



Universidade Federal do Ceará
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**Efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos do fitol, um
ativador de NADPH oxidase, e tadalafil, um inibidor de 5-
fosfodiesterase, em modelos experimentais**

Orientador: Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

Aluna: Ana Caroline Rocha de Melo Leite

Fortaleza-Ceará
2010



Universidade Federal do Ceará
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**Efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos do fitol, um
ativador de NADPH oxidase, e tadalafil, um inibidor de 5-
fosfodiesterase, em modelos experimentais**

Ana Caroline Rocha de Melo Leite

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

Fortaleza-Ceará
2010

L555e Leite, Ana Caroline Rocha de Melo

Efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos do fitol, um ativador de NADPH oxidase, e tadalafil, um inibidor de 5-fosfodiesterase, em modelos experimentais/ Ana Caroline Rocha de Melo Leite. – Fortaleza, 2010.

119 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha
Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, Ceará.

1. Fitol. 2. Inibidores de Fosfodiesterase. 3. Saccharomyces cerevisiae . 4. Artrite. 5. Osteoartrite. 6. NADPH Oxidase. I. Rocha, Francisco Airton Castro da (orient.). II. Título.

CDD: 615.1

Universidade Federal do Ceará
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Título do trabalho: Efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos do fitol, um ativador de NADPH oxidase, e tadalafil, um inibidor de 5-fosfodiesterase, em modelos experimentais

Autora: Ana Caroline Rocha de Melo Leite

Defesa em 23 de julho de 2010.

Conceito: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha
Orientador (UFC)

Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro
Examinadora (UFC)

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Examinador (UECE)

Profa. Dra. Maria José Pereira Vilar
Examinadora (UFRN)

Prof. Dr. Francisco Saraiva da Silva Júnior
Examinador (UFC)

A cada um que contribuiu direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, especialmente à minha família, tia Conceição, meu orientador e amigos do Laboratório de Investigação em Osteoartropatias – LIO – UFC.

AGRADECIMENTOS

A Deus, ser que na sua imensa divindade se torna humilde para compreender a condição humana.

Aos meus pais, Ilmar e Melo, pelo imensurável apoio, constante incentivo e imensa colaboração na formação da minha pessoa.

Ao meu irmão, Júnior, pelo exemplo de inteligência e eterna disponibilidade.

A minha irmã Karine, pelo imenso companheirismo, inquestionável auxílio e exemplo de dedicação à docência e pesquisa.

A minha avó (*in memoriam*), Anazélia, incentivadora constante e pessoa inesquecível.

As queridas Lillian Glory Ferreira e Karol Monteiro Mota, pela constante presença e inquestionável apoio nos inúmeros momentos da vida.

As minhas cadelinhas Pituka e Sade, aos gatinhos Naninho e Jacobino, por me fazerem compreender o verdadeiro sentido da fidelidade e a grandiosidade da natureza. A Bolinha, Black e Yoko, que me ensinaram a perceber a fragilidade humana e colaboraram na minha formação nos anos de convivência.

A minha tia Maria da Conceição Pitombeira Cavalcante e a minha prima Maria da Conceição Cavalcante da Costa, por serem pessoas extremamente especiais e dedicadas ao ser humano.

Ao meu orientador, Dr. Francisco Airton Castro da Rocha, pelo exemplo insuperável de pesquisador, constante incentivador e mestre no entendimento da vida.

As minhas amigas, Virgínia Cláudia Carneiro Girão e Mirna Marques Bezerra, pela sincera amizade, constante presença e exemplo de conhecimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos do LIO: Natália Gomes dos Santos, Rondinelle Ribeiro Castro, Francisco Saraiva da Silva Júnior, Tânia Valeska Medeiros Dantas, Antônia Célia Castro Alcântara,

Geisa Maria Evangelista Leal, Lucas de Ponte Melo, Rodolfo de Melo Nunes, Fernando Alencar, Patrícia Maria Miranda Gadelha, Isabele de Sá Silveira Melo, Francisco de Assis Alves Teixeira Junior, Livia Barros, Thomaz Correa de Oliveira e Francsico André Macedo, pelo imenso apoio e aprendizado.

A infinita amiga e irmã Isabelle de Oliveira Mendes e tia Verene, pela inquestionável amizade, fé inabalável e exemplo de superação.

A querida amiga Maria Zufla Taumaturgo de Oliveira, pelo imenso carinho, presença constante e inquestionáveis conselhos.

Aos amigos de pós-graduação: Marjorie Moreira Guedes, Paulo Roberto Santos, Eunice Bobo Carvalho e Zirlane Castelo Branco Coelho, pelos momentos de aprendizado pessoal e científico e imensa disponibilidade.

As companheiras e grandes amigas do Centro de Pesquisas Clínicas do HUWC, Thais Helena Ferreira Paiva e Maria Eugênia Barroso Severiano, pela indiscutível força na execução desse trabalho e imenso companheirismo.

Ao laboratório de Micologia Médica da UFC, especialmente ao Dr. Júlio Sidrim, Rossana Aguiar e Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pela imensa disponibilidade, carinho e respeito.

A Dra. Margarida Pompeu, pela sua humildade, inquestionável capacidade e imensa gentileza.

A Dra. Lília Maria Carneiro Câmara, pelas importantes considerações e constante disponibilidade.

Aos professores, por terem compartilhado seus conhecimentos e pela colaboração na minha formação científica.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, especialmente às secretárias Ivone Mary Fontenelle de Sousa e Rita de Cássia de Almeida.

Aos profissionais da Biomedicina, José Amadeus Souza, Michelle e Aldenora, pela eterna colaboração.

A Dra. Maria José Araujo Gomes Cerqueira, Dra. Elizabeth de Francesco Daher e Dr. Ricardo Pereira Silva, pelo constante incentivo, inquestionável auxílio e imensa compreensão.

As monitoras Roberta Masiero e Tânia Azevedo, pelo enorme prazer da convivência e indiscutível ajuda. A monitora Ana Tavela, pela meiguice em todas as suas ações e, as monitoras Margarete Manni e Marcella F. V. Midea, pela confiança.

Ao Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, especialmente a Marlene Nogueira Lima, pela gentileza na doação dos animais para a execução desse trabalho.

A CAPES, CNPq e FUNCAP, por terem confiado plenamente na realização desse projeto e terem concedido financiamento para a execução desse trabalho.

