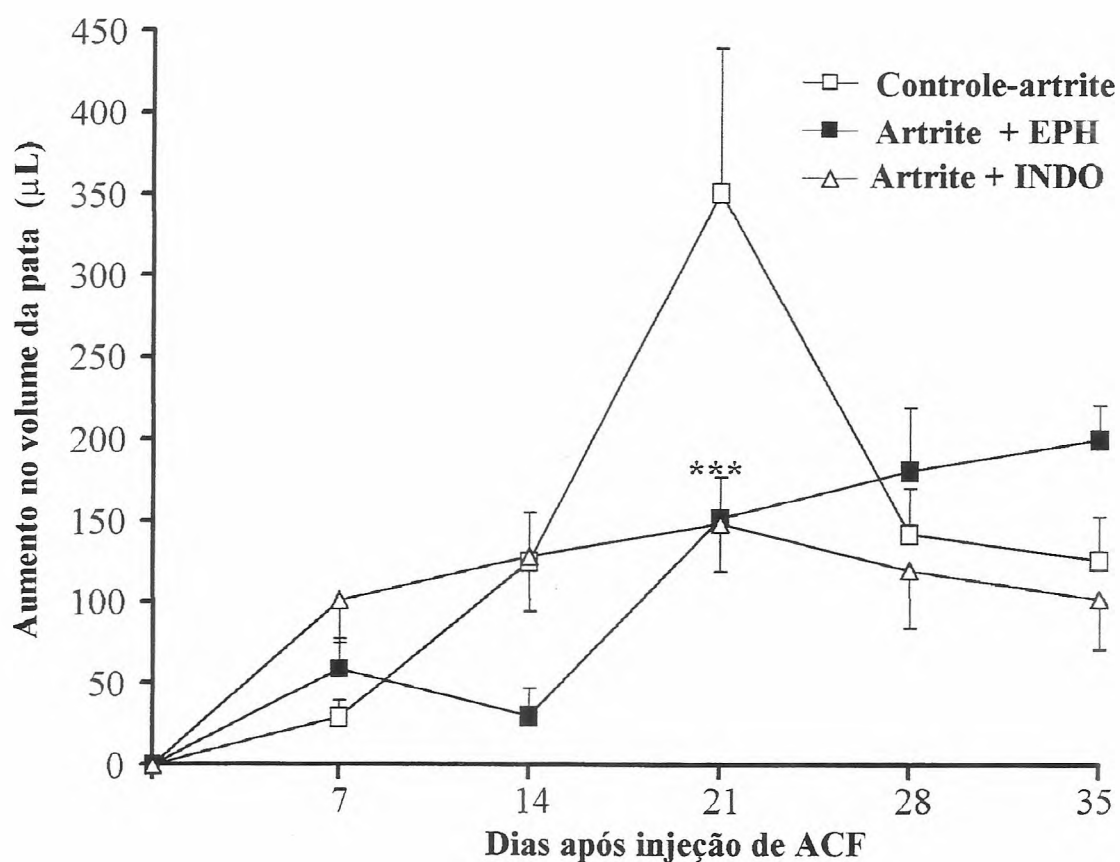


Figura 26 - Efeito do EPH e da indometacina na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite

O EPH foi administrado na dose de 400 mg/kg, por via i.p. (n=8), do 10^o ao 20^o dia a partir da indução da artrite, enquanto a indometacina (2 mg/kg, v.o.; n=8) foi injetada durante 35 dias a partir da inoculação de ACF, sendo comparados ao grupo controle-artrite tratado somente com salina 154 mM (n=20). Os dados encontram-se expressos como Média $\pm$ EPM e foram submetidos a ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels. ***p<0,001.

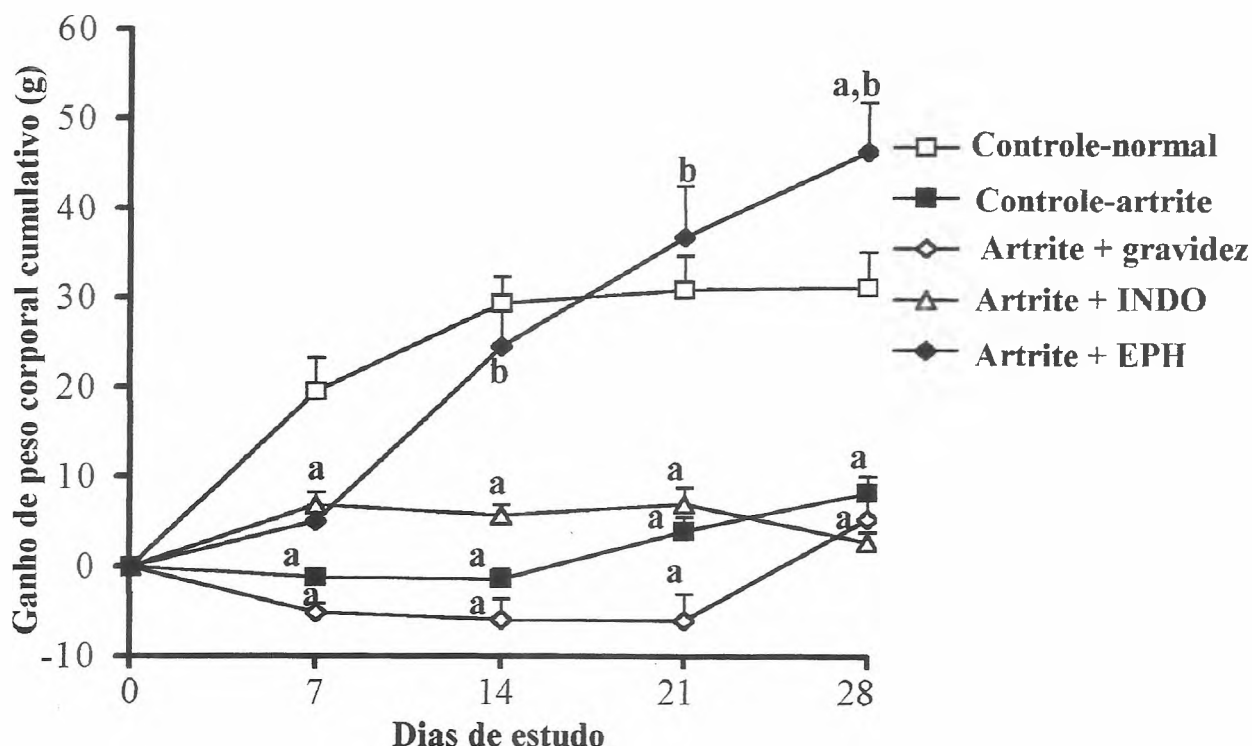


Figura 27 - Efeito da gravidez e do EPH no ganho de peso corporal em ratas com artrite

O EPH foi administrado na dose de 400 mg/kg, por via i.p. (n=8), do 10^o ao 20^o dia a partir da indução da artrite, promovendo um aumento significativo do ganho de peso corporal, quando comparado aos animais com artrite tratados somente com salina 154 mM (1 mL/kg, v.o.; n=20) ou com indometacina (2 mg/kg, v.o.; n=8). Nos animais do grupo Artrite+gravidez (n=31), as fêmeas foram acasaladas entre o 10^o e o 15^o dia após a inoculação de ACF. Os dados encontram-se expressos como Média $\pm$ EPM e foram submetidos à ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels. ^ap<0,001, comparado ao grupo controle-normal; ^bp<0,001, comparado ao grupo controle-artrite.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi utilizado o modelo de artrite induzida por ACF na rata no intuito de avaliar a influência da doença inflamatória crônica nos processos reprodutivos. Demonstrou-se que a concentração sérica de IL-1 β e TNF α aumenta dramaticamente após a indução de artrite por ACF na rata. É presumível que a fonte celular destas citocinas seja os tecidos periféricos inflamados, um fato apoiado por investigações anteriores (SHINMEI et al., 1989; SMITH-OLIVER et al., 1993; CHOWDREY e LIGHTMAN, 1993). Foi também observado nesta investigação uma significativa redução do número de leucócitos, principalmente linfócitos, no sangue dos animais com artrite no 35^o dia após indução da doença, sugerindo que as células inflamatórias podem estar migrando para as articulações no curso da doença. Além disso, o presente trabalho também demonstra que, ao contrário da concentração sérica de IL-1, o TNF α mantém-se elevado durante todo o período da doença, indicando que o TNF α possa ser a principal citocina envolvida na patogênese da AR na rata. Estudos experimentais e clínicos recentes são concordantes com esta hipótese, McCOMB et al. (1999), por exemplo, demonstraram que em ratos com artrite induzida por adjuvante, tratados com o receptor solúvel de TNF tipo I, ocorre intensa inibição da destruição articular, bem como uma diminuição das manifestações sistêmicas da doença, enquanto BENDELE et al. (1999) observaram apenas uma modesta diminuição da inflamação

articular quando IL-1ra foi administrado a pacientes com AR e a ratos com artrite induzida por adjuvante. Outros estudos também documentam que o TNF α contribue para a perpetuação da destruição das articulações na AR em virtude de sua capacidade de induzir proliferação de sinoviócitos e estimular a produção de outros mediadores tais como o fator de ativação plaquetária, prostaglandinas, metaloproteinases e citocinas pró-inflamatórias (DAYER et al., 1985; LUPIA et al., 1996). É interessante salientar que, diferentemente do presente estudo, PHILIPPE et al. (1997) utilizando ratos Lewis notaram um aumento da concentração plasmática de TNF α somente durante a fase inicial da artrite por adjuvante (6 horas após a injeção do adjuvante), sem evidenciar muita alteração nos níveis de IL-1 β . É provável que as diferenças entre as linhagem de animais (Wistar x Lewis) e os protocolos experimentais possam ter contribuído para as diferenças observadas no perfil de citocinas obtidas nos dois estudos (SILVA et al., 1999; PHILIPPE et al., 1997).

Verificou-se também na presente investigação que os níveis circulantes de IL-1 β e, principalmente, de TNF α , encontram-se drasticamente reduzidos no dia do parto (21^o dia de gravidez) nas ratas grávidas com artrite. Evidências demonstram que a progesterona, estrógenos e cortisol podem desviar a imunidade celular mediada por células Th1 (produtoras de IL-12, INF γ , etc) durante a gestação, para um predomínio de células Th2 (produtoras de IL-4, IL-10, etc) e imunidade humoral, sendo este padrão invertido no período pós-parto (WILDER, 1998). Em

exacerba a produção de citocinas regulatórias, tais como o $\text{TNF}\alpha$ e a IL-2, pelos macrófagos (WILDER e ELENKOV, 1999), enquanto que a ocorrência de gravidez aumenta a produção de IL-10, uma citocina antiinflamatória e imunomodulatória, que parece ser de grande importância para a remissão da AR durante a gestação (HUIZINGA et al., 1999). Além disso, MAYMON et al. (1999) descreveram recentemente que o $\text{TNF}\alpha$ e seu receptor tipo I diminuem fisiologicamente no líquido amniótico nas mulheres normais com o avanço da gravidez, mas não em mulheres durante o parto prematuro. Paralelamente, KEELAN et al. (1999) demonstraram uma elevação no perfil de IL-1 β nos tecidos amnióticos e cório-decíduais em mulheres durante o período do parto, sugerindo que o controle dos níveis de ambas as citocinas, IL-1 β e $\text{TNF}\alpha$, pode ter importância crucial em várias etapas da gestação e do processo do parto.

O presente estudo revela que o desenvolvimento da resposta inflamatória articular primária e secundária reduz-se drasticamente quando da indução da artrite por ACF na rata no início do período gestacional (7^o dia de gestação) ou quando a gravidez ocorre com a artrite estabelecida (dia 10-15 após ACF). Estes resultados estão de acordo com informações anteriores que relatam uma melhora ou mesmo remissão dos sintomas e sinais da AR durante a gravidez em pacientes humanos (HENCH, 1938; NELSON et al., 1993; OSTENSEN, 1999). Tem sido sugerido que a susceptibilidade feminina à AR é mediada em grande parte pelos hormônios sexuais, particularmente pelos estrógenos, que desempenham função crítica para a

manutenção do feto e para a proteção materna (MASI et al., 1995). Uma investigação prévia, empregando o modelo de artrite por ACF, demonstrou que a administração de estradiol, mas não de progesterona, em doses que se aproximam dos níveis séricos necessários para a manutenção da gravidez, melhora a poliartrite causada por adjuvante na rata, e que a pseudogravidez, com ou sem decidualização uterina, não modifica a severidade da doença, sugerindo que o corpo lúteo e o tecido decidual não sejam responsáveis pelo efeito protetor observado durante a gravidez (BRANDELY et al., 1982). Informações mais recentes propõem que os estrógenos relacionados à gravidez (estradiol, estrona e estriol), provavelmente agindo através de receptores nucleares, possam influenciar a distribuição tissular e a função das células do sistema imunológico, a produção de citocinas, a diferenciação celular e a expressão de moléculas de adesão (HUIZINGA et al., 1999; JANSSON e HOLMDAHL, 1998), às quais, em conjunto, podem contribuir para os efeitos imunossupressivos decorrentes da gravidez e, assim sendo, alterar o curso temporal do processo inflamatório crônico durante a artrite por adjuvante na rata.

É plausível se supor que ambas as citocinas, IL-1 β e TNF α , produzidas em elevadas concentrações e de forma sustentada na AR, possam entrar na circulação e influenciar a função de sistemas distantes da articulação, como o sistema reprodutor, no qual a expressão e função de IL-1 β e TNF α e de seus receptores é criticamente regulada (RUTANEN, 1993; HUNT, 1993; SIMÓN e POLAN, 1994; TERRANOVA et al., 1995; WU, 1996). No presente estudo, a análise da celularidade do esfregaço vaginal de cada uma das ratas com artrite, sucessivamente

do 14^o ao 35^o dias após a indução da doença, revelou irregularidades caracterizadas pelo aumento na duração do ciclo estral, que foram revertidas pelo piroxicam, inibidor não-seletivo de COX, mas não pela pentoxifilina ou talidomida, inibidores da síntese de TNF α , ou pela indometacina, inibidora mais seletiva de COX-1. É interessante salientar que HIRAHARA et al. (1986), estudando a artrite induzida por colágeno em camundongos, observaram alterações semelhantes no ciclo estral e uma baixa resposta ovariana à injeção de gonadotropinas, com menor taxa de maturação folicular e ovulação, em comparação aos animais normais. O trabalho de HIRAHARA et al. (1986) corrobora também com a observação do presente estudo em que a análise histológica revelou uma redução dos folículos nos ovários das ratas com artrite, em comparação aos animais normais. É também importante considerar que o piroxicam, um potente inibidor da COX de reconhecida eficácia na AR em humanos e animais (ENGELHARDT et al., 1995; NOBLE e BALFLOR, 1996), não tem demonstrado efeitos adversos na reprodução, fertilidade e no desenvolvimento pós-natal de coelhos e ratos (PERRAUD et al., 1984), mas um estudo recente sugere que esta droga pode inibir preferencialmente a COX-2 nos tecidos reprodutivos femininos e seu uso continuado pode promover infertilidade (CALMELS et al., 1999). Observou-se também nesta investigação que o perfil sérico de IL-1 β , mas não TNF α , encontra-se significativamente mais elevado no estro que no diestro em ratas normais. Consistente com estes resultados, KOL et al. (1999) descreveram que IL-1 β e seu receptor tipo I encontram-se elevados no ovário (granulosa, teca interna e

oócito) no período pré-ovulatório, com pico durante a ovulação. O ciclo estral, entretanto, parece não influenciar os níveis basais de RNAm para o TNF α no ovário em camundongos (TERRANOVA et al., 1995). Pesquisadores do mesmo grupo demonstraram recentemente que a inibição do processo ovulatório pela indometacina e possivelmente por outras DAINES, se deve, pelo menos em parte, a um bloqueio da produção de prostaglandinas mediado pela IL-1 β intraovariana (ANDO et al., 1999). É importante considerar que variações cíclicas na expressão de citocinas e seus receptores, e sua regulação pelos esteróides sexuais, também já foram observadas durante o ciclo reprodutivo normal da mulher e de outras espécies animais, bem como no câncer ginecológico (MALIK e EPENETOS, 1992; HUNT, 1993). Recentemente, ROBY et al. (1999) descreveram que camundongos deficientes do receptor de TNF tipo I apresentam anormalidades do ciclo estral, com prolongamento da fase de diestro em relação ao estro, bem como significativa redução no tamanho da ninhada. Possivelmente, o desequilíbrio crônico na homeostase de IL-1 β e TNF promovido pelo grande aumento de suas concentrações sistêmicas, que inclusive antecede a manifestação sintomatológica da artrite, como observado neste e em outros estudos (MASI et al., 1999), possa prejudicar a função reprodutiva em espécies susceptíveis, por interferência em diferentes níveis do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.

Observou-se que a maior parte das ratas nas quais a artropatia já se encontrava estabelecida (10-15^o dia após injeção de ACF), mesmo apresentando irregularidade de ciclo estral, foram capazes de se acasalar com machos férteis,

indicando que os esteróides ovarianos produzidos durante o período pré-ovulatório foram capazes de exercer seus efeitos periféricos, como visto neste estudo pela microscopia da mucosa vaginal, e centrais, pela manutenção da libido nestes animais. Entretanto, é também razoável se supor que, em virtude dos níveis cronicamente elevados de citocinas circulantes, o sistema hipotálamo-hipofisário dos animais com artrite por ACF não esteja respondendo plenamente aos estrógenos periféricos, e, em decorrência disso, ocorra diminuição da taxa de ovulação pela liberação insuficiente de LH. Em concordância com esta hipótese, ESQUIFINO et al. (1999) publicaram que após a injeção de ACF ocorre aumento dos níveis séricos de ACTH e prolactina, que mantém seu padrão rítmico circadiano de secreção, mas os níveis de GH e LH reduzem-se e perde-se sua ritmicidade diária.