RESUMO

Espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) promovem destruição tecidual em doenças inflamatórias, como artrite reumatoide. Entretanto, agentes ativadores de NADPH oxidase, produtores de EROs, reduzem o processo inflamatório em modelos experimentais. Considerando-se a participação controversa da via NO-GMPc na nocicepção, inibidores de 5-fosfodiesterase têm papel contraditório em modelos de dor. Nesse trabalho, investigou-se o efeito do fitol, um ativador de NADPH oxidase, e tadalafil, um inibidor de 5-fosfodiesterase, em modelos de artrite induzida por zymosan (AZy) e peritonite induzida por Zy, bem como em osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) e contorção abdominal por ácido acético. Na AZy, ratos e camundongos receberam 1 mg e 100 µg de Zy intra-articular (i.art.), respectivamente. Na peritonite ou contorção, camundongos receberam 100 µg de Zy ou ácido acético intraperitoneal (i.p.), respectivamente. Na osteoartrite, ratos foram submetidos à TLCA. Ratos receberam fitol subcutâneo (s.c.) 30 min – 8 d antes da AZy ou tadalafil via oral (v.o.) 2 h após Zy. Outros ratos receberam SIN-1 (i.art.), ODQ (i.art.) ou naloxona (i.p.) 1,5 – 2 h após Zy. Camundongos receberam fitol s.c. 1 – 24 h antes do Zy i.art.. Outros camundongos receberam fitol i.art. 1 h antes ou 1,5 h após Zy. Na peritonite ou contorção, fitol s.c. foi injetado 30 min – 24 h antes do Zy ou ácido acético, respectivamente. Na osteoartrite, foi feita a administração de fitol s.c. 5 d antes e 35 d depois da TLCA ou de tadalafil v.o do 4 – 7 d após TLCA. Grupos controles receberam Zy i.art. ou i.p. ou ácido acético ou foram submetidos à TLCA. A hipernocicepção foi avaliada pelo teste de incapacitação articular, registrada como tempo de suspensão da pata – TSP. O influxo celular (IC) foi quantificado no lavado articular, após 6 h ou 7 d da AZy e, no lavado peritoneal, após 4 h da peritonite. NO, IL-1, TNF- α , IL-10 e CINC-1 foram medidos no sobrenadante articular agudo em ratos, enquanto os glicosaminoglicanos (GAGs) da cartilagem foram quantificados após 7 d da AZy em ratos. Resultados foram expressos como média \pm e.p.m., submetidos à ANOVA e teste de Tukey ou ao teste t de Student ($P < 0,05$). Na contorção, dados foram expressos em mediana e submetidos ao teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Na AZy, a administração sistêmica (s.c.) e profilática de fitol diminuiu IC agudo, independente da dose e tempo de administração, em camundongos. A injeção local (i.art.) profilática ou terapêutica de fitol diminuiu de forma significativa IC em camundongos submetidos à AZy. Semelhante à fase aguda, fitol reduziu significativamente IC crônico. Na AZy em ratos, fitol diminuiu IC agudo e crônico, bem como TSP. Quanto aos GAGs, houve aumento significativo pelo fitol, atingindo nível semelhante ao dos animais *naive*. Na peritonite ou contorção, fitol reduziu IC ou número de contorções, respectivamente, independente do tempo de administração. Na osteoartrite, fitol reduziu significativamente TSP nos dias 1, 7, 9 e 11, bem como no pico entre 4º e 7º d após TLCA. NO, IL-1, TNF- α e IL-10 também foram reduzidos na AZy. Quanto ao tadalafil, houve diminuição do IC agudo e TSP, de forma dose-dependente, na AZy em ratos. ODQ, administrado previamente ao tadalafil, reverteu o efeito do tadalafil sobre IC e TSP na AZy, o que não ocorreu com a injeção prévia de naloxona. Tadalafil reduziu TNF- α e IL-10 na AZy e o TSP na osteoartrite. Os resultados mostram que fitol promove efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos independente da espécie, estímulo, tecido e via de administração. Essas ações se associam à redução na liberação local de NO e citocinas. Paralelamente, tadalafil tem efeito antiinflamatório e antinociceptivo similar, associado ao bloqueio na liberação local de TNF. Esses achados sugerem que ativadores de NADPH oxidase, possivelmente a partir de compostos da dieta, modifiquem a história natural de artropatias inflamatórias. O efeito antinociceptivo de inibidores de 5-fosfodiesterase deve ser explorado, uma vez que esses compostos encontram progressiva indicação em patologias inflamatórias que cursam com dano vascular e hipóxia.

Palavras-chave: Fitol, tadalafil, zymosan, artrite e osteoartrite.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNS) promote tissue destruction in inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis. However, agents that activate ROS production by NADPH oxidase reduce inflammation in experimental models. Considering the controversial participation of via NO-cGMP in nociception, inhibitors of phosphodiesterase-5 have controversial role in models of pain. In this study, it was investigated the effect of phytol, an activating of NADPH oxidase, and tadalafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, in models of zymosan-induced arthritis (ZyA) and Zy-induced peritonitis as well as osteoarthritis by anterior cruciate ligament transection (ACLT) and acetic acid writhing. In ZyA, rats and mice received 1 mg and 100 µg zymosan intra-articular (i.art.), respectively. In peritonitis or writhing, mice received 100 µg of Zy or acetic acid intraperitoneal (i.p.), respectively. In osteoarthritis, rats underwent ACLT. Rats received phytol subcutaneous (s.c) 30 min – 8 d before ZyA or tadalafil orally (p.o.) 2 h after Zy. Other rats received SIN-1 (i.art.), ODQ (i.art.) or naloxone (i.p.) 1.5 – 2 h after Zy. Mice received phytol s.c. 1 – 24 h before Zy i.art.. Other mice received phytol i.art. 1 h before or 1.5 h after Zy. In peritonitis or writhing, phytol s.c. was injected 30 min – 24 h before Zy or acetic acid, respectively. In osteoarthritis, it was done one s.c. phytol administration 5 d before and 35 d after ACLT or tadalafil p.o. from 4 – 7 d after ACLT. Control groups received Zy i.art. or i.p. or acetic acid or were submitted to ACLT. The hypernociception was assessed by articular incapacitation test recorded as paw elevation time - PET. Cell influx (CI) was quantified in joint lavage after 6 h or 7 d of ZyA and in peritoneal lavage after 4 h of peritonitis. NO, IL-1, TNF- α , IL-10 and CINC-1 were measured in acute articular supernatant in rats while cartilage glycosaminoglycans (GAGs) were quantified after 7 d of ZyA in rats. Results were expressed as mean \pm SEM, submitted to ANOVA and Tukey test or to Student's t test ($P < 0.05$). In writhing, data were expressed as median and submitted to the Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$). In ZyA, systemic (s.c.) and prophylactic administration of phytol decreased acute CI, independent of dose and time of administration, in mice. Local (i.art.) prophylactic or therapy injection of phytol decreased significantly CI in mice submitted to ZyA. Similar to the acute phase, phytol reduced significantly chronic CI. In ZyA in rats, phytol decreased acute and chronic CI as well as PET. As to GAGs, there was significant increase by phytol, reaching a level similar to *naive* animals. In peritonitis or writhing, phytol decreased CI or number of writhing, respectively, regardless of administration time. In osteoarthritis, phytol decreased significantly PET on days 1, 7, 9 and 11 as well as the peak between 4th and 7th d after ACLT. NO, IL-1, TNF- α and IL-10 were reduced in ZyA too. As tadalafil, there was decreased acute IC and PET, in a dose-dependent, in ZyA in rats. ODQ, administered prior tadalafil, reversed tadalafil effect about CI and PET in ZyA, that didn't happen with a prior injection of naloxone. Tadalafil reduced TNF- α and IL-10 in ZyA and PET in osteoarthritis. The results show that phytol promotes anti-inflammatory and antinociceptive effects species, stimulus, tissue and route of administration independent. These actions are associate with the local release of NO and cytokines. In parallel, tadalafil has similar anti-inflammatory and antinociceptive effects associated with the lock on the local release of TNF. These findings suggest that activators of NADPH oxidase, possibly from compounds in the diet, modify the natural history of inflammatory arthropathy. The antinociceptive effect of phosphodiesterase-5 inhibitors should be explored, since these compounds are progressive indication in inflammatory diseases that occur with vascular damage and hypoxia.