No presente estudo verificou-se também que as drogas inibidoras da produção de $\text{TNF}\alpha$, pentoxifilina (STRIETER et al., 1988), talidomida (SAMPAIO et al., 1991) e clorpromazina (GADINA et al., 1991) bloquearam significativamente a ovoimplantação quando administradas no início da gravidez (dias 1-3 de gestação). Estudos recentes revelam que o $\text{TNF}\alpha$ é sintetizado no endométrio, placenta e feto, em seres humanos e animais, sendo um importante fator para o desenvolvimento embrionário, principalmente no início da gravidez (ARGILES et al., 1998). O mesmo estudo sugere que as malformações fetais provocadas pela talidomida possam se dever a ações embriotóxicas mediadas pela inibição da síntese de $\text{TNF}\alpha$. Além disso, tem sido demonstrado que a pentoxifilina bloqueia a fertilização e o desenvolvimento de oócitos fertilizados em camundongos (TOURNAYE et al.,

1994). Em nosso estudo, o tratamento com clorpromazina, mas não com pentoxifilina e talidomida, afetou negativamente a ovoimplantação, quando administrada no período peri-implantação (dia 4-6 de gravidez). YANG et al. (1998) observaram intenso bloqueio da implantação (100% de inibição da fertilidade) após injeção de hidrocloreto de clorpromazina nos cornos uterinos de ratas grávidas, sem alteração da concentração sérica de estradiol e progesterona, sugerindo uma ação direta no útero. Outros mecanismos, além da inibição da síntese de $TNF\alpha$, podem também contribuir para o efeito antiimplantação destas drogas, tais como a redução na formação de radicais livres, diminuição da quimiotaxia de neutrófilos e inibição da síntese de prostaglandinas (GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ et al., 1989; ANAYA e ESPINOZA, 1995; MAKSYMOWYCH et al., 1995).

PSYCHOYOS (1966) e ENDERS e SCHLAFKE (1967) estão entre os primeiros a descrever que o sinal inicial para a implantação do embrião em roedores é um aumento da permeabilidade nos sítios onde ocorre a adesão do blastocisto à superfície luminal do endométrio, um efeito intensamente mediado pelas prostaglandinas nos locais de ovoimplantação (KENNEDY, 1980; HAMILTON e KENNEDY, 1994; PAKRASI, 1997). A esse fenômeno se segue a aderência local e invasão do epitélio uterino, através da membrana basal, pelas células do trofoblasto, e início da reação decidual (SCHLAFKE e ENDERS, 1975; PARR et al., 1987). Investigações subsequêntes confirmaram que as prostaglandinas E, F e I parecem desempenhar um papel essencial na implantação do blastocisto e no processo de decidualização de roedores (KENNEDY et al., 1999; LIM et al., 1999). Estudos

bloqueio da ovoimplantação (YUOSIF e THULESIUS, 1998). Por outro lado, a nabumetona, uma pró-droga que é metabolizada no fígado para produzir seu metabólito ativo, o ácido 6-metoxi-2-naftilacético, é relativamente menos seletiva para a COX-2 que o nimesulide. Possivelmente, as variações nas ações e seletividade desses inibidores possam comprometer de forma diferenciada a implantação do embrião e seu desenvolvimento em roedores.

Por outro lado, a indometacina, um inibidor mais seletivo para COX-1, é reconhecido há anos por inibir a ovoimplantação em roedores (LAU et al., 1973; LINDNER et al., 1980; GUPTA et al., 1981), um efeito que tem sido associado à inibição da geração de prostaglandinas no embrião e nos tecidos uterinos (ACKER et al., 1988). Contudo, na dose testada neste estudo (2 mg/kg, v.o., duas vezes ao dia), a indometacina não impediu a ovoimplantação. Nos estudos anteriores a indometacina foi utilizada por via intrauterina ou em altas doses, e, nestas situações, além da inibição da COX, esta droga pode promover outros efeitos que contribuem para impedir a ovoimplantação. É importante destacar que, no presente estudo, o tratamento das ratas com indometacina durante o período de início da gravidez (dia 1 a 7 de gestação), mesmo não tendo afetado adversamente a implantação do embrião, causou aumento significativo das reabsorções fetais. Ainda não é claro até que ponto a especificidade da inibição da COX seja responsável pelas ações da indometacina na fase que antecede a implantação do embrião. INSEL (1996), por exemplo, destaca que a indometacina é mais eficaz nos modelos experimentais de inflamação que nos ensaios de inibição enzimática, o que apóia a idéia de que sua

ação aintiinflamatória está também associada a outros mecanismos. Foi demonstrado, por exemplo, que a indometacina pode bloquear canais de cálcio (SAWDI et al., 1998), podendo afetar as características espaciais e temporais de vários estágios do desenvolvimento dos gametas e embriões (TESARIK, 1999). Além disso, recentemente foi descrito que a indometacina pode bloquear a ovulação em ovelhas por inibição da apoptose, um mecanismo dissociado do paradigma da inibição dos prostanóides (MURDOCH e LUND, 1999). Sabe-se também que roedores deficientes de COX-1 são férteis, mas apresentam diminuição da viabilidade da ninhada (DAVIS et al., 1999). Portanto, a intensa diminuição no tamanho da ninhada e perdas fetais observadas no 20^o dia de gravidez nas ratas tratadas com indometacina indica a possível interferência da droga com a organogênese, envolvendo provavelmente mecanismos dependentes e independentes de prostaglandinas.

Nenhuma evidência de parto prematuro ou lesão anatômica macroscópica fetal foi observada no 20^o dia de gravidez nos grupos de animais expostos a inibidores de COX durante o início da gravidez. Contudo, foi observado um retardo de crescimento nos fetos de ratas tratadas com os inibidores mais seletivos de COX-2. Este fato é consistente com achados de que a expressão gênica diferencial de COX-1 e COX-2 está envolvida na morfogênese normal dos órgãos fetais (KOMHOFF et al., 1997). O fato de que os pesos das placentas encontram-se inalterados nestes animais demonstra que a saúde materna não é comprometida com as doses de inibidores de COX usadas neste estudo. Considerando-se que os

inibidores mais seletivos, de COX-1 e COX-2, reduzem o peso fetal, sugere-se que a expressão e função de ambas as isoformas da COX sejam importantes durante a gravidez. Todavia, a segurança e a eficácia clínica dos inibidores mais seletivos de COX-1 e COX-2 para a população geral somente podem ser validadas após extensivos estudos. Os dados da presente investigação demonstram, contudo, que a exposição de ratas a inibidores de COX-2 durante o período inicial da gravidez afeta adversamente a função reprodutiva materna e o desenvolvimento fetal.

Em ratos com artrite por ACF encontra-se elevada expressão sinovial de COX-2 (SANO et al., 1992). Trabalhos documentam também que o RNAm e a própria enzima COX-2 são induzidos em outros modelos animais de inflamação, tais como a bolsa de ar em camundongos e o edema de pata induzido por carragenina em ratos; concomitantemente elevam-se os níveis de prostaglandina E_2 , 6-ceto-prostaglandina $F_{1\alpha}$ (metabólitos da Prostaglandina I_2) e de tromboxano (VANE, 1994; SEIBERT et al., 1994). Sabe-se também que estas lesões inflamatórias são inibidas pela dexametasona ou por bloqueadores seletivos de COX-2 (MASFERRER et al., 1994; MITCHELL et al., 1994). Além disso, a função da COX-2 na inflamação é evidenciada pela demonstração de sua expressão elevada no tecido sinovial durante a AR humana (CROFFORD et al., 1994; FRÖLICH, 1997). Estes e outros achados desencadearam um grande interesse nas companhias farmacêuticas para o desenvolvimento de inibidores seletivos de COX-2, possivelmente mais eficazes e seguros para o tratamento das doenças inflamatórias. Entretanto, a deleção do gene da COX-2 no camundongo produziu um resultado

surpreendente, pois este animal é susceptível a inflamação tanto quanto o camundongo normal (MORHAM et al., 1995; DINCHUK et al., 1995). Além disso, contraditoriamente, os camundongos deficientes de COX-1, também produzidos por ablação genética da enzima específica, não apresentam patologia gástrica em resposta à indometacina ou apresentam menor área com ulceração na superfície gástrica e têm sobrevida normal, além de apresentarem reduzida agregação plaquetária e menor resposta à inflamação na orelha induzida pelo ácido araquidônico (LANGENBACH et al., 1995; WU, 1996). Estudos atuais demonstram também que as drogas antiinflamatórias tradicionais podem apresentar novas ações, tais como inibição da angiogênese por ação direta nas células endoteliais, provavelmente por inibição da atividade proteína quinase ativada por mitógeno (MAP quinase), ou de sua translocação nuclear, por mecanismos dependentes e independentes de prostaglandinas (JONES et al., 1999), que podem ter efeito benéfico na AR humana (WALSH, 1998).

No presente trabalho tanto a pentoxifilina, inibidora de PDE4 (ANAYA e ESPINOZA, 1995), quanto a nabumetona, uma droga antiinflamatória mais seletiva para COX-2, apresentaram efeitos igualmente potentes na redução do aumento máximo da lesão artrítica, como evidenciado pela medida do volume da pata e análise histológica. O efeito inibitório da pentoxifilina na lesão articular é esperado em vista de suas reconhecidas ações farmacológicas, que incluem a diminuição da aderência de leucócitos polimorfonucleares, da fagocitose e da atividade oxidativa promovida pelo $TNF\alpha$, bem como indução da citocina antiinflamatória IL-10

(ANAYA e ESPINOZA, 1995; BESSLER et al., 1986). Ao contrário do tratamento com pentoxifilina, a nabumetona não reduziu os níveis séricos de $\text{TNF}\alpha$ nas ratas com artrite e sua ação envolve provavelmente outro mecanismo. A capacidade do $\text{TNF}\alpha$ em induzir a produção de metabólitos do ácido araquidônico como a PGE_2 e PGI_2 tem sido considerada como um mecanismo efetor importante na função desta citocina na patogênese das doenças inflamatórias. Entretanto, há muitas informações indicando que os inibidores de COX-2 não reduzem os níveis circulantes de $\text{TNF}\alpha$, mas podem prevenir a progressão da artrite, que se correlaciona com a redução dos níveis dos produtos da COX (CORAN et al., 1992; JOHNSON e VON BORREL, 1994). Num estudo anterior, foi descrito que certas DAINES como o ibuprofeno, melhoram os sintomas e sinais da artrite induzida por adjuvante em ratos, mas não reduzem os níveis de $\text{TNF}\alpha$ na articulação dos animais (SMITH-OLIVER et al., 1993).

As DAINES tais como a aspirina, indometacina e o ibuprofeno estão entre os fármacos mais amplamente prescritos na terapia da dor, das doenças cardiovasculares e da AR e, mais recentemente, na prevenção do câncer de cólon e da doença de Alzheimer (MITCHELL e WARNER, 1999). Além disso, novas drogas com diferentes mecanismos de ação também têm sido investigadas na terapêutica da AR, trazendo benefícios clínicos em graus variados, destacando-se os antagonistas do folato e das purinas, agentes alquilantes e antipirimidinas, além dos anticorpos monoclonais quiméricos (camundongo/humano) contra o TNF e os

antagonistas do receptor de IL-1 recombinante humana (FYE, 1999). Entretanto, nenhuma droga isoladamente é universalmente eficaz na terapia da AR. Assim sendo, o uso de combinações de drogas no tratamento da doença é plausível. Para verificar a possível interrelação entre TNF e COX na artrite induzida por ACF, foi realizado durante esta investigação o tratamento dos animais com pentoxifilina associada à nabumetona, no intuito de inibir simultaneamente a PDE4 e COX em ratas com artrite. Os resultados obtidos não apresentaram nenhuma diferença significativa em relação a seus efeitos independentes no aumento do volume da pata, mas demonstraram um certo grau de redução das lesões histológicas da artrite, sugerindo que uma terapia combinada desta natureza possa ser benéfica na preservação da integridade estrutural das articulações. Os dados do presente trabalho indicam também que nos animais com artrite, os níveis séricos de citocinas não se correlacionam acuradamente com o grau de supressão da lesão das articulações. Reforçando esta hipótese, NOWAK et al. (1999) observaram recentemente não haver associação entre a melhora do estado clínico e as variações sangüíneas de citocinas, quando analisadas num período de 6 meses em pacientes com AR. Entretanto, inibidores de COX e PDE4 ou sua associação podem ter um potencial terapêutico no tratamento da AR.

No presente trabalho foi demonstrado que ratas com artrite por ACF, acasaladas com machos férteis no período de maior desenvolvimento da patologia, apresentam uma redução significativa do número de implantações fetais. Um estudo anterior revelou que camundongos com artrite por colágeno acasalados após o início

da doença não produziram filhotes (HIRAHARA et al., 1986). O mesmo trabalho revela uma redução da maturação folicular e da taxa de ovulação em ratas com artrite, um fato que pode contribuir para diminuir o número de blastocistos disponíveis para a ovoimplantação. No presente estudo, a avaliação histológica do útero das ratas com artrite revelou a presença de grande infiltração uterina com predominância de eosinófilos e plasmócitos, indicando a ocorrência de um processo inflamatório crônico no útero, além de redução do crescimento dos folículos no ovário. Recentemente, ALTMAN et al. (1999) mostraram que citocinas regulatórias como o $TNF\alpha$ estimulam o epitélio endometrial a produzir e liberar RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*), uma quimiocina capaz de atrair e ativar eosinófilos e outros leucócitos. Em condições normais, os estrógenos estimulam a infiltração de eosinófilos no útero durante o ciclo estral e na cérvix no período do parto, mas a razão para esta migração preferencial ainda não está esclarecida. A baixa fecundidade das ratas com artrite grávidas evidenciada no presente trabalho pode ser explicada por uma possível resposta pró-inflamatória uterina na interface materno-fetal mediada pelas altas concentrações de citocinas séricas, promovendo retardo no desenvolvimento embrionário e intensificação na reabsorção fetal, um resultado consistente com um estudo recente de MOORMANN et al. (1999). Além disso, foi descrito que a injeção de IL-1 causa supressão da atividade sexual em ratas mas não em ratos, e, além disso, as ratas produzem mais PGE_2 no cérebro e menos corticosterona que os ratos (AVITSUR e YIRMIYA, 1999), tendo sido sugerido que este pode ser um mecanismo protetor, que reduz a

probabilidade de concepção durante a infecção, evitando a possível ocorrência de aborto, parto prematuro ou mesmo mortalidade materna. Em nosso estudo foi demonstrada uma grande redução no tamanho da ninhada nas ratas com artrite nas quais a doença foi induzida no início da gravidez, com diminuição significativa do peso ao nascer dos filhotes e mortalidade materna. Um fato semelhante ocorreu quando ratas com artrite engravidam com a doença já em desenvolvimento. Está também bem estabelecido em várias espécies que um balanço energético negativo pode comprometer a função reprodutiva (JUDD, 1998) e, assim sendo é possível que o baixo ganho de peso observado nas ratas com artrite também possa contribuir para redução da fertilidade. Estudos futuros são necessários para esclarecer melhor os mecanismos que medeiam a redução da fertilidade na rata com artrite.

Já está bem estabelecido que as citocinas são produzidas fisiologicamente pelas células do trofoblasto e células de Hofbauer na placenta e por muitas outras linhagens celulares em condições de estresse fisiológico (SOCOL et al., 1985). A expressão de IL-10 em animais de laboratório tem sido considerada um elemento chave para o desvio de citocinas do tipo Th1 para Th2, pois favorece a imunotolerância na gravidez (WEGMANN et al., 1993). De acordo com esta hipótese, as citocinas expressas pelas células Th2, tais como a IL-10, previnem a rejeição do feto por suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células T citotóxicas (MOORE et al., 1993) e macrófagos (FIORENTINO et al., 1991). Níveis elevados de $\text{TNF}\alpha$ na placenta e decídua, por sua vez, pode ocasionar aumento da produção de potentes moléculas vasoconstritoras tais como a endotelina

1, fator de crescimento derivado de plaquetas e tromboxanos pelo endotélio vascular (CONRAD e BENYO, 1997) ou diminuir a produção de compostos vasodilatadores tais como as prostaciclinas, dificultando, em ambos os casos, as trocas materno-fetais. Níveis elevados de IL-1 β também induzem a ativação endotelial, aumentando a expressão de moléculas de adesão que pode contribuir para a perda da função de troca da barreira endotelial pela adesão intensa de neutrófilos nos capilares placentários (RINEHART et al., 1999). Em ambos os casos, a placenta pode tornar-se cada vez mais hipóxica a medida que progride a gravidez, podendo retardar ou impedir o desenvolvimento fetal. Foi demonstrado também que as prostaglandinas têm papel crucial na mitogênese, diferenciação e apoptose e que a expressão exagerada da isoforma COX-2 também está relacionada com a diminuição da diferenciação celular e alteração da apoptose, como visto nos tumores do trato gastrointestinal (SMITH e DEWITT, 1996; LEVY, 1997; OSHIMA et al., 1996) e no trofoblasto exposto a grandes concentrações de citocinas pró-inflamatórias ou em condições de hipóxia, como na pré-eclampsia humana (JOHNSON et al., 1997), onde anormalidades da citodiferenciação podem causar retardo do crescimento fetal (NELSON et al., 1999). Concordante com estes trabalhos, nosso estudo demonstrou que o tratamento com inibidores mais seletivos da COX-1, indometacina, da COX-2, nabumetona ou da síntese de TNF α , pentoxifilina, em doses que promovem efeito antiinflamatório melhoram os sinais e sintomas da poliartrite por adjuvante, mas não reverteram a baixa fertilidade da ratas grávidas com artrite possivelmente por interferir com a produção e/ou função normal das prostaglandinas e citocinas na interface

placenta-decídua. Faz-se necessário a investigação de terapias alternativas capazes de melhorar a fertilidade durante a artrite.