Key-words: Phytol, tadalafil, zymosan, arthritis and osteoarthritis.

SUMÁRIO

Lista de figuras	13
Lista de abreviaturas	14
1. Introdução	16
1.1. Artrite reumatoide (AR)	16
1.2. Modelos experimentais de artrite	19
1.2.1. Modelo de artrite induzida por zymosan (AZy)	21
1.3. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs)	23
1.4. Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase)	26
1.5. Oxidação na artrite	27
1.6. Sistemas de defesa antioxidantes	29
1.7. Fitol	30
1.8. Inibidores de 5-fosfodiesterase	34
1.9. Osteoartrite	36
2. Justificativa	38
3. Objetivos	39
3.1. Objetivo geral	39
3.2. Objetivos específicos	39
4. Materiais e Métodos	40
4.1. Animais	40
4.2. Drogas utilizadas	40
4.3. Indução da artrite por zymosan (AZy)	40
4.4. Administração do fitol e tadalafil na artrite por zymosan (AZy)	40
4.5. Indução da osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA)	41
4.6. Administração do fitol e tadalafil na osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA)	42
4.7. Indução da peritonite por zymosan e administração do fitol	42
4.8. Contorção abdominal por ácido acético e administração do fitol	42
4.9. Análise do influxo celular	43
4.10. Incapacitação articular	43
4.11. Determinação da produção de NO	43
4.12. Quantificação e identificação de glicosaminoglicanos (GAGs) na	44

cartilagem articular	
4.13. Determinação dos níveis de IL-1β, TNF-α, IL-10 e CINC-1	44
4.14. Análise estatística	45
5. Resultados	46
5.1. Efeito do fitol sobre o influxo celular (IC) agudo na artrite por zymosan (AZy)	46
5.2. Efeito do fitol sobre a hipernocicepção articular e influxo celular (IC) agudo na AZy em ratos	48
5.3. Efeito do fitol sobre o influxo celular (IC) crônico na AZy	49
5.4. Efeito do fitol sobre o influxo celular (IC) agudo na peritonite por zymosan	50
5.5. Efeito do fitol sobre a hipernocicepção no modelo de contorções abdominais	51
5.6. Efeito do fitol sobre a lesão da cartilagem articular na AZy	52
5.7. Efeito do fitol sobre a hipernocicepção articular na osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA)	53
5.8. Efeito do fitol sobre a liberação de mediadores inflamatórios na AZy em ratos	54
5.9. Efeito do tadalafil sobre a hipernocicepção articular e influxo celular (IC) agudo na Azy	56
5.10. Efeito do tadalafil, SIN-1, ODQ e naloxona sobre a hipernocicepção articular e influxo celular (IC) agudo na AZy	57
5.11. Efeito do tadalafil sobre a hipernocicepção articular na osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA)	59
5.12. Efeito do tadalafil sobre a liberação de mediadores inflamatórios na AZy em ratos	60
6. Discussão	61
7. Conclusões	69
Referências bibliográficas	70
Publicações	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do complexo NADPH oxidase e a reação por ele catalisada de produção de O_2^- a partir de NADPH e O_2 . 1- gp91 ^{phox} ; 2- p22 ^{phox} ; 3- p47 ^{phox} ; 4- p67 ^{phox} ; 5- p40 ^{phox} e 6- Rac 2	26
Figura 2 – Estrutura da clorofila (A) e do fitol (B). No canto inferior esquerdo, posicionamento do Fitol como cadeia lateral na molécula de clorofila	31
Figura 3 – Vias de degradação do fitol a ácido fitânico. No lado esquerdo, esquema da via de degradação proposta para mamíferos. No lado direito, esquema da via de degradação para ruminantes	33
Figura 4- Efeito do fitol sobre o IC agudo na AZy em camundongos	47
Figura 5- Efeito do fitol sobre a hipernocicepção e IC agudo na AZy em ratos	48
Figura 6- Efeito do fitol sobre o IC crônico na AZy	49
Figura 7- Efeito do fitol sobre o IC agudo na peritonite por zymosan	50
Figura 8- Efeito do fitol sobre a hipernocicepção no modelo de contorções abdominais por ácido acético	51
Figura 9- Efeito do fitol sobre a lesão da cartilagem articular na AZy	52
Figura 10- Efeito do fitol sobre a hipernocicepção na osteoartrite por TLCA	53
Figura 11- Efeito do fitol sobre a liberação de mediadores inflamatórios na AZy	55
Figura 12- Efeito do tadalafil sobre a hipernocicepção e IC agudo na AZy	56
Figura 13- Efeito do tadalafil, SIN-1, ODQ e naloxona sobre a hipernocicepção e influxo celular (IC) agudo na AZy	58
Figura 14- Efeito do tadalafil sobre a hipernocicepção na osteoartrite por TLCA	59
Figura 15- Efeito do tadalafil sobre a liberação de mediadores inflamatórios na AZy	60

LISTA DE ABREVIATURAS

Ácido fitânico	Ácido 3,7,11,15-tetrametilhexadecanoico
Ácido pristânico	Ácido 2,6,10,14- tetrametilpentadecanoico
ADA	Adenosina desaminase
AINEs	Antiinflamatórios não-esteroidais
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância univariada
AR	Artrite reumatoide
AVC	Acidente vascular cerebral
AZy	Artrite induzida por zymosan
BeST	<i>Behandel Strategieën</i>
CEPA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CEUA	Comitê de Ética para Uso de Animais
CINC-1	Quimioatraente neutrofílico -1
COMP	Proteína oligomérica da matriz da cartilagem
COX	Cicloxygenase
d	Dia
DAS	<i>Disease Activity Score</i>
DMARDs	Drogas antireumáticas modificadoras da doença
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidade ótica
e.p.m	Erro padrão da média
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FALDH	Aldeído desidrogenase
Fe ²⁺	Íon ferroso
Fitol	3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol
G6PI	Glicose-6-fosfato isomerase
GAG	Glicosaminoglicano
GMPc	Guanidina monofosfato cíclico
GSH	Glutationa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HAQ	<i>Health Assessment Questionnaire</i>
HCl	Ácido clorídrico
HIF-1 α	Fator induzível por hipóxia-1 α
HOCl	Ácido hipocloroso
i.art	Intra-articular
i.p.	Intraperitoneal
IA	Incapacitação articular
IC	Influxo celular
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LCA	Ligamento cruzado anterior
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MMP	Metaloproteinase

NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
Ncf1	Fator citosólico neutrofílico 1
NF-κB	Fator nuclear kappa-B
Nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻	Nitrito/Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Superóxido
°C	Graus Celsius
ODQ	1H- [1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-ona
OH ⁻	Hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PG	Prostaglandina
PMA	13-acetato 12-miristato de forbol
PPAR-α	Receptor ativado por proliferador peroxissomal
r.p.m.	Rotação por minuto
s.c.	Subcutâneo
seg	Segundo
SIN-1	3-morfolinosidnonimina
SOD	Superóxido dismutase
TLCA	Transecção do ligamento cruzado anterior
TLR 2	<i>Receptor toll-like 2</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSP	Tempo de suspensão da pata
v.o.	Via oral
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
w/v	Peso/volume
Zy	Zymosan
α	Alfa
β	Beta

1. Introdução

1.1. Artrite reumatoide (AR)

A artrite reumatoide (AR) é a mais frequente artropatia inflamatória crônica e sua prevalência é estimada entre 0,5 - 1% da população mundial, dependendo do grupo populacional estudado. Iniciada em qualquer idade, a AR ocorre frequentemente entre 40 e 50 anos, aumentando com o decorrer da idade, e acometendo particularmente o sexo feminino. Seu curso clínico pode se estender de algumas semanas a meses de desconforto até anos de incapacitação. Seu diagnóstico inicial pode ser confundido com outras doenças como lúpus, artrite psoriática e espondilite (HOCHBERG et al., 2003). Apesar de sua etiologia desconhecida, admiti-se a participação de fatores genéticos, ambientais e imunológicos.