OSTENSEN (1999) e MASI et al.(1999) comprovaram recentemente que a AR reincide durante o período pós-parto. O nível sanguíneo total de corticosterona encontra-se inalterado durante a gravidez na rata com artrite e, portanto, a supressão pós-parto deste hormônio não pode explicar esta remissão (BRANDELY et al., 1982). Na presente investigação foi demonstrado que o tratamento com o EPH resulta numa significativa supressão da resposta inflamatória no pico da reação artrítica na rata, no dia 21 após a injeção de ACF, com uma magnitude similar à indometacina, indicando um efeito antiinflamatório. O EPH, em dose similar àquela usada neste estudo, promoveu efeito antiinflamatório no teste do edema de pata induzido pela carragenina em ratos, possivelmente por um mecanismo de estabilização de membrana (BANERJEE et al., 1992; BANERJEE et al., 1994). Além disso, o EPH tem sido empregado clinicamente para o tratamento do vitiligo, uma doença pigmentar reconhecidamente de origem autoimune (SUITE e DUAMINA, 1991; PAL et al, 1995). Nossos resultados, entretanto, demonstram que interrupção do tratamento com o EPH após o 20^o dia que se segue à injeção de ACF, causa uma tendência a recidiva da reação inflamatória secundária, o que sugere um mecanismo contrarregulatório. A partir dessas observações, é plausível supor que o EPH contenha alguns fatores imunorregulatórios que podem exercer na função modulatória na resposta inflamatória. O fato de que o tratamento com

EPH suprime a artrite por adjuvante na rata e a tendência a recorrência da doença após a cessação do tratamento, sugerem amplamente esta possibilidade.

No que se refere aos efeitos no ganho de peso corporal na rata, o presente estudo revela que a perda de peso nas ratas com artrite precede o desenvolvimento máximo da reação inflamatória secundária (dia 21 após ACF). Este achado está de acordo com um estudo prévio que sugere que as alterações do ganho de peso corporal não se correlacionam bem com as manifestações clínicas da inflamação articular durante a artrite por adjuvante (ROUBENOFF et al., 1997). As alterações metabólicas durante a artrite induzida por adjuvante, que estão associadas à produção aumentada de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, parecem contribuir para uma grande redução na massa celular corporal (ROUBENOFF et al., 1994). Além disso, estas citocinas são reconhecidas por induzir caquexia e anorexia quando injetadas em animais experimentais (TRACEY et al., 1988; HELLERSTEIN et al., 1989; HILL et al., 1997). No presente estudo, as ratas com artrite tratadas com EPH durante o desenvolvimento máximo da lesão articular (dia 21 após ACF) demonstraram quase o mesmo perfil de ganho de peso que os animais normais mas, subsequentemente, atingiram valores significativamente maiores que aqueles das ratas normais, o que sugere que o EPH pode apresentar propriedade anabolizante. Esta resposta não foi observada nos animais tratados com indometacina, um reconhecido inibidor da síntese de prostaglandinas, quando administrada às ratas com artrite numa dose de comprovada eficácia anti-artrítica (IIDA e SAITO, 1999). De acordo com estes resultados há estudos que demonstram que a indometacina pode aumentar os níveis

séricos e articulares de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 e TNF durante a artrite por adjuvante, provavelmente através da inibição das prostaglandinas e conseqüente perda do controle da produção de citocinas dependente de AMPc (SACCO et al., 1998; WANG e CHEN, 1998; WANG et al., 1998). Em síntese, este estudo demonstra que a artrite por adjuvante afeta negativamente os processos reprodutivos na rata e sugere que a gravidez tem uma influência modulatória na artrite, envolvendo provavelmente fatores de origem placentária, cuja identidade permanece a ser estudada.

6. CONCLUSÕES

1. A indução de artrite por ACF prolonga o ciclo estral, reduz o número de implantações fetais e promove redução da fecundidade em ratas, além de aumentar a infiltração de células inflamatórias, principalmente eosinófilos e plasmócitos, no útero e reduzir os folículos ovarianos;
2. As drogas inibidoras da COX e da síntese de TNF interferem com a ovoimplantação e afetam a gravidez na rata normal;
3. O tratamento com drogas inibidoras da COX e da síntese de TNF, ou sua associação, tem efeito benéfico no desenvolvimento das lesões na artrite induzida por ACF na rata,
4. Indometacina, nabumetona e pentoxifilina, nas doses e via aqui empregadas, não revertem a baixa fecundidade da rata com artrite ;
5. A ocorrência de gravidez promove redução altamente significativa da artrite por ACF na rata;
6. O EPH melhora o ganho de peso e reduz a inflamação associados à artrite induzida por ACF na rata, indicando que os produtos derivados da gravidez podem ser uma alternativa atraente para a descoberta de novas drogas antiinflamatórias/imunomoduladoras úteis na terapia dos distúrbios inflamatórios e reprodutivos associados à artrite reumatóide.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKER, G., HECQUET, F., ETIENNE, A., BRAQUET, P., MENCIA-HUERTA, J.M. Role of platelet-activating factor (PAF) in the ovoimplantation in the rat: effect of the specific PAF-acether antagonist, BN 52021. **Prostaglandins**, v. 35, p. 233-241, 1988.
- AHMED, A. S., SMITH, K. S. The endometrium: prostaglandins and intercellular signalling at implantation. **Baillieres Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 6, p. 731-754, 1992.
- ALAAEDDINE, N., DI BATTISTA, J.A., PELLETIER, J.P., KIANSA, K., CLOUTIER, J.M., MARTEL-PELLETIER, J. Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced prostaglandin E2 production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: distinct targeting in the signaling pathways. **Arthritis Rheum.**, v. 42, p. 710-718, 1999.
- ALTMAN, G.B., GOWN, A.M., LUCHEL, D.L., BAKER, C. RANTES production by cultured primate endometrial epithelial cells. **Am. J. Reprod Immunol.**, v. 42, p. 168-174, 1999.
- AMINO, N., TADA, H., HIDAKA, Y. Postpartum autoimmune thyroid syndrome: a model of aggravation of autoimmune disease. **Thyroid**, v. 9, p. 705-713, 1999.
- ANAYA, J. M., ESPINOZA, L. R. Phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline: an antiinflammatory/immunomodulatory drug potentially useful in some rheumatic diseases. **J. Rheumatol.**, v.22, p. 595-599, 1995.
- ANDO, M., KOL, S., IRAHARA, M., SIROIS, J., ADASHI, E.Y. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) block the late, prostanoid-dependent/ceramide-independent component of ovarian IL-1 action: implications for the ovulatory process. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 157, p. 21-30, 1999.

- AREND, W. P. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. **J. Clin. Invest.**, v. 88, p. 1445-1451, 1991.
- AREND, W. P., DAYER, J.M. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.33, p.305-315, 1990.
- _____. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 38, p. 151-160, 1995.
- AREND, W. P., SMITH, M. F. Jr., JANSON, R. W., JOSLIN, F.G. IL-1 receptor antagonist and IL-1 beta production in human monocytes are regulated differently. **J. Immunol.**, v.147, p. 1530-1536, 1991.
- ARGILES, J. M., CARBO, N., LOPEZ-SORIANO, F. J. Was tumour necrosis factor-alpha responsible for the fetal malformations associated with thalidomide in the early 1960s? **Med. Hypotheses**, v. 50, p. 313-318, 1998.
- ARSLAN, A., ZINGG, H. H. Regulation of COX-2 gene expression in rat uterus in vivo and in vitro. **Prostaglandins**, v. 52, p. 463-481, 1996.
- AVITSUR, R., YIRMIYA, R. The immunobiology of sexual behavior: gender differences in the suppression of sexual activity during illness. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 64, p. 787-796, 1999.
- BADAWI, A. F., ARCHER, M. C. Effect of hormonal status on the expression of the cyclooxygenase 1 and 2 genes and prostaglandin synthesis in rat mammary glands. **Prostaglandins Other Lipid. Mediat.**, v. 56, p. 167-181, 1998.
- BANERJEE, K. K., BISHAYEE, A., CHATTERJEE, M. Anti-inflammatory effect of human placental extract: a biochemical mechanistic approach. **Riv. Eur. Sci. Med. Farmacol.**, v. 14, p. 361-366, 1992.
- _____. Role of human placental extract on succinic dehydrogenase activity in carrageenin-induced edema in rats in vivo and its effect on erythrocyte lysis, platelet aggregation and trypsin activity in vitro. **Indian J. Physiol. Pharmacol.**, v. 38, p. 121-124, 1994.

- BARTOCCI, A., POLLARD, J.W., STANLEY, E.R. Regulation of colony-stimulating factor 1 during pregnancy. **J. Exp. Med.**, v.164, p. 956-961, 1986.
- BAUMANN, H., GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunol. Today**, v. 15, p. 74-80, 1994.
- BELILOS, E., CARSONS, S. Rheumatologic disorders in women. **Med. Clin. North Am.**, v. 82, p. 77-101, 1998.
- BENDELE, A., MCABEE, T., SENNELLO, G., FRAZIER, J., CHLIPALA, E., MCCABE, D. Efficacy of sustained blood levels of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of arthritis: comparison of efficacy in animal models with human clinical data. **Arthritis Rheum.**, v. 42, p. 498-506, 1999.
- BESSLER, H., GILGAL, R., DJALDETTI, M., ZAHAVI, I. Effect of pentoxifylline on the phagocytic activity, cAMP levels, and superoxide anion production by monocytes and polymorphonuclear cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 40, p. 747-754, 1986.
- BEUTLER, B., CERAMI, A. The common mediator of shock, cachexia, and tumor necrosis. **Adv. Immunol.**, v. 42, p. 213-231, 1988.
- BEYAERT, R., FIERIS, W. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity: what we do understand and what we do not. **FEBS Lett.**, v. 340, p. 9-16, 1994.
- BIJLSMA, J. W. Can we use steroid hormones to immunomodulate rheumatic diseases? Rheumatoid arthritis as an example. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 876, p. 366-376, 1999.
- BIJLSMA, J.W., VAN DE PUTTE, L. B. Non-steroidal anti-inflammatory agents (NSAIDS) with lesser side effects by selective inhibition of cyclooxygenase-2. **Ned. Tijdschr. Geneesk.**, v. 142, p. 1762-1765, 1998.
- BILI, H., TARLATZIS, B. C., DANIILIDIS, M., FLEVA, A., BONTIS, J., TOURKANTONIS, A., MANTALENAKIS, S. Cytokines in the human ovary: presence in follicular fluid and correlation with leukotriene B4. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v.15, p. 93-98, 1998.
- LANCO, F. J., OCHS, R. L., SCHWARZ, H., LOTZ, M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. **Am. J. Pathol.**, v. 146, p. 75-85, 1995.

- BOERBOOM, D., SIROIS, J. Molecular characterization of equine prostaglandin G/H synthase-2 and regulation of its messenger ribonucleic acid in preovulatory follicles **Endocrinology**, v. 139, p. 1662-1670, 1998.
- BONTA, I. L., PARNHAM, M. J., VAN VLIET, L. Combination of theophylline and prostaglandin E1 as inhibitors of the adjuvant-induced arthritis syndrome of rats. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 37, p. 212-217, 1978.
- BRANDELY, M., DE GERY, A., RABAUD, M., NA, P., AMOR, B. Adjuvant arthritis in rat during pregnancy and lactation. **Biomed. Pharmacother.**, v. 36, p. 308-313, 1982.
- BRANNON, T. S., MACRITCHIE, A. N., JARAMILLO, M. A., SHERMAN, T. S., YUHANNA, I. S., MARGRAF, L.R., SHAUL, P. W. Ontogeny of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 gene expression in ovine lung. **Am. J. Physiol.**, v. 274, n. 1 pt 1, p. L66-L71, 1998.
- BRENNAN, F. M., FELDMANN, M. Cytokines in autoimmunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 4, p. 754-759, 1992.
- BRENNAN, P., SILMAN, A. Why the gender difference in susceptibility to rheumatoid arthritis? **Ann. Rheum. Dis.**, v. 54, p. 694-695, 1995.
- BRODT-EPPLEY, J., MYATT, L. Changes in expression of contractile FP and relaxatory EP2 receptors in pregnant rat myometrium during late gestation, at labor, and postpartum. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 878-883, 1998.
- BROOKS, P. M., DAY, R. O. Nonsteroidal antiinflammatory drugs--differences and similarities. **N. Engl. J. Med.**, v. 324, p. 1716-1725, 1991.
- BUCHAN, G., BARRETT, K., TURNER, M., CHANTRY, D., MAINI, R.N., FELDMANN, M. Interleukin-1 and tumour necrosis factor mRNA expression in rheumatoid arthritis: prolonged production of IL-1 alpha. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 73, p. 449-455, 1988.
- BUTLER, D. M., MALFAIT, A.M., MASON, L. J., WARDEN, P. J., KOLLIAS, G., MAINI, R. N., FELDMANN, M., BRENNAN, F. M. DBA/1 mice expressing the human TNF-alpha transgene develop a severe, erosive arthritis: characterization of the cytokine cascade and cellular composition. **J. Immunol.**, v. 159, p. 2867-2876, 1997.

- CALMELS, C., DUBOST, J. J., JASMIN-LEBRUN, C., SAUVEZIE, B. A new case of NSAID-induced infertility. **Rev. Rhum. Engl. Ed.**, v. 66, p. 167-168, 1999.
- CANNON, J. G., DINARELLO, C. A. Increased plasma interleukin-1 activity in women after ovulation. **Science**, v. 227, p. 1247-1249, 1985.
- CASTAGNETTA, L., CUTOLO, M., GRANATA, O.M., DI FALCO, M., BELLAVIA, V., CARRUBA, G. Endocrine end-points in rheumatoid arthritis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 876, p. 180-191, 1999.
- CERINIC, M. M., KONTTINEN, Y., GENERINI, S., CUTOLO, M. Neuropeptides and steroid hormones in arthritis. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 10, p. 220-235, 1998.
- CHAOUAT, G., CAYOL, V., MAIROVITZ, V., DUBANCHET, S. Localization of the Th2 cytokines IL-3, IL-4, IL-10 at the fetomaternal interface during human and murine pregnancy and lack of requirement for Fas/Fas ligand interaction for a successful allogeneic pregnancy. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 42, p. 1-13, 1999.
- CHARPIGNY, G., REINAUD, P., TAMBY, J. P., CRÉMINON, C., MARTAL, J., MACLOUF, J., GUILLOMOT, M. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in ovine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. **Endocrinology**, v. 138, p. 2163-2171, 1997.
- CHEN, H. L., MARCINKIEWICZ, J. L., SANCHO-TELLO, M., HUNT, J. S., TERRANOVA, P. F. Tumor necrosis factor-alpha gene expression in mouse oocytes and follicular cells. **Biol. Reprod.**, v. 48, p. 707-714, 1993.
- CHIKANZA, I. C., POWNALL, R., PANAYI, G. S. Immunoendocrine interactions in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: initiating and perpetuating factors? **Br. J. Rheumatol.**, v. 29, suppl. 2, p. 22, 1990.
- CHOWDREY, H. S., LIGHTMAN, S. L. Interaction between the neuroendocrine system and arthritis. **Br. J. Rheumatol.**, v. 32, p. 441-444, 1993.
- CLANCY, R. M., AMIN, A. R., ABRAMSON, S. B. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. **Arthritis Rheum.**, v. 41, p. 1141-1151, 1998.

- COHEN, P. E., NISHIMURA, K., ZHU, L., POLLARD, J. W. Macrophages: important accessory cells for reproductive function. **J. Leukoc. Biol.**, v. 66, p. 765-772, 1999.
- CONRAD, K. P., BENYO, D. F. Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 37, p. 240-249, 1997.
- COOKE, T. D., HURD, E. R., JASIN, H. E., BIENENSTOCK, J., ZIFF, M. Identification of immunoglobulins and complement in rheumatoid articular collagenous tissues. **Arthritis Rheum.**, v.18, p. 541-551, 1975.
- 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 Rheum.**, v. 35, p. 1160-1169, 1992.
- COPE, A. P., LIBLAU, R. S., YANG, X. D., CONGIA, M., LAUDANNA, C., SCHREIBER, R. D., PROBERT, L., KOLLIAS, G., MCDEVITT, H. O. Chronic tumor necrosis factor alters T cell responses by attenuating T cell receptor signaling. **J. Exp. Med.**, v. 185, p. 1573-1584, 1997.
- COPE, A. P., LONDEI, M., CHU, N. R., COHEN, S. B., ELLIOTT, M. J., BRENNAN, F. M., MAINI, R. N., FELDMANN, M. Chronic exposure to tumor necrosis factor (TNF) in vitro impairs the activation of T cells through the T cell receptor/CD3 complex; reversal in vivo by anti-TNF antibodies in patients with rheumatoid arthritis. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 749-760, 1994.
- CORAN, A. G., DRONGOWSKI, R. A., PAIK, J. J., REMICK, D.G. Ibuprofen intervention in canine septic shock: reduction of pathophysiology without decreased cytokines. **J. Surg. Res.**, v. 53, p. 272-279, 1992.
- CRITCHLEY, H. O., JONES, R. L., LEA, R.G., DRUDY, T. A., KELLY, R. W., WILLIAMS, A. R., BAIRD, D. T. Role of inflammatory mediators in human endometrium during progesterone withdrawal and early pregnancy. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 84, p. 240-248, 1999.
- CROFFORD, L. J. COX-2 in synovial tissues. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 7, p. 406-408, 1999.

- CROFFORD, L. J., WILDER, R. L., RISTIMAKI, A. P., SANO, H., REMMERS, E. F., EPPS, H.R., HLA, T. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. **J. Clin. Invest.**, v. 93, p. 1095-1101, 1994.
- DALTON, D. K., PITTS-MEEK, S., KESHAV, S., FIGARI, I. S., BRADLEY, A., STEWART, T. A. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. **Science**, v. 259, p.1739-1742, 1993.
- DAVIS, B. J., LENNARD, D.E., LEE, C. A., TIANO, H.F., MORHAM, S.G., WETSEL, W. C., LANGENBACH, R. Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1beta. **Endocrinology**, v. 140, p. 2685-2695, 1999.
- DAYER, J. M., BEUTLER, B., CERAMI, A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. **J. Exp. Med.**, v. 162, p. 2163-2168, 1985.
- DAYER, J. M., FENNER, H. The role of cytokines and their inhibitors in arthritis. **Baillière's Clin. Rheumatol.**, v. 6, p. 485-516, 1992.
- DAYER, J. M., ROCHEMONTEIX, B., De BURRUS, B., DEMECZUK, S., DINARELLO, C. A. Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. **J. Clin. Invest.**, v. 77, p. 645-648, 1986.
- DE LOS SANTOS, M.J., ANDERSON, D.J., RACOWSKY, C., SIMON, C., HILL, J.A. Expression of interleukin-1 system genes in human gametes. **Biol. Reprod.**, v.59, p.1419-1424, 1998.
- DEBETS, R., SVELKOU F. J. Cytokine antagonists and their potential therapeutic use. **Immunol. Today**, v. 15, p. 455-458, 1994.
- DELEURAN, B. W., CHU, C. Q., FIELD, M., BRENNAN, F. M., KATSIKIS, P., FELDMANN, M., MAINI, R. N. Localization of interleukin-1 alpha, type 1 interleukin-1 receptor and interleukin-1 receptor antagonist in the synovial membrane and cartilage/pannus junction in rheumatoid arthritis. **Br. J. Rheumatol.**, v. 31, p. 801-809, 1992.

- DESAY, R. G., CREGER, W. P. Maternofetal passagem of leukocyte and platelets in man. **Blood**, v. 21, p. 665-673, 1963.
- DINARELLO, C. A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. **Blood**, v. 77, p. 1627-1652, 1991.
- DINARELLO, C. A., THOMPSON, R. C. Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. **Immunol. Today**, v. 12, p. 404-410, 1991.
- DINCHUK, J. E., CAR, B. D., FOCHT, R. J., JOHNSTON, J. J., JAFFEE, B. D., COVINGTON, M. B., CONTEL, N. R., ENG, V. M., COLLINS, R. J., CZERNIAK, P. M., GORRY, A. S., TRZASKOS, J. M. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. **Nature**, v. 378, p. 406-409, 1995.
- DOHERTY, A. M. Phosphodiesterase 4 inhibitors as novel anti-inflammatory agents. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 3, p. 466-473, 1999.
- DOI, T. S., MARINO, M. W., TAKAHASHI, T., YOSHIDA, T., SAKAKURA, T., OLD, L. J., OBATA, Y. Absence of tumor necrosis factor rescues RelA-deficient mice from embryonic lethality. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 2994-2999, 1999.
- DUBOIS, C. M., RUSCETTI, F. W., PALASZYNSKI, E. W., FALK, L. A., OPPENHEIM, J. J., KELLER, J. R. Transforming growth factor beta is a potent inhibitor of interleukin 1 (IL-1) receptor expression: proposed mechanism of inhibition of IL-1 action. **J. Exp. Med.**, v. 172, p. 737-744, 1990.
- DUFF, G. W. Cytokines and anti-cytokines. **Br. J. Rheumatol.**, v. 32, Suppl. 1, p. 15-20, 1993.
- EADES, D. K., CORNELIUS, P., PEKALA, P. H. Characterization of the tumour necrosis factor receptor in human placenta. **Placenta**, v. 9, p. 247-251, 1988.
- ELICES, M. J., TSAI, V., STRAHL, D., GOEL, A. S., TOLLEFSON, V., ARRHENIUS, T., WAYNER, E. A., GAETA, F. C., FIKES, J. D., FIRESTEIN, G. S. Expression and functional significance of alternatively

- spliced CS1 fibronectin in rheumatoid arthritis microvasculature. **J. Clin. Invest.**, v. 93, p. 405-416, 1994.
- ELLIOTT, M. J., MAINI, R. N., FELDMANN, M., LONG-FOX, A., CHARLES, P., KATSIKIS, P., BRENNAN, F. M., WALKER, J., BIJL, H., GHRAYEB, J., et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. **Arthritis Rheum.**, v. 36, p. 1681-1690, 1993.
- ENDERS, A. C., SCHLAFKE, S. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat **Am. J. Anat.**, v.120, p. 185-226, 1967.
- ENGELHARDT, G., HOMMA, D., SCHNITZLER, C. Meloxicam: a potent inhibitor of adjuvant arthritis in the Lewis rat. **Inflamm. Res.**, v. 44, p. 548-555, 1995.
- ESPEY, L. L. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammation reaction. **Biol. Reprod.**, v. 50, p. 233-238, 1994.
- ESQUIFINO, A. I., CASTRILLON, P., GARCIA-BONACHO, M., VARA, E., CARDINALI, D. P. Effect of melatonin treatment on 24-hour rhythms of serum ACTH, growth hormone, prolactin, luteinizing hormone and insulin in rats injected with Freund's adjuvant. **J. Pineal Res.**, v. 27, p. 15-23, 1999.
- FANG, L., CHATTERJEE, S., DONG, Y. L., GANGULA, P. R., YALLAMPALLI, C. Immunohistochemical localization of constitutive and inducible cyclo-oxygenases in rat uterus during the oestrous cycle and pregnancy. **Histochem. J.**, v. 30, p. 383-391, 1998.
- FELDMANN, M. What is the mechanism of action of anti-tumour necrosis factor-alpha antibody in rheumatoid arthritis? **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 111, p. 362-365, 1996.
- FENNER, H. Strategies for the clinical development of anti-cytokines. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v. 11, Suppl. 8, p. S183-S184, 1993.
- FERNÁNDEZ-BOTRAN, R. Soluble cytokine receptors: Their role in immunoregulation. **FASEB J.**, v. 5, p. 2567-2574, 1992.

- FINN, C. A. Menstruation: a nonadaptive consequence of uterine evolution. **Q. Rev. Biol.**, v. 73, p. 163-173, 1998.
- FIORENTINO, D. F., ZLOTNIK, A., MOSMANN, T. R., HOWARD, M., O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J. Immunol.**, v. 147, p. 3815-3822, 1991.
- FIRESTEIN, G. S., ZVAIFLER, N. J. Peripheral blood and synovial fluid monocyte activation in inflammatory arthritis II. Low levels of synovial fluid and synovial tissue interferon suggests that gamma interferon is not the primary macrophage activating factor. **Arthritis Rheum.**, v.30, p.864-871, 1987.
- FIRESTEIN, G. S., ALVARO-GRACIA, J. M., MAKI, R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. **J. Immunol.**, v. 144, p. 3347-3353, 1990.
- FIRESTEIN, G.S., YEO, M., ZVAIFLER, N.J. Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. **J. Clin. Invest.**, v.96, p.1631-1638, 1995.
- FIRESTEIN, G. S., BERGER, A. E., TRACEY, D. E., CHOSAY, J.G., CHAPMAN, D. L., PAINE, M. M., YU, C., ZVAIFLER, N. J. IL-1 receptor antagonist protein production and gene expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. **J. Immunol.**, v. 149, p. 1054-1062, 1992.
- FIRESTEIN, G. S., NGUYEN, K., AUPPERLE, K. R., YEO, M., BOYLE, D. L., ZVAIFLER, N. J. Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium. **Am. J. Pathol.**, v. 149, p. 2143-2151, 1996.
- FIRESTEIN, G. S., XU, W. D., TOWNSEND, K., BROIDE, D., ALVARO-GRACIA, J. N., GLASEBROOK, A., ZVAIFLER, N. J. Cytokines in chronic inflammatory arthritis I: Failure to detect T cell lymphokines (interleukin 2 and interleukin 3) and the presence of macrophage colony stimulating factor (CSF-1) and a novel mast cell growth factor in rheumatoid arthritis. **J. Exp. Med.**, v. 168, p. 1573-1586, 1988.
- FONAGER, K., SORENSEN, H. T., OLSEN, J., DAHLERUP, J. F., RASMUSSEN, S. N. Pregnancy outcome for women with Crohn's disease: a

- follow-up study based on linkage between national registries. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 93, p. 2426-2430, 1998.
- FORCELLEDO, M. L., CROXATTO, H. B. Ovum transport in cyclic rats rendered hypo-oestrogenic by treatment with 4-hydroxy-4-androstene-3,17-dione. **J. Reprod. Fertil.**, v. 76, p. 325-330, 1986.
- FORCELLEDO, M. L., DE LA CERDA, M.L., CROXATTO, H. B. Effectiveness of different estrogen pulses in plasma for accelerating ovum transport and their relation to estradiol levels in the rat oviduct. **Endocrinology**, v. 119, p. 1189-1194, 1986.
- FRÖLICH, J. C. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 18, p. 30-4, 1997.
- FUKUOKA, M., MORI, T., TAIL, S., YASUDA, K. Interleukin-1 inhibits luteinization of porcine granulosa cells in culture. **Endocrinology**, v.122, p. 367-369, 1988.
- FUKUTAKE, M., NAKATSUGI, S., ISOI, T., TAKAHASHI, M., OHTA, T., MAMIYA, S., TANIGUCHI, Y., SATO, H., FUKUDA, K., SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K. Suppressive effects of nimesulide, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 1939-1942, 1998.
- FYE, K.H. New treatments for rheumatoid arthritis. Available and upcoming slow-acting antirheumatic drugs. **Postgrad. Med.**, v.106, p. 82-85, 1999.
- GADINA, M., BERTINI, R., MENGOZZI, M., ZANDALASINI, M., MANTOVANI, A., GHEZZI, P. Protective effect of chlorpromazine on endotoxin toxicity and TNF production in glucocorticoid-sensitive and glucocorticoid-resistant models of endotoxic shock. **J. Exp. Med.**, v. 173, p. 1305-1310, 1991.
- GIAGIOTI, S., SCAVONE, C., BEVILACQUA, E. Participation of the mouse implanting trophoblast in nitric oxide production during pregnancy. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 260-268, 2000.

- GHEZZI, P., GARATTINI, S., MENNINI, T., BERTINI, R., DELGADO HERNANDEZ, R., BENIGNI, F., SACCO, S., SKORUPSKA, M., MENGOZZI, M., LATINI, R., KUROSAKI, M., LOMBET, A., FRADIN, A., BONNET, J., ROLLAND, Y., BRION, J. D. Mechanism of inhibition of tumor necrosis factor production by chlorpromazine and its derivatives in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 317, p. 369-376, 1996.
- GOSDEN, R., SPEARS, N. Programmed cell death in the reproductive system. **Br. Med. Bull.**, v. 52, p. 644-661, 1997.
- GOTTSCHALL, P. E., UEHARA, A., HOFFMANN, S. T., ARIMURA, A. Interleukin-1 inhibits follicle stimulating hormone-induced differentiation in rat granulosa cells in vitro. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 149, p. 502-509, 1987.
- GRACIE, J. A., FORSEY, R. J., CHAN, W. L., GILMOUR, A., LEUNG, B. P., GREER, M. R., KENNEDY, K., CARTER, R., WEI, X. Q., XU, D., FIELD, M., FOULIS, A., LIEW, F. Y., MCINNES, I. B. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. **J. Clin. Invest.**, v. 104, p. 1393-1401, 1999.
- GRAVANIS, A., STOURNARAS, C., MARGIORIS, A.N. Paracrinology of endometrial neuropeptides: corticotropin-releasing hormone and opioids. **Semin. Reprod. Endocrinol.**, v.17, p. 29-38, 1999.
- GREENBLATT, M. S., BENNETT, W. P., HOLLSTEIN, M., HARRIS, C. C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Res.**, v. 54, p. 4855-4878, 1994.
- GREGERSEN, P. K., SILVER, J., WINCHESTER, R. J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 30, p.1205-1213, 1987.
- GUPTA, U., MALHOTRA, N., VARMA, S. K., CHAUDHURY, R. R. Effect of intrauterine administration of antiprostaglandin drugs on implantation in the rat. **Contraception**, v. 24, p. 283-288, 1981.

- GUTIERREZ-RODRIGUEZ, O., STARUSTA-BACAL, P., GUTIERREZ-MONTES, O. Treatment of refractory rheumatoid arthritis--the thalidomide experience. **J. Rheumatol.**, v. 16, p. 158-163, 1989.
- HALES, D. B., DIEMER, T., HALES, K. H. Role of cytokines in testicular function. **Endocrine**, v. 10, p. 201-217, 1999.
- HAMILTON, G. S., KENNEDY, T. G. Uterine vascular changes after unilateral intrauterine infusion of indomethacin and prostaglandin E2 to rats sensitized for decidual cell reaction **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 72, p. 711-715, 1994.
- HATTHACHOTE, P., GILLESPIE, J. I. Complex interactions between sex steroids and cytokines in the human pregnant myometrium: evidence for an autocrine signaling system at term. **Endocrinology**, v. 140, p. 2533-2540, 1999.
- HELLERSTEIN, M. K., MEYDANI, S. N., MEYDANI, M., WU, K., DINARELLO, C. A. Interleukin-1-induced anorexia in the rat: influence of prostaglandins. **J. Clin. Invest.**, v. 84, p. 228-235, 1989.
- HENCH, P. S. The ameliorating effect of pregnancy on chronic atrophic (infectious rheumatoid) arthritis, fibrositis, and intermittent hydrarthrosis. **Mayo Clin. Proc.**, v. 13, p. 161-167, 1938.
- HENNESSY, A., PILMORE, H. L., SIMMONS, L. A., PAINTER, D. M. A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. **J. Immunol.**, v. 163, p. 3491-3495, 1999.
- HERSCHMAN, H. R. Regulation of prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2. **Cancer Metast. Rev.**, v. 13, p. 241-256, 1994.
- HILL, A. G., SIEGEL, J., ROUNDS, J., WILMORE, D. W. Metabolic responses to interleukin-1 – Centrally and Peripherally mediated. **Ann. Surg.**, v. 225, p. 246-251, 1997.
- HIRAHARA, F., WOOLEY, P. H., LUTHRA, H. S., COULAM, C. B., GRIFFITHS, M. M., DAVID, C. S. Collagen-induced arthritis and pregnancy in mice: the effects of pregnancy on collagen-induced arthritis and the high

- incidence of infertility in arthritic female mice. **Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.**, v. 11, p. 44-54, 1986.
- HISHINUMA, T., NAKAMURA, H., SAWAI, T., UZUKI, M., ITABASHI, Y., MIZUGAKI, M. Microdetermination of prostaglandin E2 in joint fluid in rheumatoid arthritis patients using gas chromatography/selected ion monitoring. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v.58, p.179-186, 1999.
- HOLLANDER, J. L., McCARTY, J. D., ASTORGA, C., CASTRO-MURILLO, E. Studies on the pathogenesis of rheumatoid joint inflammation. I. The "R.A. cell" and a working hypothesis. **Ann. Intern. Med.**, v. 62, p. 271-280, 1965.
- HUANG, S., HENDRIKS, W., ALTHAGE, A., HEMMI, S., BLUETHMANN, H., KAMIJO, R., VILCEK, J., ZINKERNAGEL, R. M., AGUET, M. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. **Science**, v. 259, p. 1742-1745, 1993.
- HUIZINGA, T. W., DIJKMANS, B. A., VAN DER VELDE, E. A., VAN DE POUW KRAAN, T. C., VERWEIJ, C. L., BREEDVELD, F. C. An open study of pentoxifylline and thalidomide as adjuvant therapy in the treatment of rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 55, p. 833-836, 1996.
- HUIZINGA, T. W., VAN DER LINDEN, M. W., DENEYS-LAPORTE, V., BREEDVELD, F. C. Interleukin-10 as an explanation for pregnancy-induced flare in systemic lupus erythematosus and remission in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 38, p. 496-498, 1999.
- HUMPHRIES, M. J., KOMORIYA, A., AKIYAMA, S. K., OLDEN, K., YAMADA, K. M. Identification of two distinct regions of the type III connecting segment of human plasma fibronectin that promote cell type-specific adhesion. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 6886-6892, 1987.
- HUNT, J.S. Expression and regulation of the tumour necrosis factor-alpha gene in the female reproductive tract. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 5, p. 141-153, 1993.
- _____. Immunologically relevant cells in the uterus. **Biol. Reprod.**, v.50, n. 3, p. 461-466, 1994.