Considerada como uma doença inflamatória sistêmica, a AR se manifesta predominantemente na membrana sinovial das articulações diartrodiais. Seus sintomas mais comuns compreendem o edema e dor articular simétrica e difusa nas pequenas articulações periféricas, associados à rigidez matinal de duração variável. Com o desenvolvimento da doença, o processo inflamatório crônico induz mudanças na composição celular e expressão gênica dos sinoviócitos, promovendo hiperplasia dos fibroblastos sinoviais e dano à cartilagem, osso e ligamentos (KLIPPEL et al., 2001). Na AR, a lise da cartilagem articular e a erosão do osso subcondral parecem ser os fenômenos mais precoces responsáveis pelas deformidades articulares e incapacitação funcional.

As mudanças histopatológicas na AR não são específicas da doença e dependem do órgão envolvido. Na articulação, a lesão inflamatória primária envolve a sinóvia, com vasculite de pequenos vasos e necrose fibrinoide, edema, exsudação de fibrina, hiperplasia da camada íntima sinovial e migração de células polimorfonucleares. A infiltração e proliferação local de linfócitos T e B, além de macrófagos, leva à formação do *pannus*. Essa estrutura é o tecido inflamatório sinovial com propriedades invasivas, comportando-se como se fora um tecido neoplásico. Essas células inflamatórias ativadas localmente liberam citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), bem como autacoides como eicosanoides, particularmente prostaglandinas e leucotrienos. A partir de neutrófilos e macrófagos, ocorre também aumento na liberação de mediadores como o óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs). Além do potencial lesivo tecidual que essas espécies apresentam, a ativação de fibroblastos sinoviais aumenta a produção de metaloproteinases, promovendo a destruição da cartilagem e lise do osso subcondral. Uma vez que ligamentos e tendões se encontram na proximidade desse

pannus, ocorre lesão a esses tecidos, resultando em posterior deformidade articular, traduzida por incapacitação. Ainda, embora períodos amenos ocorram nessa reação inflamatória, dado o caráter flutuante de sua ativação, há mecanismos de reparação nesse processo. Entretanto, esse *pannus* é substituído por tecido fibroso cicatricial, sem restauração da função, uma vez que são destruídas estruturas periarticulares, como ligamentos e tendões (SWEENEY & FIRESTEIN, 2004; LEE & WEINBLATT, 2001).

Muito progresso tem havido no tratamento da AR, particularmente a partir dos anos 90. Em geral, sua terapia envolve o uso de antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) e glicocorticoides orais ou intra-articulares; drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (DMARDs - *disease modifying antirheumatic drugs*) e os biológicos modificadores da resposta (MAJITHIA & GERACI, 2007). Embora não se possa dizer que haja cura, o uso de DMARDs pode alterar significativamente a evolução da AR, induzindo remissão clínica e interrupção da progressão do dano radiológico articular.

AINEs são efetivos no tratamento da dor, edema e rigidez articulares, mas ineficazes sobre o curso da doença. De forma semelhante, corticosteroides são normalmente utilizados para o alívio sintomático em AR (MAJITHIA & GERACI, 2007). Entretanto, além de potentes supressores da inflamação, pela inibição de fosfolipase A2 e consequente redução na liberação de eicosanoides, corticosteroides inibem a ativação do fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B), levando à redução na ativação de genes de proteínas de fase aguda e enzimas, como a óxido nítrico sintase indutível (NOSi) e ciclooxigenase 2 (COX2). Corticosteroides bloqueiam ainda a liberação de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF. Esse último mecanismo tem levado à proposição de que, em alguns pacientes, os corticosteroides possam ter efeito modificador de doença.

Um dos exemplos clínicos mais relevantes associados à ação modificadora da doença pelos corticosteroides é o estudo BeST (*Behandel Strategieën* - estratégias de tratamento), em que pacientes com AR inicial foram tratados com dose alta de prednisona (60 mg/d), reduzida rapidamente para 7,5 mg/d ao fim de dois meses, em associação com DMARDs. A maioria dos pacientes desse grupo obteve controle clínico da AR, medido pela redução do escore clínico DAS (*Disease Activity Score*), melhora do índice de qualidade de vida HAQ (*Health Assessment Questionnaire*) e supressão da progressão radiológica pelo índice de Sharp van der Hejde (GOEKOOP-RUITERMAN et al., 2005). No entanto, deve ser ressaltado que, na prática, não se usa essa abordagem devido aos eventos adversos atribuíveis aos corticosteroides, sejam a curto ou a longo prazo.

Contrariamente aos AINEs, DMARDs são utilizadas para o controle da doença e limitação do dano articular. Utilizadas inicialmente de forma empírica e consideradas como um grupo de agentes com atividades biológicas variadas, DMARDs se diferenciam quanto ao mecanismo de ação, indicação e toxicidade. O uso precoce destas medicações se deve ao fato de que as lesões articulares em AR ocorrem prematuramente, antes que sejam demonstráveis clinicamente. De fato, pacientes que fizeram uso precoce de DMARDs tiveram menor progressão do dano radiológico, medido pelo número de erosões e reduções do espaço articular (FURST et al., 2010)

Utilizado de forma crescente pela sua eficácia e tolerabilidade, metotrexato é uma DMARD considerada como uma droga de primeira linha no tratamento da AR e cujo mecanismo de ação não está completamente elucidado. Age por inibir a dihidrofolato redutase, interferindo na síntese de purinas. Tem sido proposta ainda a inibição de adenosina desaminase (ADA) como um importante mecanismo de ação, mas a dificuldade de demonstração clínica impede conclusões a esse respeito. Sua associação às drogas específicas anti-TNF e anti-CD20 é recomendada para se atingir resultados expressivos no controle clínico da AR (FURST et al., 2010)

Surgidos com o avanço na biotecnologia, os biológicos modificadores da resposta são uma nova classe de agentes terapêuticos que têm como alvo subtipos celulares, moléculas de adesão, citocinas e outros. Estes agentes se diferenciam da maioria das drogas anti-reumáticas por serem derivadas ou semelhantes às moléculas efetoras naturais (anticorpos ou receptores de superfície celular solúveis) e atuarem em componentes específicos da resposta imune. Considerados como a última geração de anti-reumáticos, eles incluem anticorpos monoclonais, como antagonistas de TNF- α (etanercepte e infliximabe) e IL-1 (anakinra) e anticorpo anti-CD20 (rituximabe), e pequenas moléculas, como inibidores de citocinas (IL-12/IL-23), quimiocinas (antagonista de CCR5), fatores de transcrição (NF- κ B), dentre outros (MAJITHIA & GERACI, 2007; ŠENOLT et al., 2009).

Considerados como compostos anti-TNF- α , etanercepte e infliximabe são bloqueadores de TNF que apresentam ações antiinflamatórias tanto na AR inicial quanto na já estabelecida. Definido como uma proteína formada pela fusão entre o receptor de TNF- α recombinante humano e a porção Fc da imunoglobulina G1 (IgG1) humana, etanercepte age através da ligação ao TNF circulante, impedindo a interação de TNF- α e β aos seus receptores. O infliximabe é um anticorpo anti-TNF quimérico, que se liga tanto ao TNF solúvel quanto ao de membrana, promovendo citotoxicidade das células expressando TNF. Adalimumabe também é um anticorpo anti-TNF, embora considerado humano, uma vez que

não há sequências de proteína murínica na sua composição. Diferente do etanercepte, infliximabe e adalimumabe não se ligam ao TNF- β (VILLA-FORTE, 2009).

Contra-indicados em pacientes com infecções ativas de qualquer natureza, bloqueadores de TNF têm maior propensão a desencadear infecções por micobactérias e fungos. Clinicamente, dez anos de uso desses compostos modificaram a história natural das artropatias inflamatórias crônicas, particularmente daqueles pacientes mais graves. Esses agentes podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com o metotrexato, tendo maior eficácia nessa última situação (VAN DE PUTTE et al., 2004; KEYSTONE et al., 2004). No caso da AR, normalmente se recomenda seu uso, em associação a uma DMARD, em geral o metotrexato, quando da falha a pelo menos 2 DMARDs prévias (FURST et al., 2010).

Ainda, estudos pré-clínicos e clínicos estão sendo realizados com pequenas moléculas biológicas, que atuam em fatores intercelulares ou estruturas celulares (receptores, vias de sinalização intracelular e enzimas), na tentativa de se obter terapias mais eficazes, acessíveis e com reduzido risco de eventos adversos (STANCZYK et al., 2008).

1.2. Modelos experimentais de artrite

Vários modelos foram descritos no intuito de induzir artrite em animais, tentando-se reproduzir achados da AR. A rigor, um modelo ideal de artrite deveria preencher os seguintes requisitos: ter achados clínicos, radiológicos e histopatológicos semelhantes aos observados na AR; apresentar mínimas alterações de “artrite não-reumatoide”; ser de fácil indução, baixo custo, boa reprodutibilidade, utilizando animal de fácil acesso; ter confiabilidade quanto ao início, incidência e avaliação da gravidade das alterações; responder a agentes terapêuticos de forma semelhante ao observado na AR; ter parâmetros de alterações imunológicas e de atividade mensuráveis (OLIVER & BRAHN, 1996). Nenhum dos modelos atualmente disponíveis satisfaz plenamente todas essas condições, embora todos se aproximem razoavelmente do objetivo pretendido.

A artrite induzida por adjuvante consiste na injeção intradérmica de adjuvante completo de Freund, em ratos susceptíveis. Entre 14 e 21 dias após a injeção do estímulo, os animais desenvolvem artrite generalizada e uma resposta sistêmica, podendo envolver inclusive a cartilagem das orelhas. O aspecto histológico lembra a sinovite reumatoide humana, encontrando-se hiperplasia sinovial, infiltrado linfomononuclear, neoformação vascular e, em fases posteriores, lise da cartilagem articular e reabsorção óssea. A invasão da cartilagem e do espaço subcondral assemelha-se ao *pannus* reumatoide. Uma desvantagem,

entretanto, é a segregação em cepas de ratos e a dificuldade em se precisar o início da artrite (CHANG et al., 1980)

A artrite induzida por colágeno tipo II foi classicamente estabelecida utilizando-se camundongos, mas também pode ocorrer em ratos e primatas. Além de reproduzir achados histológicos e evolutivos da AR humana, esse modelo apresenta a vantagem de utilizar camundongos, que vêm sendo empregados em técnicas de biologia molecular, permitindo modificações genéticas. Uma aparente vantagem desse modelo é a especificidade para o colágeno tipo II, admitindo-se ser essa proteína um auto-antígeno importante no desencadeamento do processo inflamatório crônico. Entretanto, a segregação por cepa de camundongo e indefinição do colágeno como um auto-antígeno relevante na fisiopatologia da AR são limitações desse modelo experimental (HEYMER, 1982; BRAHN, 1991).

Outros modelos também têm sido empregados, como a artrite induzida por proteoglicanos, pristano (óleo mineral) e antígeno, que consiste em uma reação intra-articular à injeção de um antígeno (como ovalbumina metilada) ao qual o animal é previamente sensibilizado (DUMONDE & GLYNN, 1962), além dos modelos empregando agentes infecciosos (como *Mycoplasma* e parede de estreptococos). Em comum, os modelos apresentam a similaridade histológica com a sinovite da AR humana, mecanismos imunológicos na sua fisiopatologia, além de resposta terapêutica similar à observada na AR.

Por último, vale destacar que manipulações genéticas, gerando animais transgênicos ou *knock-out*, vieram agregar uma nova ferramenta aos modelos animais, permitindo avaliar o papel de genes individuais na fisiopatologia da AR, homeostasia e desenvolvimento de auto-imunidade, bem como de citocinas envolvidas na fisiopatologia dessa doença.

Como exemplo dessa estratégia, estudo demonstrou que uma mutação pontual em um único gene, chamado ZAP70, pode desencadear artrite crônica autoimune espontânea em uma cepa de camundongos (SAKAGUCHI et al., 2003). Esses animais apresentam substituição de triptofano por cisteína no resíduo 163 (W163C) do domínio carboxi-terminal SH2 do produto do gene ZAP70. Nesses animais, os linfócitos T auto-reativos, que sofreriam seleção negativa no timo durante o desenvolvimento normal, passam a ser selecionados positivamente. Esse tipo de mutação pode estar presente em um pequeno subgrupo de pacientes com AR (SAKAGUCHI et al., 2003), possivelmente com repercussão no desencadeamento ou evolução da doença.

Por outro lado, o ressurgir do interesse na participação de linfócitos B e auto-anticorpos na fisiopatologia da AR é reforçado pelo modelo de artrite espontânea em

camundongos. Animais K/BxN apresentam produção de anticorpos anti-G6PI (glicose-6-fosfato isomerase), que seriam “artritogênicos”. Tais anticorpos produzem artrite transitória, quando administrados (passivamente) a camundongos normais. O fato de que anticorpos anti-G6PI podem ser detectados no soro de até 64% de pacientes com AR estabelece um possível vínculo entre essa alteração vista em um modelo animal e a doença em humanos (SCHALLER et al., 2001). Ainda, a participação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , cujo bloqueio é alvo da terapêutica mais efetiva atualmente em artropatias inflamatórias, pode ser ilustrada em modelos animais. Camundongos transgênicos expressando excesso de TNF- α , como a linhagem Tg197, desenvolvem artrite crônica semelhante à AR e melhoram com a administração de anticorpos monoclonais anti-TNF α (KEFFER et al., 1991).

1.2.1. Modelo de artrite induzida por zymosan (AZy)

O zymosan é um polissacarídeo derivado do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, cuja administração em tecidos promove intensa reação inflamatória. Originalmente, a artrite induzida por zymosan (AZy) foi descrita por Keystone, em 1977. A injeção intra-articular de zymosan promove sinovite erosiva grave. Na fase aguda, ocorre aumento de permeabilidade vascular e migração celular. A seguir, desenvolve-se sinovite com infiltrado mononuclear e reação fibroblástica, lembrando a sinovite crônica, que caracteriza o *pannus* reumatoide.