- HUNT, J. S., CHEN, H. L., HU, X. L., POLLARD, J. W. Normal distribution of tumor necrosis factor-alpha messenger ribonucleic acid and protein in the uteri, placentas, and embryos of osteopetrotic (op/op) mice lacking colony-stimulating factor-1. **Biol. Reprod.**, v. 49, p. 441-452, 1993.
- HUNT, J. S., VASSMER, D., FERGUSON, T. A., MILLER, L. Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. **J. Immunol.**, v. 158, p. 4122-4128, 1997.
- HUSBY, G., WILLIAMS, R. C. Jr. Synovial localization of tumor necrosis factor in patients with rheumatoid arthritis. **J. Autoimmun.**, v.1, p. 363-371, 1988.
- IDA, M., SAITO, K. Failure of endotoxin-free superoxide dismutase to reduce some paw edemas and adjuvant arthritis in rats. **Inflamm. Res.**, v. 48, p. 63-66, 1999.
- NSEL, P. A. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: HARDMAN, A. G., GILMAN, A. G., LIMBIRD, J. G. **Goodman & Gilman's The Pharmacological basis of therapeutics**. 9th ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 617-657.
- SHII, O., YAMADA, H., OHYA, S., MORIUCHI, E., KASE, C., ICHIKAWA, Y., YAMASAKI, K. Remission induction after pentoxifylline treatment in a patient with rheumatoid arthritis. **Ryumachi**, v. 37, p. 810-815, 1997.
- AATTELA, M., KUUSELA, P., SAKSELA, E. Demonstration of tumor necrosis factor in human amniotic fluids and supernatants of placental and decidual tissues. **Lab. Invest.**, v. 58, p. 48-52, 1988.
- AIN, R., LIPSKY, P. E. Treatment of rheumatoid arthritis. **Med. Clin. North Am.**, v. 81, p. 57-84, 1997.
- ANSSON, L., HOLMDAHL, R. Estrogen-mediated immunosuppression in autoimmune diseases. **Inflamm. Res.**, v. 47, p. 290-301, 1998.
- ARA, L. J., LAVALLE, C., FRAGA, A., GOMEZ-SANCHEZ, C., SILVEIRA, L. H., MARTINEZ-OSUNA, P., GERMAIN, B. F., ESPINOZA, L. R.

- Prolactin, immunoregulation, and autoimmune diseases. **Semin. Arthritis Rheum.**, v. 20, p. 273-824, 1991.
- JOHNSON, R. D., SADOVSKY, Y., GRAHAM, C., ANTEBY, E.Y., POLAKOSKI, K. L., HUANG, X., NELSON, D. M. The expression and activity of prostaglandin H synthase-2 is enhanced in trophoblast from women with preeclampsia. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, p. 3059-3062, 1997.
- JOHNSON, R. W., VON BORELL, E. Lipopolysaccharide-induced sickness behavior in pigs is inhibited by pretreatment with indomethacin. **J. Anim. Sci.**, v. 72, p. 309-314, 1994.
- JONES, S. T., DENTON, J., HOLT, P. J., FREEMONT, A. J. Possible clearance of effete polymorphonuclear leucocytes from synovial fluid by cytophagocytic mononuclear cells: implications for pathogenesis and chronicity in inflammatory arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 52, p. 121-126, 1993.
- JONES, M. K., WANG, H., PESKAR, B. M., LEVIN, E., ITANI, R. M., SARFEH, I. J., TARNAWSKI, A. S. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. **Nat. Med.**, v. 5, p. 1418-1423, 1999.
- JUDD, S.J. Disturbance of the reproductive axis induced by negative energy balance. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 10, p. 65-72, 1998.
- KAPLAN-KRAICER, R., KOSTOVETSKY, I., BARDIN, C. W., SHALGI, R. Tamoxifen and RU39411 synergize with mifepristone to produce preimplantation pregnancy loss by increasing embryo transport (rat). **Contraception**, v. 53, p. 367-373, 1996.
- KARLSON, E. W., LEE, I. M., COOK, N. R., MANSON, J. E., BURING, J. E., HENNEKENS, C. H. A retrospective cohort study of cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals. **Arthritis Rheum.**, v. 42, p. 910-917, 1999.
- ΛATSIKIS, P. D., CHU, C. Q., BRENNAN, F. M., MAINI, R. N., FELDMANN, M. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 1517-1527, 1994.

- KEELAN, J. A., MARVIN, K. W., SATO, T. A., COLEMAN, M., MCCOWAN, L. M., MITCHELL, M. D. Cytokine abundance in placental tissues: evidence of inflammatory activation in gestational membranes with term and preterm parturition. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 181, p. 1530-1536, 1999.
- KEFFER, J., PROBERT, L., CAZLARIS, H., GEORGOPOULOS, S., KASLARIS, E., KIOUSSIS, D., KOLLIAS, G. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. **EMBO J.**, v. 10, p. 4025-4031, 1991.
- KENNEDY, T. G. Prostaglandins and the endometrial vascular permeability changes preceding blastocyst implantation and decidualization **Prog. Reprod. Biol.**, v. 7, p. 234-243, 1980.
- KENNEDY, C. R., ZHANG, Y., BRANDON, S., GUAN, Y., COFFEE, K., FUNK, C. D., MAGNUSON, M. A., OATES, J. A., BREYER, M. D., BREYER, R. M. Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. **Nature Med.**, v. 5, p. 217-220, 1999.
- KILLAR, L., WHITE, J., BLACK, R., PESCHON, J. Adamalysins. A family of metzincins including TNF-alpha converting enzyme (TACE). **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 878, p. 442-452, 1999.
- KIM, W., MIN, S., CHO, M., YOUN, J., MIN, J., LEE, S., PARK, S., CHO, C., KIM, H. The role of IL-12 in inflammatory activity of patients with rheumatoid arthritis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 119, p. 175-181, 2000.
- KIMURA, T., OGITA, K., KUSUI, C., OHASHI, K., AZUMA, C., MURATA, Y. What knockout mice can tell us about parturition. **Rev. Reprod.**, v. 4, p. 73-80, 1999.
- KINNE, R. W., PALOMBO-KINNE, E., EMMRICH, F. Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 54, p. 501-504, 1995.
- KLARESKOG, L., MCDEVITT, H. Rheumatoid arthritis and its animal models: the role of TNF-alpha and the possible absence of specific immune reactions. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 11, p. 657-662, 1999.

- KNISS, D. A., IAMS, J. D. Regulation of parturition update. Endocrine and paracrine effectors of term and preterm labor. **Clin. Perinatol.**, v. 25, p. 819-836, 1998.
- KOL, S., RUUTIAINEN-ALTMAN, K., SCHERZER, W. J., BEN-SHLOMO, I., ANDO, M., ROHAN, R. M., ADASHI, E. Y. The rat intraovarian interleukin (IL)-1 system: cellular localization, cyclic variation and hormonal regulation of IL-1 β and of the type I and type II IL-1 receptors. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 49, p. 115-128, 1999.
- KOMHOFF, M., GRONE, H. J., KLEIN, T., SEYBERTH, H. W., NUSING, R. M. Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: Implication for renal function. **Amer. J. Physiol.**, v. 41, p. F460-F468, 1997.
- KOTAKE, S., UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N., MATSUZAKI, K., ITOH, K., ISHIYAMA, S., SAITO, S., INOUE, K., KAMATANI, N., GILLESPIE, M. T., MARTIN, T. J., SUDA, T. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. **J. Clin. Invest.**, v. 103, p. 1345-1352, 1999.
- KRANE, S. M. Heberden Oration 1980: aspects of the cell biology of the rheumatoid synovial lesion. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 40, p. 433-448, 1981.
- LAIRD, S.M., TUCKERMAN, E., LI, T.C., BOLTON, A.E. Stimulation of human endometrial epithelial cell interleukin 6 production by interleukin 1 and placental protein 14. **Hum. Reprod.**, v.9, p. 1339-1343, 1994.
- LANGENBACH, R., LOFTIN, C., LEE, C., TIANO, H. Cyclooxygenase knockout mice - Models for elucidating isoform-specific functions. **Biochem. Pharmacol.**, v. 58, p. 1237-1246, 1999.
- LANGENBACH, R., MORHAM, S. G., TIANO, H. F., LOFTIN, C. D., GHANAYEM, B. I., CHULADA, P. C., MAHLER, J. F., LEE, C. A., GOULDING, E. H., KLUCKMAN, K. D., et al Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. **Cell**, v. 83, p. 483-492, 1995.
- LARRICK, J. W. Native interleukin 1 inhibitors. **Immunol. Today.**, v. 10, p. 61-66, 1989.

- LAU, I. F., SAKSENA, S. K., CHANG, M. C. Pregnancy blockade by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis: its reversal by prostaglandins and progesterone in mice. **Prostaglandins**, v. 4, p. 795-803, 1973.
- LENZ, W. Kindliche missbildungen nach medikament-einnahme wahrend der graviditat? **Dtsch. Med. Wochenschr.**, v. 86, p. 2555-2556, 1961.
- _____. Thalidomide and congenital abnormalities. **Lancet**, v. 1, p. 1219, 1962.
- _____. A short history of thalidomide embryopathy. **Teratology**, v. 38, p. 203-215, 1988.
- LEVI, G. N. Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. **FASEB J.**, v. 11, p. 234-247, 1997.
- LEVI, P. E. Chronic toxicity: carcinogenesis, mutagenesis, teratogenesis. In: HODGSON, E., LEVI, P. E. **A Textbook of modern toxicology**. 2nd. ed. Stamford, Conn.: Appleton & Lange, 1997. p.171-198.
- LI, Z.W., CHU, W., HU, Y., DELHASE, M., DEERINCK, T., ELLISMAN, M., JOHNSON, R., KARIN, M. The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. **J. Exp. Med.**, v. 189, p. 1839-1845, 1999.
- LICCARDI, G., D'AMATO, M., D'AMATO, G. Asthma in pregnant patients: pathophysiology and management. **Monaldi Arch. Chest. Dis.**, v. 53, n. 2, p. 151-159, 1998.
- LIM, H., GUPTA, R. A., MA, W. G., PARIA, B. C., MOLLER, D. E., MORROW, J. D., DUBOIS, R. N., TRZASKOS, J. M., DEY, S. K. Cyclooxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPAR delta. **Genes Dev.**, v. 13, p. 1561-1574 1999.
- LIM, K. J., ODUKOYA, O. A., AJJAN, R. A., LI, T. C., WEETMAN, A. P., COOKE, I. D. The role of T-helper cytokines in human reproduction. **Fertil. Steril.**, v. 73, p. 136-142, 2000.

- LIM, H., PARIA, B. C., DAS, S. K., DINCHUK, J.E., LANGENBACH, R., TRZASKOS, J. M., DEY, S. K. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase-2-deficient mice. **Cell**, v. 91, p. 197-208, 1997.
- LINDNER, H. R., ZOR, U., KOHEN, F., BAUMINGER, S., AMSTERDAM, A., LAHAV, M., SALOMON, Y. Significance of prostaglandins in the regulation of cyclic events in the ovary and uterus. **Adv. Prostag. Thrombox. Res.**, v. 8, p. 1371-1390, 1980.
- LOPATA, A. Blastocyst-endometrial interaction: an appraisal of some old and new ideas. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 2, p. 519-525, 1996.
- LUPIA, E., MONTRUCCHIO, G., BATTAGLIA, E., MODENA, V., CAMUSSI, G. Role of tumor necrosis factor-alpha and platelet-activating factor in neoangiogenesis induced by synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. **Eur. J. Immunol.** v. 26, p. 1690-1694, 1996.
- LYPSKY, P. E. Specific COX-2 inhibitors in arthritis, oncology, and beyond: where is the science headed? **J. Rheum.**, v. 26, suppl. 56, p. 25-30, 1999.
- MACCHIA, L., DI PAOLA, R., GUERRESE, M. C., CHICCHI, L. M., TURSI, A., CAIAFFA, M. F., HACGGSTROM, J. Z. Expression of prostaglandin endoperoxide H synthase 1 and 2 in human placenta at term. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 233, p. 496-501, 1997.
- MAINI, R. N., BRENNAN, F. M., WILLIAMS, R., CHU, C. Q., COPE, A. P., GIBBONS, D., ELLIOTT, M., FELDMANN, M. TNF-alpha in rheumatoid arthritis and prospects of anti-TNF therapy. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v. 11, suppl. 8, p. S173-S175, 1993.
- MAINI, R. N., BREEDVELD, F. C., KALDEN, J. R., SMOLEN, J. S., DAVIS, D., MACFARLANE, J. D., ANTONI, C., LEEB, B., ELLIOTT, M. J., WOODY, J. N., SCHAIBLE, T. F., FELDMANN, M. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly

- methotrexate in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 41, p. 1552-1563, 1998.
- MAINI, R. N., ELLIOTT, M. J., BRENNAN, F. M., WILLIAMS, R. O., CHU, C. Q., PALEOLOG, E., CHARLES, P. J., TAYLOR, P. C., FELDMANN, M. Monoclonal anti-TNF alpha antibody as a probe of pathogenesis and therapy of rheumatoid disease. **Immunol. Rev.**, v. 144, p. 195-223, 1995.
- MAKSYMOWYCH, W. P., AVINA-ZUBIETA, A., LUONG, M. H., RUSSELL, A. S. An open study of pentoxifylline in the treatment of severe refractory rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 22, p. 625-629, 1995.
- MALIK, S. T., EPIKETOS, A. A. The immune system and gynaecological cancer. **Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.**, v. 6, p. 641-656, 1992.
- MALININ, T. I., PEKIN, T. J., ZVAIFLER, N. J. Cytology of synovial fluid in arthritis rheumatoid. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 47, p. 203-208, 1967.
- MARCINKIEWICZ, J. L., KRISHNA, A., CHEUNG, C. M., TERRANOVA, P. F. Oocyte tumor necrosis factor alpha: localization in the neonatal ovary and throughout follicular development in the adult rat. **Biol. Reprod.**, v. 50, p. 1251-1260, 1994.
- MASFERRER, J. L., ZWEIFEL, B. S., MANNING, P. T., HAUSER, S. D., LEAHY, K. M., SMITH, W. G., ISAKSON, P. C., SEIBERT, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 3228-3232, 1994.
- MASI, A. T., BIJLSMA, J. W., CHIKANZA, I. C., PITZALIS, C., CUTOLO, M. Neuroendocrine, immunologic, and microvascular systems interactions in rheumatoid arthritis: physiopathogenetic and therapeutic perspectives. **Semin. Arthritis Rheum.**, v. 29, p. 65-81, 1999.
- MASI, A. T., FEIGENBAUM, S. L., CHATTERTON, R. T. Hormonal and pregnancy relationships to rheumatoid arthritis: convergent effects with immunologic and microvascular systems. **Semin. Arthritis Rheum.**, v. 25, p. 1-27, 1995.
- MAYMON, E., GHEZZI, F., EDWIN, S. S., MAZOR, M., YOON, B. H., GOMEZ, R., ROMERO, R. The tumor necrosis factor alpha and its soluble

- receptor profile in term and preterm parturition. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 181, p. 1142-1148, 1999.
- McBRIDE, W. G. Thalidomide and congenital abnormalities (Letter.). **Lancet**, v. 2, p. 1358, 1961.
- MCCOMB, J., GOULD, T., CHLIPALA, E., SENNELO, G., FRAZIER, J., KIEFT, G., SEELY, J., EDWARDS, C.K. 3RD, BENDELE, A. Antiarthritic activity of soluble tumor necrosis factor receptor type I forms in adjuvant arthritis: correlation of plasma levels with efficacy. **J. Rheumatol.**, v. 26, p. 1347-1351, 1999.
- MCMURRAY, R. W., ALLEN, S. H., BRAUN, A. L., RODRIGUEZ, F., WALKER, S. E. Longstanding hyperprolactinemia associated with systemic lupus erythematosus: possible hormonal stimulation of an autoimmune disease. **J. Rheumatol.**, v. 21, p. 843-850, 1994.
- MINO, T., SUGIYAMA, E., TAKI, H., KURODA, A., YAMASHITA, N., MARUYAMA, M., KOBAYASHI, M. Interleukin-1alpha and tumor necrosis factor alpha synergistically stimulate prostaglandin E2-dependent production of interleukin-11 in rheumatoid synovial fibroblasts. **Arthritis Rheum.**, v. 41, p. 2004-2013, 1998.
- MIOSSEC, P. Acting on the cytokine balance to control auto-immunity and chronic inflammation. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 4, p. 245-251, 1993.
- MIOSSEC, P., NAVILIAT, M., DUPUY D'ANGEAC, A., SANY, J., BANCHEREAU, J. Low levels of interleukin 4 and high levels of transforming growth factor β in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 33, p. 1180-1187, 1990.
- MITCHELL, J. A., WARNER, T. D. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. **Br. J. Pharmacol.**, v. 128, p. 1121-1132, 1999.
- MITCHELL, J. A., AKARASEREENONT, P., THIEMERMANN, C., FLOWER, R. J., VANE, J. R. Selectivity of non-steroidal anti-inflammatory

- drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 11693-11697, 1993.
- MITCHELL, J. A., BELVISI, M. G., AKARASEREENONT, P., ROBBINS, R. A., KWON, O. J., CROXTALL, J., BARNES, P. J., VANE, J. R. Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. **Br. J. Pharmacol.**, v. 113, p. 1008-1014, 1994.
- MOLLOY, R. G., MANNICK, J. A., RODRICK, M. L. Cytokines, sepsis and immunomodulation. **Br. J. Surg.**, v. 80, p. 289-297, 1993.
- MOORE, K. W., O'GARRA, A., DE WAAL MALEFYT, R., VIEIRA, P., MOSMANN, T. R. Interleukin-10. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 165-190, 1993.
- MOORMANN, A. M., SULLIVAN, A. D., ROCHFORD, R. A., CHENSUE, S. W., BOCK, P. J., NYIRENDA, T., MESHNICK, S. R. Malaria and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intrauterine growth retardation. **J. Infect. Dis.**, v. 180, p. 1987-1993, 1999.
- MORHAM, S. G., LANGENBACH, R., LOFTIN, C. D., TIANO, H. F., VOULOUMANOS, N., JENNETTE, J. C., MAHLER, J. F., KLUCKMAN, K. D., LEDFORD, A., LEE, C. A., et al. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. **Cell**, v. 83, p. 473-482, 1995.
- MOTTA, A. B., ESTEVEZ, A., DE GIMENO, M. F. The involvement of nitric oxide in corpus luteum regression in the rat: feedback mechanism between prostaglandin F(2alpha) and nitric oxide. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 5, p. 1011-10166, 1999.
- MUELLER, C., CORAZZA, N., TRACHSEL-LOSETH, S., EUGSTER, H. P., BUHLER-JUNGO, M., BRUNNER, T., IMBODEN, M. A. Noncleavable Transmembrane Mouse Tumor Necrosis Factor-alpha (TNFalpha) Mediates Effects Distinct from Those of Wild-type TNFalpha in Vitro and in Vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 38112-38118, 1999.