Estudando a fase crônica do modelo, nosso grupo de pesquisa mostrou que, até 28 dias após a injeção do zymosan, a sinovite persiste, havendo formação de células gigantes, ao lado de intensa proliferação linfomonocitária na sinóvia. As células gigantes podem ser observadas a partir dos 14 dias de artrite e a extensão da sinovite lembra o *pannus* reumatoide, levando à lise da cartilagem articular e erosão do osso subcondral (ROCHA et al., 1999).

Inicialmente, a inflamação associada à injeção do zymosan foi atribuída à ativação do complemento e liberação de enzimas lisossomais, a partir de células inflamatórias migradas para o local. Estudo recente, utilizando camundongos *knock-out* para o receptor *toll-like 2* (TLR2 - *type II toll-like receptor*), demonstrou que houve redução significativa da sinovite, quando comparada a animais normais (FRASNELLI et al., 2005). Esse resultado sugere um importante componente da imunidade inata participando na fisiopatologia da AZy.

Empregando o modelo de AZy, nosso grupo de pesquisa padronizou o estudo da hipernocicepção na fase aguda e quantificação da lesão da cartilagem articular, através da determinação da perda de glicosaminoglicanos (GAGs) da matriz, à medida que a artrite

prossegue. Foi demonstrada ainda a associação entre a incapacitação articular (IA), definida como a inabilidade de um animal (rato) deambular depois de submetido à injeção intra-articular de um agente inflamatório, e a ativação de nociceptores localizados em estruturas periarticulares e não na sinóvia *per se*. Essa IA (hipernocicepção) se associou diretamente à migração neutrofílica à cavidade articular, sendo essa migração máxima na sexta hora após a injeção do estímulo (ROCHA et al., 1999).

Esse fato foi corroborado pela abolição da IA, quando se bloqueou a migração de neutrófilos, quer usando agentes inibidores da quimiotaxia dessas células, como o inibidor da síntese de leucotrieno B₄, o MK866 (ROCHA et al., 2004), quer quando se induziu neutropenia nos animais através da administração de um anticorpo anti-neutrófilos (BEZERRA et al., 2007). Ainda nesse modelo, foi demonstrado que o edema sinovial ou a presença de derrame articular *per se* não parecem ser responsáveis pela hipernocicepção (ROCHA et al., 1999).

Considerando o caráter multifatorial da modulação da dor, foi evidenciado que citocinas pró-inflamatórias estão associadas à hiperalgesia, ao passo que citocinas ditas anti-inflamatórias, associadas com resposta do tipo Th2, promovem anti-nocicepção na AZy. De fato, a administração de antisoro anti-IL-4, IL-10 ou IL-13 a animais submetidos à AZy promoveu aumento da hipernocicepção, ao passo que a administração de IL-4, IL-10 ou IL-13 inibiu esse fenômeno (VALE et al., 2004).

Através da modulação farmacológica, foi demonstrado que inibidores da NOS promovem analgesia apenas quando administrados antes da injeção do zymosan (profilaticamente). Quando a administração desses compostos é feita após a indução da artrite (terapeuticamente), os compostos não são efetivos em inibir a hipernocicepção. Esse resultado foi obtido tanto quando se fez a administração dos compostos de forma sistêmica, quanto intra-articular. Entretanto, doadores de NO, injetados de forma terapêutica, promovem inibição significativa da hipernocicepção (BEZERRA et al., 2004). Os dados apontam para o potencial analgésico de doadores de NO em artrites. De fato, o papel do óxido nítrico (NO) nos mecanismos de dor é controverso, existindo relatos de pró e anti-nocicepção associados a esse mediador.

Na AZy, existe liberação de NO no líquido sinovial, sendo máxima 6 horas após a injeção do zymosan. É interessante salientar que essa liberação está associada ao pico de migração de neutrófilos para a cavidade articular, sugerindo que essas células estão associadas à produção de NO no ambiente articular. Essa elevação dos níveis locais de NO está relacionada ao aumento da expressão da NOSi na sinóvia inflamada, particularmente nos

sinoviócitos e neutrófilos migrados, embora outras células, como as endoteliais e condrócitos, também possam contribuir para essa liberação (BEZERRA et al., 2004; ROCHA et al., 2002).

Nesse modelo, nosso grupo de pesquisa mostrou ainda que a administração de inibidores de NOS, embora reduzisse a migração celular à cavidade articular na fase aguda e o infiltrado inflamatório na sinovite crônica, a quantidade de GAGs da cartilagem articular não era alterada. Ao contrário, os animais tratados com os inibidores de NOS, quer não-seletivos, quer seletivos para a NOSi, apresentaram menor quantidade de GAGs, em relação aos animais submetidos à AZy e tratados apenas com o diluente (ROCHA et al., 2002).

Ainda, a administração do ácido úrico, um *scavenger* de espécies reativas de nitrogênio, como o peroxinitrito (ONOO^-), aos ratos submetidos à AZy promoveu redução significativa do infiltrado celular à sinóvia, na fase crônica, associado à restauração da perda de GAGs da matriz da cartilagem. Esses resultados foram relacionados à elevação dos níveis séricos de ácido úrico nos animais e redução dos níveis de ONOO^- no lavado articular (ROCHA et al., 2002). Em conjunto, os dados demonstram um efeito protetor de *scavengers* de espécies reativas de nitrogênio, como ONOO^- , na lesão tecidual (cartilagem articular) em artrites.

É interessante destacar que a coexistência de gota e artrite reumatoide é muito abaixo do que seria esperado pela prevalência das duas doenças na população geral. Ainda, mulheres praticamente não desenvolvem gota, enquanto homens são menos acometidos de artrite reumatoide. Assim, sugere-se que os níveis endógenos de antioxidantes (como ácido úrico) podem influenciar o desencadeamento e/ou a gravidade de artrites crônicas.

1.3. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs)

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) são definidas como moléculas ou fragmentos moleculares altamente reativos que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados (BETTERIDGE, 2000; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Produzidas pelo metabolismo celular normal, EROs e ERNs parecem ter um papel dual nos sistemas vivos, já que são capazes de exercer efeitos fisiológicos ou fisiopatológicos, a depender em parte da concentração e da espécie gerada (VALKO et al., 2006). Por exemplo, EROs participam do mecanismo de defesa contra agentes infecciosos e sistemas de sinalização celular, sendo nesse último caso, liberados em baixas concentrações e com função em células ou tecidos próximos ao seu sítio de produção (VALKO et al., 2007). Entretanto, no estresse oxidativo, em que há produção excessiva de EROs e ERNs e/ou deficiência dos

sistemas antioxidantes, essas espécies podem reagir com lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA).

A ação de EROs e ERNs sobre os lipídios da membrana, processo conhecido como peroxidação lipídica, leva à perda da integridade estrutural e funcional das membranas celulares e intracelulares, alterando sua fluidez e permeabilidade. Esse processo degradativo promove alterações metabólicas, podendo levar à morte celular. Essas espécies podem provocar ainda a fragmentação, ligação cruzada e agregação proteicas, resultando, por exemplo, em ativação ou inativação enzimática. Quanto ao DNA, a atuação promove alterações estruturais como deleções, inserções, mutações de pares de bases e outras. A alteração permanente do material genético pelo estresse oxidativo representa o passo inicial no desenvolvimento da mutagênese, carcinogênese e envelhecimento. Ainda, o dano ao DNA mitocondrial se associa a muitas doenças humanas e ao processo de envelhecimento (DRÖGE, 2002).

Essas situações de estresse oxidativo ocorrem, por exemplo, em reações inflamatórias intensas e prolongadas, como aquelas observadas em doenças como artropatias inflamatórias e neoplasias, bem como na placa aterosclerótica (WINYARD et al., 2005). Dessa forma, o envolvimento de espécies reativas se dá em uma pletera de patologias, admitindo-se, teoricamente, que o controle de sua formação e ação possa ser utilizado para modulação da resposta inflamatória.

As EROs são radicais livres derivados do oxigênio (O_2) e a principal classe de espécies reativas produzidas nos sistemas vivos (MILLER et al., 1990). A adição de um, dois ou três elétrons à molécula de O_2 forma superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou hidroxila (OH^\cdot), respectivamente (BERGENDI et al., 1999). Considerado como a primeira ERO formada, o O_2^- tem sido associado à patofisiologia de muitas doenças (KOVACIC et al., 2005; VALKO et al., 2004). Sua dismutação pela superóxido dismutase (SOD) produz O_2 e H_2O_2 , impedindo a sua ação em alvos biológicos, como lipídios, catecolaminas e DNA. Sua reação com outras moléculas produz EROs secundárias que contribuem para o seu efeito tóxico (VALKO et al., 2005). O_2^- libera ainda íon ferroso (Fe^{2+}), colaborando para a reação de Fenton e formação de OH^\cdot , o mais reativo e menos seletivo das EROs (LIOCHEV & FRIDOVICH, 1994).

O óxido nítrico (NO) é uma ERN sintetizada pela NOS, na presença de O_2 , L-arginina e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (SONEJA et al., 2005). Age em processos fisiológicos, como neurotransmissão, relaxamento da musculatura lisa vascular

e inibição da agregação plaquetária. Muitas de suas funções fisiológicas são exercidas via guanidina monofosfato cíclico (GMPc), pela sua ligação à enzima guanilato ciclase solúvel. Entretanto, ações como a inibição de enzimas mitocondriais e COX são independentes de GMPc (NATHAN, 1992).

Os efeitos deletérios atribuíveis ao NO têm sido associados à reação com O_2^- e consequente formação de $ONOO^-$, uma potente ERN capaz de reagir com DNA, induzir peroxidação lipídica e inibir a respiração mitocondrial (BOLANOS et al., 1995), levando à apoptose e morte celular. $ONOO^-$ ativa ainda NF- κ B, promovendo a transcrição de muitos mediadores inflamatórios (BAR-SHAI & REZNICK, 2006). Sua presença foi detectada na placa aterosclerótica em humanos (BECKMAN et al., 1994), rins provenientes de pacientes que apresentaram reação enxerto-hospedeiro (MACMILLAN-CROW et al., 1996) e líquido sinovial de pacientes com artrite (KAUR & HALLIWELL, 1994), através da quantificação da 3-nitrotirosina.

Em cultura de osteoblastos humanos, a presença de $ONOO^-$ inibe a proliferação e a diferenciação celular. Entretanto, níveis elevados de NO não são lesivos, uma vez que a produção de $ONOO^-$ esteja bloqueada. Ainda, a adição de um inibidor de NOS, reduzindo drasticamente os níveis basais de NO, impede a proliferação celular. Em conjunto, esses dados apontaram para um papel crucial do NO, em baixos níveis, na homeostase celular em osteoblastos humanos, ao passo que espécies reativas de nitrogênio estariam associadas com dano a funções celulares (ROCHA & DE BRUM-FERNANDES, 2002).

Em modelo de artrite por adjuvante ou *Streptococcus* do grupo A, foi proposto o envolvimento do NO no desenvolvimento da artrite, com a redução do processo pela administração de inibidores da NOS (IALENTI et al., 1993; STEFANOVIC-RACIC et al., 1994; MCCARTNEY-FRANCIS et al., 1993). Entretanto, estudos posteriores mostraram ineficácia ou piora da artrite após a administração de inibidores da NOS (STEFANOVIC-RACIC et al., 1995; FLETCHER et al., 1998; MCCARTNEY-FRANCIS et al., 2001). Em estudos do nosso grupo de pesquisa, foi mostrado que *scavenger* de $ONOO^-$ inibiu o influxo celular (IC) agudo e IA na AZy (BEZERRA et al., 2007) e o papel do NO sobre esse influxo, dependente do sítio inflamatório e independente da espécie animal e estímulo estudado (LEITE et al., 2009).

Inúmeros estudos têm sugerido ainda a participação de EROs e ERNs na injúria tecidual inflamatória, tanto em modelos animais de artrite quanto em modelos de inflamação crônica intestinal e de injúria/reperfusão. Nesses modelos, a administração de antioxidantes diminui a injúria tecidual e o processo inflamatório (CONNER & GRISHAM, 1996).

1.4. Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase)

O complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase) é uma família de enzimas de múltiplas subunidades capaz de produzir O_2^- a partir de O_2 (QUINN & GAUSS, 2004). Inicialmente descrita e caracterizada em células fagocíticas, NADPH oxidase era considerada como restrita a leucócitos, com ação limitada ao sistema de defesa (BABIOR et al., 1973). Entretanto, nas últimas décadas, sistemas de NADPH oxidase similares estão sendo detectados em células não fagocíticas. Diferentes tipos celulares e tecidos a expressam, porém suas ações se diferem daquelas das oxidases de fagócitos. Apesar das diferenças funcionais, esses complexos enzimáticos se assemelham estruturalmente entre si (BOKOCH & KNAUS, 2003; LAMBETH, 2004).

A estrutura clássica da NADPH oxidase compreende cinco subunidades, das quais duas localizam-se na membrana celular e formam o flavocitocromo b_{558} . As subunidades citosólicas $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ e $p40^{phox}$ migram para a membrana após ativação, onde se ligam às subunidades $gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$ e às pequenas GTPases Rac1 (monócitos) e Rac 2 (neutrófilos), ativando o complexo (AGO et al., 2003). A participação da GTPase Rap 1A também tem sido sugerida. Acredita-se que $p47^{phox}$ seja o principal responsável pelo transporte das subunidades citoplasmáticas para a membrana (DUSI et al., 1996) (Figura 1).

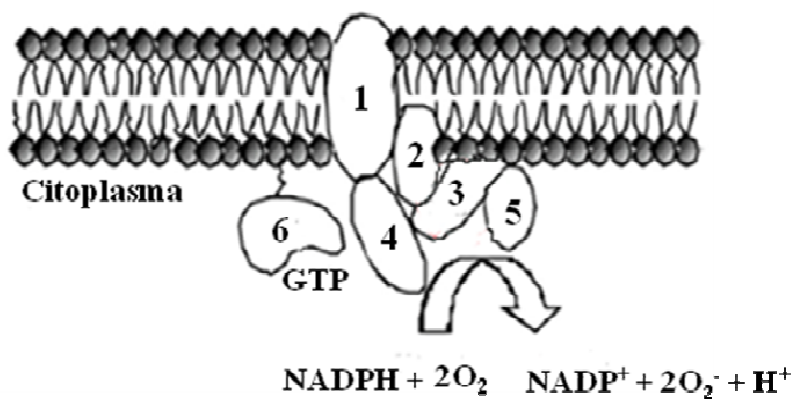


Figura 1 – Estrutura do complexo NADPH oxidase e a reação por ele catalisada de produção de O_2^- a partir de NADPH e O_2 . 1- $gp91^{phox}$; 2- $p22^{phox}$; 3- $p47^{phox}$; 4- $p67^{phox}$; 5- $p40^{phox}$ e 6- Rac 2 (Modificado de HULTQVIST & HOLMDAHL, 2005).