- MUNCK, A., GUYRE, P. M., HOLBROOK, N. J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. **Endocr. Rev.**, v. 5, p. 25-44, 1984.
- MURDOCH, W. J., LUND, S. A. Prostaglandin-independent anovulatory mechanism of indomethacin action: inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced sheep ovarian cell apoptosis. **Biol. Reprod.**, v. 61, p. 1655-1659, 1999.
- NAGY, E., CHALMERS, I. M., BARAGAR, F. D., FRIESEN, H. G., BERCZI, I. Prolactin deficiency in rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 18, p. 1662-1668, 1991.
- NAITO, A., AZUMA, S., TANAKA, S., MIYAZAKI, T., TAKAKI, S., TAKATSU, K., NAKAO, K., NAKAMURA, K., KATSUKI, M., YAMAMOTO, T., INOUE, J. Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. **Genes Cells**, v. 4, p. 353-362, 1999.
- NAKAJIMA, T., AONO, H., HASUNUMA, T., YAMAMOTO, K., SHIRAI, T., HIROHATA, K., NISHIOKA, K. Apoptosis and functional Fas antigen in rheumatoid arthritis synoviocytes. **Arthritis Rheum.**, v. 38, p. 485-491, 1995.
- NAKAMURA, Y., KATO, H., TERRANOVA, P. F. Interleukin-1 alpha increases thecal progesterone production of preovulatory follicles in cyclic hamsters. **Biol. Reprod.**, v. 43, p. 169-173, 1990.
- NEIDHART, M., GAY, R. E., GAY, S. Prolactin and prolactin-like polypeptides in rheumatoid arthritis. **Biomed. Pharmacother.**, v. 53, p. 218-222, 1999.
- NELSON, D. M., JOHNSON, R. D., SMITH, S. D., ANTEBY, E.Y., SADOVSKY, Y. Hypoxia limits differentiation and up-regulates expression and activity of prostaglandin H synthase 2 in cultured trophoblast from term human placenta. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 180, p. 896-902, 1999.
- NELSON, J. L., OSTENSEN, M. Pregnancy and rheumatoid arthritis. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 23, p. 195-212, 1997.

- NELSON, J. L., KOEPESELL, T. D., DUGOWSON, C. E., VOIGT, L.F., DALING, J. R. HANSEN, J. A. Fecundity before disease onset in women with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 36, p. 7-14, 1993.
- NIE, G.Y., BUTT, A. R., SALAMONSEN, L. A., FINDLAY, J. K. Hormonal and non-hormonal agents at implantation as targets for contraception. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 9, p. 65-76, 1997.
- NISHIZAWA, M., NAKAJIMA, T., YASUDA, K., KANZAKI, H., SASAGURI, Y., WATANABE, K., ITO, S. Close kinship of human 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene with three aldo-keto reductase genes. **Genes Cells**, v. 5, p. 111-125, 2000.
- JOBLE, S., BALFOUR, J. A. Meloxicam. **Drugs**, v. 51, p. 424-430, 1996.
- JOVARO, V., RETTORI, V., GONZALEZ, E.T., JAWERBAUM, A., FALETTI, A., CANTEROS, G., DE GIMENO, M. A. Interaction between uterine PGE and PGF2 alpha production and the nitridergic system during embryonic implantation in the rat. **Prostaglandins**, v. 51, p. 363-376, 1996.
- JOWAK, D., LEWANDOWICZ, J., DBKOWSKA, B., MARCZAK, J. Combination of methotrexate and prednizone decreases circulating concentrations of interleukin 1 beta and interleukin 6 in patients with rheumatoid arthritis. Poor correlation of cytokine suppression with clinical improvement. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.**, v. 12, p. 13-21, 1999.
- JYMAN, U., MUSSENER, A., LARSSON, E., LORENTZEN, J., KLARESKOG, L. Amelioration of collagen II-induced arthritis in rats by the type IV phosphodiesterase inhibitor Rolipram. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 108, p. 415-419, 1997.
- BER, C. HLA and pregnancy: the paradox of the fetal allograft. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 62, p. 1-5, 1998.
- RINO, E., SONE, S., NII, A., OGURA, T. IL-4 up-regulates IL-1 receptor antagonist gene expression and its production in human blood monocytes. **J. Immunol.**, v. 149, p. 925-931, 1992.
- SHIMA, M., DINCHUK, J. E., KARGMAN, S. L., OSHIMA, H., HANCOCK, B., KWONG, E., TRZASKOS, J. M., EVANS, J. F., TAKETO, M. M.

- Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). **Cell**, v. 87, p. 803-809, 1996.
- OSTENSEN, M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy **Scand. J. Rheum.**, v. 107, p. 128-132, 1998.
- _____. Sex hormones and pregnancy in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 76, p. 131-143, 1999.
- OSTENSEN, M., VON SCHOULTZ, B., HUSBY, G. Comparison between serum alpha 2-pregnancy-associated globulin and activity of rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis during pregnancy. **Scand. J. Rheumatol.**, v. 12, p. 315-318, 1983.
- PAKRASI, P. L. Prostaglandins and ovum implantation in mice **J. Exp. Zool.**, v. 278, p. 53-57, 1997.
- PAL, P., ROY, R., DATTA, P. K., DUTTA, A. K., BISWAS, B., BHADRA, R. Hydroalcoholic human placental extract: skin pigmenting activity and gross chemical composition. **Int. J. Dermatol.**, v. 34, p. 61-66, 1995.
- PAMPFER, S., WUU, Y. D., VANDERHEYDEN, I., DE HERTOOGH, R. Expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) receptors and selective effect of TNF alpha on the inner cell mass in mouse blastocysts. **Endocrinology**, v. 134, p. 206-212, 1994.
- PARR, E. L., TUNG, H. N., PARR, M. B. Apoptosis as the mode of the uterine epithelial cell death during embryo implantation in the mice and rats. **Biol. Reprod.**, v. 36, p. 211-225, 1987.
- PEARSON, C. M. Development of arthritis, peri-arthritis, and periostitis in rats given adjuvants. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 91, p. 95, 1956.
- PEKIN, T. J., MALININ, T. I., ZVAIFLER, N. J. Unusual synovial fluid findings in Reiter's syndrome. **Ann. Intern. Med.**, v. 66, p. 677-684, 1967.
- PERRAUD, J., STADLER, J., KESSEDJIAN, M. J., MONRO, A. M. Reproductive studies with the anti-inflammatory agent, piroxicam: modification of classical protocols. **Toxicology**, v. 30, p. 59-63, 1984.
- PERRETTI, M., DUNCAN, G. S., FLOWER, R. J., PEERS, S. H. Serum corticosterone, interleukin-1 and tumour necrosis factor in rat experimental

- endotoxaemia: comparison between Lewis and Wistar strains. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 868-874, 1993.
- PFEFFER, K., MATSUYAMA, T., KUNDIG, T. M., WAKEHAM, A., KISHIHARA, K., SHAHINIAN, A., WIEGMANN, K., OHASHI, P. S., KRONKE, M., MAK, T. W. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. **Cell**, v. 73, p. 457-467, 1993.
- PHILIPPE, L., GEGOUT-POTTIE, P., GUINGAMP, C., BORDJI, K., TERLAIN, B., NETTER, P., GILLET, P. Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. R1550-R1556, 1997.
- PHILLIPS, T. A., NI, J., PAN, G., RUBEN, S. M., WEI, Y. F., PACE, J. L., HUNT, J. S. TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege. **J. Immunol.**, v. 162, p. 6053-6059, 1999.
- PLOWS, D., KONTOGEORGOS, G., KOLLIAS, G. Mice lacking mature T and B lymphocytes develop arthritic lesions after immunization with type II collagen. **J. Immunol.**, v. 162, p. 1018-1023, 1999.
- POLLARD, J.K., THAI, D., MITCHELL, M. D. Mechanism of cytokine stimulation of prostaglandin biosynthesis in human decidua. **J. Soc. Gynecol. Investig.**, v. 1, p. 31-36, 1994.
- POLLARD, J.W., HUNT, J.S., WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W., STANLEY, E.R. A pregnancy defect in the osteopetrotic (op/op) mouse demonstrates the requirement for CSF-1 in female fertility. **Dev. Biol.**, v. 148, p. 273-283, 1991.
- POMINI, F., CARUSO, A., CHALLIS, J. R. Interleukin-10 modifies the effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on the activity and expression of prostaglandin H synthase-2 and the NAD⁺-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in cultured term human villous trophoblast and chorion trophoblast cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 84, p. 4645-4651, 1999.
- POUTSIKA, D. D., CLARK, B. D., VANNIER, E., DINARELLO, C. A. Production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 β by

- peripheral blood mononuclear cells is differentially regulated. **Blood**, v. 78, p. 1275-1281, 1991.
- PSYCHOYOS, A. Study of the relations of the ovum and endometrium during delay of nidation on the first phases of the nidation process in the female rat. **C. R. Hebd. Sèances Acad. Sci.**, v. 263, p. D1755-D1758, 1966.
- PUJOL-BORREL, R., TODD, I., DOSHI, M., BOTTAZZO, G.F., SUTTON, R., GRAY, D., ADOLF, G. R., FELDMANN, M. HLA class II induction in human islet cells by interferon-gamma plus tumour necrosis factor or lymphotoxin. **Nature (London)**, v. 326, p. 304-306, 1987.
- QU, Z., GARCIA, C. H., O'ROURKE, L. M., PLANCK, S. R., KOHLI, M., ROSENBAUM, J. T. Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. Results of proliferating cell nuclear antigen/cyclin, c-myc, and nucleolar organizer region staining. **Arthritis Rheum.**, v. 37, p. 212-220, 1994.
- RAITER-TENENBAUM, A., BARANAO, R. I., ETCHEPAREBORDA, J. J., MERESMAN, G. F., RUMI, L. S. Functional and phenotypic alterations in peritoneal macrophages from patients with early and advanced endometriosis. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 261, p. 147-157, 1998.
- REESE, J., BROWN, N., PARIA, B. C., MORROW, J., DEY, S. K. COX-2 compensation in the uterus of COX-1 deficient mice during the pre-implantation period. **Mol. Cel. Endocrinol.**, v. 150, p. 23-31, 1999.
- RICE, A., CHARD, T. Cytokines in implantation. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 9, p. 287-296, 1998.
- RINEHART, B. K., TERRONE, D. A., LAGOO-DEENADAYALAN, S., BARBER, W. H., HALE, E. A., MARTIN, J. N. Jr, BENNETT, W. A. Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin 1beta, and interleukin 10 is increased in preeclampsia. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 181, p. 915-920, 1999.
- RIVIER, C., VALE, W. In the rat, interleukin-1 alpha acts at the level of the brain and the gonads to interfere with gonadotropin and sex steroid secretion. **Endocrinology**, v. 124, p. 2105-2109, 1989.

- ROBERTS, R. M., XIE, S., MATHIALAGAN, N. Maternal recognition of pregnancy. **Biol. Reprod.**, v. 54, p. 294-302, 1996.
- ROBY, K. F., SON, D. S., TERRANOVA, P. F. Alterations of events related to ovarian function in tumor necrosis factor receptor type I knockout mice. **Biol. Reprod.**, v. 61, p. 1616-1621, 1999.
- ROMERO, R., MANOGUE, K. R., MITCHELL, M. D. Infection and labor IV. Cathectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 73, p. 31-34, 1989.
- ROUBENOFF, R., FREEMAN, L.M., SMITH, D.E., ABAD, L.W., DINARELLO, C.A., KEHAYIAS, J.J. Adjuvant arthritis as a model of inflammatory cachexia. **Arthritis Rheum.**, v. 40, p. 534-539, 1997.
- ROUBENOFF, R., ROUBENOFF, R. A., CANNON, J.G., KEHAYIAS, J. J., ZHUANG, H., DAWSON-HUGHES, B., DINARELLO, C. A., ROSENBERG, I. H. Rheumatoid cachexia: cytokine-driven hypermetabolism accompanying reduced body cell mass in chronic inflammation. **J Clin. Invest.**, v. 93, p. 2379-2386, 1994.
- RUOSLAHTI, E. Fibronectin and its receptors. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 57, p. 375-413, 1988.
- RUTANEN, E.M. Cytokines in reproduction. **Ann. Med.**, v. 25, p. 343-347, 1993.
- SACCO, S., AGNELLO, D., SOTTOCORNO, M., LOZZA, G., MONOPOLI, A., VILLA, P., GHEZZI, P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs increase tumor necrosis factor production in the periphery but not in the central nervous system in mice and rats. **J. Neurochem.**, v. 71, p. 2063-2070, 1998.
- SACKS, G. P., STUDENA, K., SARGENT, K., REDMAN, C. W. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 179, p. 80-86, 1998.

- SALAMONSEN, L. A., WOOLLEY, D. E. Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. **J. Reprod. Immunol.**, v. 44, p.1-27, 1999.
- SAMPAIO, E. P., SARNO, E. N., GALILLY, R., COHN, Z. A., KAPLAN, G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. **J. Exp. Med.**, v. 173, p. 699-703, 1991.
- SANO, H., HLA, T., MAIER, J. A., CROFFORD, L. J., CASE, J. P., MACIAG, T., WILDER, R. L. In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. **J. Clin. Invest.**, v. 89, p. 97-108, 1992.
- SAVILL, J. S., WYLLIE, A. H., HENSON, J. E., WALPORT, M. J., HENSON, P. M., HASLETT, C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. **J. Clin. Invest.**, v. 83, p. 865-875, 1989.
- SAVION, S., IRLIN, J., SHEPSHELOVICH, J., BRENGAUZ, M., TODER, V. Anti-Mac-1 antibodies and early pregnancy loss in mice. **J. Reprod. Fertil.**, v. 107, p. 7-10, 1996.
- SAWDY, R., KNOCK, G. A., BENNETT, P. R., POSTON, L., AARONSON, P. I. Effect of nimesulide and indomethacin on contractility and the Ca²⁺ channel current in myometrial smooth muscle from pregnant women. **Br. J. Pharmacol.**, v. 125, p. 1212-1217, 1998.
- SCHIOZAWA, S., YOSHIHARA, R., KUROKI, Y., FUJITA, T., SCHIOZAWA, K., IMURA, S. Pathogenic importance of fibronectin in superficial region of articular cartilage as a local factor for the induction of pannus extension on rheumatoid articular cartilage. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 51, p. 869-873, 1992.
- SCHLAFKE, S., ENDERS, A. C. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. **Biol. Reprod.**, v. 12, p. 41-65, 1975.
- SCHUURS, A. H., VERHEUL, H. A. Effects of gender and sex steroids on the immune response. **J. Steroid Biochem.**, v. 35, p. 157-172, 1990.

- SCOTT, S., PANDOLFI, F., KURNICK, J. T. Fibroblasts mediate T cell survival: a proposed mechanism for retention of primed T cells. **J. Exp. Med.**, v. 172, p. 1873-1876, 1990.
- SEED, M. P., FREEMANTLE, C. N., ALAM, C. A., COLVILLE-NASH, P. R., BROWN, J.R., PAPWORTH, J.L., SOMERVILLE, K.W., WILLOUGHBY, D. A. Apoptosis induction and inhibition of colon-26 tumour growth and angiogenesis: findings on COX-1 and COX-2 inhibitors in vitro & in vivo and topical diclofenac in hyaluronan **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 33, p. 339-342, 1997.
- SEIBERT, K., ZHANG, Y., LEAHY, K., HAUSER, S., MASFERRER, J., PERKINS, W., LEE, L., ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 91, p. 12013-12017, 1994.
- SEITZ, M. M., DEWALD, B., GERVER, N., BAGGIOLLINI, M. Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/Interleukin-8 on rheumatoid arthritis. **J. Clin. Invest.**, v. 87, p. 463-469, 1991.
- SEKUT, L., YARNALL, D., STIMPSON, S. A., NOEL, L S., BATEMAN-FITE, R., CLARK, R. L., BRACKEEN, M. F., MENIUS, J. A. Jr., CONNOLLY, K. M. Anti-inflammatory activity of phosphodiesterase (PDE)-IV inhibitors in acute and chronic models of inflammation. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 100, p. 126-132, 1995.
- SEOW, W. K., THONG, Y. H., WATERS, M. J. et al. Isolation of a chemotactic protein for neutrophil from human ovarian follicular fluid. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 86, p. 31, 1988.
- SHEERAN, P., HALL, G. M. Cytokines in anaesthesia. **Br. J. Anaesth.**, v. 78, p. 201-219, 1997.
- SHIMIZU, Y., NEWMAN, W., TANAKA, Y., SHAW, S. Lymphocyte interactions with endothelial cells. **Immunol. Today**, v. 13, p. 106-112, 1992.
- SHINMEI, M., MASUDA, K., KIKUCHI, T., SHIMOMURA, Y. The role of cytokines in chondrocyte mediated cartilage degradation. **J. Rheumatol. Suppl.**, v. 18, p. 32-34, 1989.

- SHODA, T., HATANAKA, K., SAITO, M., MAJIMA, M., OGINO, M., HARADA, Y., NISHIJIMA, M., KATORI, M., YAMAMOTO, S. Induction of cyclooxygenase type-2 (COX-2) in rat endometrium at the peak of serum estradiol during the estrus cycle. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 69, p. 289-291, 1995.
- SHULL, M. M., ORMSBY, I., KIER, A. B., PAWLOWSKI, S., DIEBOLD, R. J., YIN, M., ALLEN, R., SIDMAN, C., PROETZEL, G., CALVIN, D., et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. **Nature**, v. 359, p. 693-699, 1992.
- SILMAN, A. J. Parity status and the development of rheumatoid arthritis. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 28, p. 228-230, 1992.
- SILVA, J. C. R., ROCHA, M. G. F., LIMA, A. A. M., BRITO, G. A. C., de MENEZES, D. G., RAO, V. S. N. Treatment effects of pentoxifylline and nabumetone on the serum levels of IL-1 β and TNF α in rats bearing adjuvant arthritis. **Inflamm. Res.**, v. 48, p.1-6, 1999.
- SILVA, L.C. Reumatismos não existem. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 39, p. 187-190, 1999.
- SIMON, C., MORENO, C., REMOHI, J., PELLICER, A. Cytokines and embryo implantation. **J. Reprod. Immunol.**, v. 39, p. 117-131, 1998.
- SIMON, C., POLAN, M.L. Cytokines and reproduction. **West. J. Med.**, v. 160, p. 425-429, 1994.
- SINGH, G., TRIADAFILOPOULOS, G. Epidemiology of NSAID induced gastrointestinal complications. **J. Rheumatol.**, v. 26, suppl. 56, p. 18-24, 1999.
- SIROIS, J., LEVY, L. O., SIMMONS, D. L., RICHARDS, J. S. Characterization and hormonal regulation of the promoter of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. Identification of functional and protein-binding regions. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 12199-12206, 1993.
- SLATER, D., ALLPORT, V., BENNETT, P. Changes in the expression of the type-2 but not type-1 cyclooxygenase enzyme in corion-decidua with the onset of labour. **Br. J. Gynaecol.**, v. 105, p. 745-748, 1998.

- SLATER, D., DENNES, W., SAWDY, R., ALLPORT, V., BENNETT, P. Expression of cyclo-oxygenase types-1 and -2 in human fetal membranes throughout pregnancy. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 22, p. 125-130, 1999.
- SMEETS, T. J., DOLHAIN, R. J. E. M., MILTENBURG, A. M., DE KUIPER, R., BREEDVELD, F. C., TAK, P. P. Poor expression of T cell-derived cytokines and activation and proliferation markers in early rheumatoid synovial tissue. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 88, p. 84-90, 1998.
- SMITH, T. J. Cyclooxygenases as the principal targets for the actions of NSAIDs. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 24, p. 501-523, 1998.
- SMITH, W. L., DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. **Adv. Immunol.**, v. 62, p. 167-215, 1996.
- SMITH-OLIVER, T., NOEL, L. S., STIMPSON, S. S., YARNALL, D. P., CONNOLLY, K. M. Elevated levels of TNF in the joints of adjuvant arthritic rats. **Cytokine**, v. 5, p. 298-304, 1993.
- SOCOL, M. L., WEINER, C. P., LOUIS, G., REHNBERG, K., ROSSI, E. C. Platelet activation in preeclampsia. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 151, p. 494-497, 1985.
- SONG, J. H., SIROIS, J., HONDE, A., MURPHY, B. D. Cloning, developmental expression, and immunohistochemistry of cyclooxygenase 2 in the endometrium during embryo implantation and gestation in the mink (*Mustela vison*). **Endocrinology**, v. 139, p. 3629-3636, 1998.
- SPECTOR, T. D., ROMAN, E., SILMAN, A. J. The pill, parity, and rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 33, p. 782-789, 1990.
- STASTNY, P. Association of the B cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. **N. Engl. J. Med.**, v. 298, p. 869-871, 1978.
- STRIETER, R. M., REMICK, D. G., WARD, P. A., SPENGLER, R. N., LYNCH, J. P. 3D, LARRICK, J., KUNKEL, S. L. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 155, p. 1230-1236, 1988.

- STEWART, C.L., CULLINAN, E.B. Preimplantation development of the mammalian embryo and its regulation by growth factors. **Dev. Genet.**, v.21, p. 91-101, 1997.
- SUITE, M., QUAMINA, D. B. Treatment of vitiligo with topical melagenine--a human placental extract. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 24, p. 1018-1019, 1991.
- SYMMONS, D. P., BANKHEAD, C. R., HARRISON, B. J., BRENNAN, P., BARRETT, E. M., SCOTT, D. G., SILMAN, A. J. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. **Arthritis Rheum.**, v. 40, p. 1955-1961, 1997.
- TABIBZADEH, S. Molecular control of the implantation window. **Hum. Reprod. Update**, v. 4, p. 465-471, 1998.
- _____. Ubiquitous expression of TNF-alpha/cachectin immunoreactivity in human endometrium. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 26, p. 1-4, 1991.
- TABIBZADEH, S., SATYASWAROOP, P. G., VON WOLFF, M., STROWITZKI, T. Regulation of TNF-alpha mRNA expression in endometrial cells by TNF-alpha and by oestrogen withdrawal. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 5, p. 1141-1149, 1999.
- TARTAKOVSKY, B., BEN-YAIR, E. Cytokines modulate preimplantation development and pregnancy. **Dev. Biol.**, v. 146, p. 345-352, 1991.
- TAWFIK, O. W., HIEET, Y. M., MALATHY, P. V., JOHNSON, D. R., DEY, S. K. Release of prostaglandins and leukotrienes from the rat uterus is an estrogenic response. **Prostaglandins**, v. 34, p. 805-815, 1987.
- TERRANOVA, P. F., HUNTER, V.J., ROBY, K.F., HUNT, J. S. Tumor necrosis factor-alpha in the female reproductive tract. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 209, p. 325-342, 1995.
- TESARIK, J. Calcium signaling in human preimplantation development: a review. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v. 16, p. 216-220, 1999.
- THOMPSON, R. C. IL-1 receptor antagonist in arthritis and arthritis models. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v. 11, suppl. 8, p. S169, 1993.

- THOMSON, A. J., TELFER, J. F., YOUNG, A., CAMPBELL, S., STEWART, C. J., CAMERON, I. T., GREER, I. A., NORMAN, J. E. Leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process. **Hum. Reprod.**, v. 14, p. 229-236, 1999.
- THOMSON, W., HARRISON, B., OLLIER, B., WILES, N., PAYTON, T., BARRETT, J., SYMMONS, D., SILMAN, A. Quantifying the exact role of HLA-DRB1 alleles in susceptibility to inflammatory polyarthritis: results from a large, population-based study. **Arthritis Rheum.**, v. 42, p. 757-762, 1999.
- TODER, V., STRASSBURGER, D., CARP, H., IRLIN, I. Mouse model for the treatment of immune pregnancy loss. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 26, p. 42-46, 1991.
- TOURNAYE, H., VAN DER LINDEN, M., VAN DEN ABBEEL, E., DEVROEY, P., VAN STEIRTEGHEM, A. The effect of pentoxifylline on mouse in-vitro fertilization and early embryonic development. **Hum. Reprod.**, v. 9, p. 1903-1918, 1994.
- TRACEY, K. J., WEI, H., MANOGUE, K.R., FONG, Y., HESSE, D. G., NGUYEN, H. T., KUO, G. C., BEUTLER, B., COTRAN, R. S., CERAMI, A., LOWRY, S. F. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. **J. Exp. Med.**, v. 167, p. 1211-1227, 1988.
- TREMELLEN, K. P., SEAMARK, R. F., ROBERTSON, S. A. Seminal transforming growth factor beta1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus. **Biol. Reprod.**, v. 58, p.1217-1225, 1998.
- TSUJII, M., KAWANO, S., TSUJI, S., SAWAOKA, H., HORI, M., DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell**, v. 93, p. 705-716, 1998.
- TYNDALL, A., MILLIKAN, S. Bone marrow transplantation. **Baillieres Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.**, v. 13, p. 719-735, 1999.
- VAN DER HORST-BRUIJNSMA, I. E., VISSER, H., HAZES, J. M., BREEDVELD, F. C., VERDUYN, W., SCHREUDER, G. M., DE VRIES, R. R., ZANELLI, E. HLA-DQ-associated predisposition to and dominant

- HLA-DR-associated protection against rheumatoid arthritis. **Hum. Immunol.**, v. 60, p. 152-158, 1999.
- VANE, J. Towards a better aspirin. **Nature**, v. 367, p. 215-248, 1994.
- VANE, J. R., BOTTING, R. M. Mechanism of action of antiinflammatory drugs. **Int. J. Tissue React.**, v. 20, n.1, p. 3-15, 1998.
- VANNIER, E., MILLER, L. C., DINARELLO, C. A. Coordinated antiinflammatory effects of interleukin 4: interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 4076-4080, 1992.
- WAHL, S. M., ALLEN, J. B., HINES, K. L., IMAMICHI, T., WAHL, A. M., FURCHT, L. T., MCCARTHY, J. B. Synthetic fibronectin peptides suppress arthritis in rats by interrupting leukocyte adhesion and recruitment. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 655-662, 1994.
- WALLER, E. On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. **Acta. Path. Microbiol. Scand.**, v. 17, p. 172-188, 1940.
- WALSH, S.W. Maternal-placental interactions of oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. **Semin. Reprod. Endocrinol.**, v. 16, p. 93-104, 1998.
- WANG, B., CHEN, M. Z. Effects of indomethacin on secretory function of synoviocytes from adjuvant arthritis rats. **Int. J. Tissue React.**, v. 20, p.91-94, 1998.
- WANG B, YAO YY, CHEN MZ. Effects of indomethacin on joint damage in rat and rabbit. **Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao**, v.19, p.70-73, 1998.
- WARNER, T. D., GIULIANO, F., VOJNOVIC, I., BUKASA, A., MITCHELL, J. A., VANE, J. R. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 7563-7568, 1999.
- WEBER, G., FREY, H. Treatment of psoriatic arthritis with bromocriptine. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.16, p. 388-389, 1987.

- WECKMANN, A.L., ALCOCER-VARELA, J. Cytokine inhibitors in autoimmune disease. **Semin. Arthritis Rheum.**, v.26, p. 539-557, 1996.
- WEGMANN, T.G., LIN, H., GUILBERT, L., MOSMANN, T.R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? **Immunol. Today**, v. 14, p. 353-356, 1993.
- WEINBLATT, M. E., KREMER, J. M., BANKHURST, A. D., BULPITT, K. J., FLEISCHMANN, R. M., FOX, R. I., JACKSON, C. G., LANGE, M., BURGE, D. J. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, p. 253-259, 1999.
- WEETMAN, A. P. The immunology of pregnancy. **Thyroid**, v. 9, p. 643-646, 1999.
- WEISSMANN, G. Lysosomal mechanisms of tissue injury in arthritis. **N. Engl. J. Med.**, v. 286, p.141-147, 1972.
- WEYAND, C. M., GORONZY, J. J. Short analytical review. Functional domains on HLA DR molecules: implication for the linkage of HLA DR genes to different autoimmune diseases. **Clin. Immunopathol.**, v. 70, p. 91-98, 1994.
- WEYAND, C. M., XIE, C., GORONZY, J. J. Homozygosity for the HLA DRB1 allele selects for extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. **J. Clin. Invest.**, v. 89, p.2033-2039, 1992.
- WILDER, R. L. Hormones, pregnancy, and autoimmune diseases. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 840, p. 45-50, 1998.
- WILDER, R. L., ELENKOV, I. J. Hormonal regulation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-12 and interleukin-10 production by activated macrophages. A disease-modifying mechanism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus? **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 876, p. 14-31, 1999.
- WILLIAMS, C. S., DUBOIS, R. N. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? **Amer. J. Physiol.**, v. 270, p. G393-G400, 1996.
- WYLLIE, A. H., KERR, J. F., CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, v. 68, p. 251-306, 1980.

- WU, K. K. Cyclooxygenase 2 induction: molecular mechanism and pathophysiologic roles. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 128, p. 242-245, 1996.
- YELAVARTHI, K.K., CHEN, H.L., YANG, Y.P., COWLEY, B.D. Jr, FISHBACK, J.L., HUNT, J.S. Tumor necrosis factor-alpha mRNA and protein in rat uterine and placental cells. **J. Immunol.**, v.146, p. 3840-3848, 1991.
- YANG, R. Z., XIE, X. Y., SUN, H. Y., ZHAO, M. H., QIAN, S. Z. Effect of intrauterine injection of chlorpromazin on implantation in the rat. **Contraception**, v. 58, p. 315-320, 1998.
- YEE, G., KENNEDY, T. G. Stimulatory effects of prostaglandins upon endometrial alkaline phosphatase activity during the decidual cell reaction in the rat. **Biol. Reprod.**, v. 38, p.1129-1136, 1988.
- YOUSIF, M. H., THULESIUS, O. Tocolytic effect of the cyclooxygenase-2 inhibitor, meloxican: studies on uterine contractions in the rat **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 50, p. 681-685, 1998.
- ZHANG, M. Z., WANG, J. L., CHENG, H. F., HARRIS, R. C., MCKANNA, J. A. Cyclooxygenase-2 in rat nephron development. **Amer. J. Physiol.**, v. 273, n. 6 pt 2, p. F994-F1002, 1997.
- ZIFF, M. Heberden Oration, 1964: some immunologic aspects of the connective tissue diseases. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 24, p. 103-115, 1965.
- ZVAIFLER, N. J. A retrospective analysis of the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Rev. Rhum.**, v. 63, p. 791-796, 1996.
- _____. A speculation on the pathogenesis of joint inflammation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 8, p. 289-293, 1965.
- _____. The immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis. **Adv. Immunol.**, v. 16, p. 265-336, 1973.

9. ANEXOS

ANEXO 1 - Dados referentes à Figura 1

Curso temporal do desenvolvimento da lesão inflamatória secundária em ratas com artrite.

Grupos	n	Dias após a injeção de ACF									
		Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 28		Dia 35	
		<i>Média</i>	<i>EPM</i>	<i>Média</i>	<i>EPM</i>	<i>Média</i>	<i>EPM</i>	<i>Média</i>	<i>EPM</i>	<i>Média</i>	<i>EPM</i>
Controle-artrite	24	32	10	125	30	330	80	130	30	130	20

n = nº de animais/grupo. Os valores tabulados representam o volume da pata contralateral nos dias 7,14,21, 28 ou 35 após ACF menos o volume da pata no dia da injeção de ACF, e foram expressos em μL , exceto "n".

ANEXO 2 - Dados referentes à Figura 2

Curso temporal do ganho de peso corporal em ratas com artrite

Grupos	n	Dias após a injeção de ACF							
		Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 28	
		<i>Média</i>	<i>EPM</i>	<i>Média</i>	<i>EPM</i>	<i>Média</i>	<i>EPM</i>	<i>Média</i>	<i>EPM</i>
Controle-normal	8	19,7	3,7	29,8	2,96	31	3,79	31,3	3,89
Controle-artrite	44	-1,2***	0,6	-1,4***	1,2	4***	1,59	8,3***	1,86

n = nº de animais/grupo; ***p<0,001; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels *versus* controle-normal. Valores tabulados representam o ganho de peso corporal semanal cumulativo e encontram-se expressos em gramas, exceto "n".

ANEXO 3 - Dados referentes à Figura 4

Efeito da artrite no ciclo estral da rata

Grupos	n	Duração do ciclo estral (dias)	
		Média	EPM
Controle-normal	8	4	0
Controle-artrite	18	5,1***	1,26

n = nº de animais/grupo; ***p<0,001 *versus* normal; Teste "t" de student não-pareado. A duração do ciclo estral foi avaliada do 14º ao 35º dia após ACF.

ANEXO 4 - Dados referentes à Figura 5

Efeito da artrite induzida por ACF na implantação do blastocisto na rata

Grupos	n	Nº de ovoidimplantações		Nº de corpos lúteos	
		Média	EPM	Média	EPM
Controle	19	10,3	0,6	9,5	0,7
Artrite	26	8*	0,7	10,5	0,5

n = nº de animais/grupo; *p<0,05 *versus* controle; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels. Controle e Artrite (salina 154 mM). A gravidez foi induzida nas fêmeas com artrite entre o 10º e 20º dias após o ACF.

ANEXO 5 - Dados referentes à Figura 7Efeito de inibidores da síntese de TNF α na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite

Grupos	n	Dias após a injeção de ACF									
		Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 28		Dia 35	
		Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Controle-artrite	24	32	10	125	26	330	80	130	26	130	40
Artrite + PTF	18	15	5	21	8	52***	12	52	14	48	50
Artrite + TMD	12	10	4	57	4	61***	37	39	23	32	21

n = nº de animais/grupo; ***p<0,001; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels *versus* controle-artrite, respectivamente. Os valores tabulados representam o volume da pata contralateral nos dias 7,14,21, 28 ou 35 após ACF menos o volume da pata no dia da injeção de ACF, e foram expressos em μ L, exceto "n". Controle-artrite (salina 154 mM), Artrite+PTF (pentoxifilina 20 mg/kg,v.o) e Artrite+TMD (talidomida 10 mg/kg,v.o) do 1º ao 35º dia após ACF.

ANEXO 6 - Dados referentes à Figura 8

Efeito de inibidores da síntese de $\text{TNF}\alpha$ no ganho de peso corporal em ratas com artrite

Grupos	n	Dias após a injeção de ACF							
		Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 28	
		Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Controle-normal	8	19,7	3,7	29,8	2,96	31	3,79	31,3	3,89
Controle-artrite	44	-1,2***	0,6	-1,4***	1,2	4***	1,59	8,3***	1,86
Artrite + PTF	28	1,7***	1,7	1***	2	10,6***	1,6	12,7***	1,9
Artrite + TMD	12	-6,5***	1,3	-3,7***	2,3	2,45***	2,6	-0,64***	3,5

n = nº de animais/grupo; ***p<0,001; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels *versus* controle-normal. Valores tabulados representam o ganho de peso corporal semanal cumulativo e encontram-se expressos em gramas, exceto "n". Controle-normal e controle-artrite (salina 154 mM), Artrite+PTF (pentoxifilina 20 mg/kg,v.o) e Artrite+TMD (talidomida 10 mg/kg,v.o) do 1º ao 35º dia após ACF.

ANEXO 7 - Dados referentes à Figura 9

Efeito de inibidores da ciclooxigenase na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite

Grupos	n	Dias após a injeção de ACF									
		Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 28		Dia 35	
		Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Controle-artrite	24	32	10	125	26	333	80	128	26	126	24
Artrite + INDO	17	100	30	130	30	150*	30	120	40	100	30
Artrite + NAB	11	10	6	30	8	52***	11	35	10	34	10
Artrite+PIROX	12	76	15	120	25	120	17	120	18	130	20

n = nº de animais/grupo; *p<0,05 e ***p<0,001; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels *versus* controle-artrite, respectivamente. Os valores tabulados representam o volume da pata contralateral nos dias 7,14,21, 28 ou 35 após ACF menos o volume da pata no dia da injeção de ACF, e foram expressos em μL , exceto "n". Controle-artrite (salina 154 mM), Artrite+INDO (indometacina 20 mg/kg,v.o), Artrite+NAB (nabumetona 20 mg/kg,v.o) e Artrite+PIROX (piroxicam 2mg/kg,v.o) do 1º ao 35º dia após ACF.

ANEXO 8 - Dados referentes à Figura 10

Efeito de inibidores da síntese de ciclooxigenase no ganho de peso corporal em ratas com artrite

Grupos	n	Dias após a injeção de ACF							
		Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 28	
		Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Controle-normal	8	19,7	3,7	29,8	2,96	31	3,79	31,3	3,89
Controle-artrite	44	-1,2 ^a	0,6	-1,4 ^a	1,2	4 ^a	1,59	8,3 ^a	1,86
Artrite + INDO	8	6,8 ^a	1,4	5,8 ^a	1,2	6,9 ^a	1,9	2,9 ^a	1,14
Artrite + NAB	10	3,3 ^a	1,3	8,5 ^a	1,2	6 ^a	1,5	10 ^a	0,97
Artrite + PIROX	8	5,6 ^a	0,9	12,9 ^{a,b}	1,1	11,3 ^a	1,8	11,9 ^a	2,4

n = nº de animais/grupo; ^ap<0,001 comparado ao controle-normal; ^bp<0,01 comparado ao controle-artrite; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels. Valores tabulados representam o ganho de peso corporal semanal cumulativo e encontram-se expressos em gramas, exceto "n". Controle-normal e controle-artrite (salina 154 mM), Artrite+INDO (indometacina 2 mg/kg,v.o.), Artrite+NAB (nabumetona 20 mg/kg,v.o) e Artrite+PIROX (piroxicam 2mg/kg,v.o) do 1º ao 35º dia após ACF.

ANEXO 9 - Dados referentes à Figura 11

Efeito da associação de um inibidor de COX 2 e um inibidor da síntese de TNF α na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite

Grupos	n	Dias após a injeção de ACF									
		Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 28		Dia 35	
		Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Controle-artrite	24	32	10	125	26	333	50	700	50	630	40
Artrite + PTF+NAB	11	20	9	33	11	65***	41	780	41	640	50

n = nº de animais/grupo; ***p<0,001 versus controle artrite ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels. Os valores tabulados representam o volume da pata contralateral nos dias 7,14,21, 28 ou 35 após ACF menos o volume da pata no dia da injeção de ACF, e foram expressos em μ L, exceto "n". Controle-artrite (salina 154 mM) e Artrite+PTF+NAB (pentoxifilina 20 mg/kg, v.o. + nabumetona 20 mg/kg, v.o.) do 1º ao 35º dia após ACF

ANEXO 10 - Dados referentes à Figura 12

Efeito da associação de um inibidor de COX 2 e um inibidor da síntese de TNF α no ganho de peso corporal em ratas com artrite

Grupos	n	Dias após a injeção de ACF							
		Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 28	
		Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Controle-normal	8	19,7	3,7	29,8	2,96	31	3,79	31,3	3,89
Controle-artrite	44	-1,2***	0,6	-1,4***	1,2	4***	1,59	8,3***	1,86
Artrite + PTF+NAB	11	-3,2***	0,9	-5,5***	1,9	3,1***	1,7	8,3***	1,9
PTF	12	0***	3,3	1***	4,9	-5,1***	7,1	-8,8***	5,3
NAB	7	-1,4***	2,6	1,6***	2	16,3***	3	19,8	4,8

n = nº de animais/grupo; ***p<0,001 *versus* controle-normal; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels. Valores tabulados representam o ganho de peso corporal semanal cumulativo e encontram-se expressos em gramas, exceto "n". Controle-normal e Controle-artrite (salina 154 mM), Artrite + PTF+NAB (pentoxifilina 20 mg/kg,v.o. + nabumetona 20 mg/kg,v.o.) do 1º ao 35º dia após ACF. PTF e NAB ratas normais tratadas somente com pentoxifilina 20 mg/kg,v.o. ou com nabumetona 20 mg/kg,v.o., respectivamente.

ANEXO 11 - Dados referentes à Figura 14

Efeito de inibidores da ciclooxigenase e da síntese de TNF α no ciclo estral da rata com artrite

Grupos	n	Duração do ciclo estral (dias)	
		Média	EPM
Normal	8	4	0
Artrite	18	5,1 ^a	1,3
Artrite + INDO (2 mg/kg,vo)	8	4,88 ^a	0,4
+ PIROX (2 mg/kg,vo)	8	4 ^b	0
+ PTF (20 mg/kg,vo)	10	4,9 ^a	1,3
+ TMD (10 mg/kg,vo)	11	4,9 ^a	0,3

n = nº de animais/grupo; ^ap<0,001 *versus* normal e ^bp<0,001 *versus* artrite; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels. A duração do ciclo estral foi avaliada do 14º ao 35º dia após ACF. Normal e Artrite (salina 154 mM). INDO (indometacina 2 mg/kg,vo), PIROX (piroxicam 2 mg/kg,vo), PTF (pentoxifilina 20 mg/kg,vo), TMD (talidomida 10 mg/kg,vo) As drogas foram administradas durante 35 dias após injeção de ACF.

ANEXO 12 - Dados referentes à Figura 15Níveis circulantes de IL-1 β e TNF α no ciclo estral da rata normal

Grupos	n	IL-1 β (pg/mL)		TNF α (pg/mL)	
		Média	EPM	Média	EPM
Estro	5	267,5*	78,5	28,75	4,6
Diestro	5	62,2	40,4	34,9	8,7

n = n^o de animais/grupo; *p<0,05 versus diestro; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels.**ANEXO 13 - Dados referentes à Figura 16**Níveis circulantes de IL-1 β e TNF α em ratas com artrite

Grupos	n	IL-1 β (pg/mL)		TNF α (pg/mL)	
		Média	EPM	Média	EPM
Controle normal	4-5	62,2	40,39	34,9	8,7
Artrite Dia 1 após ACF	4	659,29***	74,9	113,1***	2,74
Dia 10 após ACF	4	605,8***	35,6	126***	5,97
Dia 20 após ACF	4	443,9***	147,3	124,8***	20,1
Dia 30 após ACF	4	268,2	63,5	123***	11,2

n = n^o de animais/grupo; ***p<0,001 versus controle normal; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels.**ANEXO 14 - Dados referentes à Figura 17**Efeito de inibidores de ciclooxigenase e da síntese de TNF α nos níveis séricos de IL-1 β e TNF α em ratas com artrite

Grupos	n	IL-1 β (pg/mL)		TNF α (pg/mL)	
		Média	EPM	Média	EPM
Controle-artrite	4-5	444	147,3	124	20,1
Artrite + PTF	4	249	39,5	31,65***	7,4
+ NAB	4	255	14,5	109,8	4
+ INDO	4	125*	38	75,5	13,3
+ NAB+PTF	4	179	22	15,4***	2,3

n = n^o de animais/grupo; *p<0,05 e ***p<0,001 versus controle-artrite. ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels. Controle-artrite (salina 154 mM), Artrite+PTF (pentoxifilina 20 mg/kg,v.o), Artrite+NAB (nabumetona 20 mg/kg,v.o), Artrite+INDO (indometacina 2 mg/kg,v.o), Artrite + PTF+NAB (pentoxifilina 20 mg/kg,v.o. + nabumetona 20 mg/kg,v.o.) do 1^o ao 35^o dia após ACF.

ANEXO 15 - Dados referentes à Figura 18

Efeito da gravidez nos níveis circulantes de IL-1 β e TNF α em ratas com artrite no dia do parto

Grupos	n	IL-1 β (pg/mL)		TNF α (pg/mL)	
		Média	EPM	Média	EPM
Controle normal	4	62,2	40,4	34,6	8,7
Artrite dia 10	4-5	605,9	35,6	126	5,97
Artrite dia 14 +Gravidez (dia 21)	4	276**	35,4	8,93***	1,8

n = n° de animais/grupo; **p<0,01 e ***p<0,001 *versus* artrite dia 10; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels. Controle normal e Artrite dia 10 (salina 154 mM). Artrite dia 14+gravidez (dia 21) representa ratas grávidas nas quais a artrite foi induzida com ACF no 7° dia de gestação.

ANEXO 16 - Dados referentes à Figura 19

Efeito da gravidez na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite

Grupos	n	Dias após a injeção de ACF									
		Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 28		Dia 35	
		Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Controle-artrite	24	32	10	125	30	330	80	130	30	130	20
Artrite + gravidez	15	40	10	30	6	8***	4	45	14	27	10

n = n° de animais/grupo; ***p<0,001 *versus* controle artrite. ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels. Os valores tabulados representam o volume da pata contralateral nos dias 7,14,21, 28 ou 35 após ACF menos o volume da pata no dia da injeção de ACF, e foram expressos em μ L, exceto "n". Controle-artrite (salina 154 mM). Artrite+gravidez representa ratas grávidas nas quais a artrite foi induzida com ACF no 7° dia de gestação.

ANEXO 17 - Dados referentes à Figura 20

Efeito da gravidez na lesão inflamatória primária promovida pelo ACF na rata

Grupos	n	Dias após a injeção de ACF									
		Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 28		Dia 35	
		Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Controle-lesão primária	12	950	85	1160	100	910	50	700	50	630	40
Lesão primária + gravidez	9	940	80	830**	35	640*	41	780	41	640	50

n = nº de animais/grupo; *p<0,05 e **p<0,01 *versus* controle lesão primária; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels. Os valores tabulados representam o volume da pata que recebeu injeção do ACF menos o volume da mesma pata antes da inoculação do adjuvante (dia 0), e foram expressos em µL, exceto "n". Controle-lesão primária (salina 154 mM). Lesão primária+gravidez representa ratas grávidas nas quais a artrite foi induzida com ACF no 7º dia de gestação.

ANEXO 18 - Dados referentes à Figura 21

Efeito de inibidores da síntese de TNFα na implantação do blastocisto na rata

Grupos	n	Nº de implantações uterinas	
		Média	EPM
Controle	6	9,9	0,46
Gravidez (1º ao 3º dia)			
+ PTF (30 mg/kg,vo)	7	5*	2
+ TMD (10 mg/kg,vo)	7	2,6***	1,5
+ CPZ (30 mg/kg,vo)	6	5,3*	1,31
Gravidez (4º ao 6º dia)			
+ PTF (30 mg/kg,vo)	5	9,4	1,5
+ TMD (10 mg/kg,vo)	6	6,7	2,2
+ CPZ (30 mg/kg,vo)	6	4,7*	2,2

n = nº de animais/grupo; *p<0,05 e ***p<0,001 *versus* controle; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels. PTF (pentoxifilina 30 mg/kg,vo), TMD (talidomida 10 mg/kg,vo), CPZ (clorpromazina 30 mg/kg,vo).

ANEXO 19 - Dados referentes à Figura 22

Efeito de inibidores da ciclooxigenase 1 e 2 na ovoimplantação em ratas

Grupos	n	Nº de ovoimplantações		Nº de corpos lúteos	
		Média	EPM	Média	EPM
Controle	19	10,3	0,6	9,8	0,67
Indometacina (2 mg/kg,vo;2xdia)	9	9,5	0,97	10,3	0,62
Nimesulide (5 mg/kg,vo)	11	6,6*	1,3	8,4	0,74
Meloxicam (3 mg/kg,vo)	10	6,8*	1,3	9	0,49
Nabumetona (20 mg/kg,vo)	10	10,8	0,5	11,1	0,48

n = nº de animais/grupo; *p<0,05 versus controle; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels.

ANEXO 20 - Dados referentes à Figura 23

Efeito de inibidores da ciclooxigenase 1 e 2 na gravidez na rata

Grupos	n	Nº de fetos vivos/ninhada		Nº de reabsorções/ninhada	
		Média	EPM	Média	EPM
Controle	10	10,1	0,5	1	0,37
Indometacina (2 mg/kg,v.o.)	10	5,3*	1,4	4,88***	1,4
Nimesulide (5 mg/kg,v.o.)	10	5,9*	1,3	0,8	0,47
Meloxicam (3 mg/kg,v.o.)	10	5,6*	1,0	0,9	0,48
Nabumetona (20 mg/kg,v.o.)	10	8,6	1,5	1,5	0,43

n = nº de animais/grupo; *p<0,05 e ***p<0,001; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels versus controle.

ANEXO 21 - Dados referentes à Figura 25

Efeito da indução da gravidez na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite

Grupos	n	Dias após a injeção de ACF									
		Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 28		Dia 35	
		Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Controle-artrite	24	32	10	118	26	333	79	128	26	126	24
Gravidez + artrite	31	55	11	87	16	*** 157	34	94	31	71	20

n = nº de animais/grupo; ***p<0,001 versus controle artrite; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels. Os valores tabulados representam o volume da pata contralateral nos dias 7,14,21, 28 ou 35 após ACF menos o volume da pata no dia da injeção de ACF, e foram

expressos em μL , exceto “n”. Controle-artrite e Gravidez+artrite (salina 154 mM) durante 35 dias. A gravidez foi induzida após acasalamento com machos férteis do 10º ao 15º dia após ACF.

ANEXO 22 - Dados referentes à Figura 26

Efeito do EPH e da indometacina na lesão inflamatória secundária em ratas com artrite

Grupos	n	Dias após a injeção de ACF									
		Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 28		Dia 35	
		Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Controle-artrite	20	29	10	125	30	351	89	142	28	126	26
Artrite +EPH	8	59	18	30	17	*** 151	26	181	38	200	21
Artrite + INDO	8	101	26	128	34	*** 148	29	120	36	102	31

n = nº de animais/grupo; ***p<0,001 versus controle-artrite; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels. Os valores tabulados representam o volume da pata contralateral nos dias 7,14,21, 28 ou 35 após ACF menos o volume da pata no dia da injeção de ACF, e foram expressos em μL , exceto “n”. Controle-artrite (salina 154 mM), Artrite+EPH (2 mg/kg,v.o) e Artrite+INDO (indometacina 2 mg/kg,v.o) 1º ao 35º dia após ACF.

ANEXO 23 - Dados referentes à Figura 27

Efeito da gravidez e do EPH no ganho de peso corporal em ratas com artrite

Grupos	n	Dias após a injeção de ACF							
		Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 28	
		Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Controle-normal	8	19,7	3,7	29,8	2,96	31	3,79	31,3	3,89
Controle-artrite	44	-1,2 ^a	0,6	-1,4 ^a	1,2	4 ^a	1,59	8,3 ^a	1,86
Artrite + gravidez	32	-5,1 ^a	0,98	-5,9 ^a	2,3	-6 ^a	3	5,4 ^a	2,8
Artrite +INDO	8	6,9 ^a	1,4	1,2 ^a	4,9	7 ^a	1,9	2,8 ^a	1,1
Artrite +EPH	8	5,1 ^a	1,7	24,6 ^a	3,9	36,9 ^b	5,7	46,5 ^{a,b}	5,5

n = nº de animais/grupo; ***p<0,001 versus controle-normal; ANOVA e teste de Student-Newman-Kuels. Valores tabulados representam o ganho de peso corporal semanal cumulativo e encontram-se expressos em gramas, exceto “n”. Controle-normal e Controle-artrite (salina 154 mM), Artrite+EPH (2 mg/kg,v.o) e Artrite+INDO (indometacina 2 mg/kg,v.o) 1º ao 35º dia após ACF. A gravidez foi induzida após acasalamento com machos férteis do 10º ao 15º dia após ACF.