A produção aumentada e rápida de O_2^- via NADPH oxidase, por leucócitos fagocíticos, faz desse complexo um importante mediador na destruição de microrganismos.

Entretanto, células do hospedeiro podem ser destruídas por esse mecanismo. Em geral, os efeitos citotóxicos de O_2^- são mediados pela sua reação com outras EROs e ERNs e consequente produção de espécies mais reativas. A produção de O_2^- via NADPH oxidase pode ser mediada por citocinas, quimiocinas, vírus e outros agentes (CROSS & SEGAL, 2004). A deficiência de uma das quatro subunidades gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox} e p67^{phox} inativa esse complexo, promovendo o desenvolvimento da doença granulomatosa crônica, uma rara desordem genética associada a infecções recorrentes, graves e frequentemente fatais (BYLUND et al., 2005).

A forma não fagocítica é expressa em fibroblastos, células endoteliais, miócitos cardíacos, condrócitos e outros (MEIER et al., 1993; MEYER et al., 1999). Ao contrário da forma fagocítica, o O_2^- por ela produzido é liberado em baixas concentrações e continuamente. Sua produção é mediada por hormônios, forças hemodinâmicas, citocinas e outros (GRIENDLING et al., 2000). Participa ainda da sinalização celular e age como sensor de oxigênio, não sendo tóxico à célula (MEIER, 2001).

Apesar do dano produzido por EROs e ERNs descrito até aqui, autores têm proposto melhora da artrite, em modelo experimental, através de EROs produzidas pela NADPH oxidase. Olofsson et al. (2003) mostraram que ratos deficientes de NADPH oxidase desenvolveram artrite grave, apesar do reduzido *burst* oxidativo. A administração de um indutor dessa oxidase, como o fitol, impediu o desenvolvimento da doença. Outros autores mostraram que camundongos *knock-out* para o gene *Ncf1*, responsável pela síntese do fator citosólico neutrofílico 1 (Ncf1) ou p47^{phox}, submetidos à AZy, desenvolveram inflamação articular, degradação da cartilagem e erosão óssea (VAN DE LOO et al., 2003).

No estudo de Van der Veen et al. (2000), animais *knock-out* para p47^{phox} não desenvolveram encefalomielite. Entretanto, Hultqvist et al. (2004) mostraram o desenvolvimento de encefalomielite autoimune experimental em camundongos deficientes de NADPH oxidase, após a administração de uma glicoproteína. Resultados semelhantes foram obtidos em animais submetidos à artrite induzida por colágeno. Em estudo posterior, houve redução significativa da artrite em ratos após a administração do fitol (HULTQVIST et al. 2006).

1.5. Oxidação na artrite

Uma série de evidências sugere a participação de radicais livres na patogênese da AR. Estudos em modelos experimentais de artrite reforçam o possível papel terapêutico de

inibidores da produção ou *scavenger* de radicais livres nessa doença. O ambiente articular na AR se caracteriza pelos ciclos de hipóxia/reoxigenação e fluido sinovial ácido, contendo alta concentração de lactato e baixo teor de glicose e O_2 . Esses ciclos levam à expressão do fator induzível por hipóxia-1alfa (HIF-1 α) e seus genes, bem como à produção cíclica de EROs. Dessa forma, o meio articular colabora tanto nos processos de sobrevivência das células quanto na inflamação e angiogênese (HITCHON & EL-GABALAWY, 2004).

Na AR, radicais de oxigênio causam dano articular por mecanismos diretos e indiretos através da degradação da matriz extracelular, interferência na proliferação e sobrevivência das células e modulação da produção de mediadores pró-inflamatórios. Sinoviócitos e células migradas, como neutrófilos e linfócitos T e B, são fonte de EROs responsáveis pela degradação do colágeno, ativação de metaloproteinases e destruição da matriz extracelular. Essas espécies compreendem O_2^- , H_2O_2 e OH^\cdot (HENROTIN et al., 2003). Em neutrófilos e macrófagos, a ação da NADPH oxidase é tida como a principal fonte de O_2^- . Entretanto, sinoviócitos o produzem constitutivamente e, sob a ação de TNF- α e IL-1 β , essa produção é aumentada (DRÖGE, 2002; CHENEVIER-GOBEAUX et al., 2006).

A degradação de ácido hialurônico, o maior constituinte do fluido sinovial e matriz da cartilagem, é sugerida como um processo praticamente mediado por radicais livres (KRESSE & GLOSSL, 1987). Estudo *in vitro* mostrou a despolimerização e a alteração do conteúdo de água do ácido hialurônico submetido a diferentes sistemas produtores de radicais (MCNEIL et al., 1985). A detecção de ácido hialurônico no fluido sinovial na AR ressalta o papel dos radicais na sua degradação. Radicais livres também degradam proteoglicanos através da fragmentação da cadeia proteica central e destruição do local de ligação do ácido hialurônico (HITCHON & EL-GABALAWY, 2004).

No colágeno, radicais de oxigênio agem direta ou indiretamente. Radical hidroxila, na presença de oxigênio, cliva colágeno em pequenos peptídeos. Ainda, a ação de radicais livres sobre o colágeno o torna mais susceptível à clivagem enzimática. A atuação indireta se caracteriza pela ativação de collagenase e neutralização de inibidores de protease. A ativação de gelatinase e collagenase pelos neutrófilos depende da mieloperoxidase, ácido hipocloroso ($HOCl$) e H_2O_2 (HITCHON & EL-GABALAWY, 2004).

Além da ação direta de EROs e ERNs sobre o DNA, essas espécies podem interferir nos mecanismos de reparação desse ácido nucleico, contribuindo indiretamente para o desenvolvimento de doenças. Na artrite, essas espécies induzem mutações no p53, particularmente na camada sinovial, colaborando para a sua patogênese. Corroborando com

essa ação, Hitchon e El-Gabalawy (2004) sugeriram que as mutações mais frequentes do p53 localizam-se nas áreas hiperplásicas, contribuindo para a formação do *pannus* reumatoide.

Na cartilagem articular, EROs e ERNs induzem a apoptose de condrócitos, interferem na interação dessas células com a matriz extracelular, na sua resposta a fatores de crescimento e na sua migração ao local da injúria (CLANCY et al., 1997). EROs e ERNs inibem ainda a síntese de componentes da matriz da cartilagem e ativam enzimas que a degradam.

1.6. Sistemas de defesa antioxidantes

Muitos processos celulares ocorrem através de reações de oxidação e redução, alterando o estado redox da célula. Na tentativa de se manter um equilíbrio entre a produção e a eliminação de radicais livres gerados por essas reações, o organismo utiliza os sistemas antioxidantes.

Antioxidantes são moléculas endógenas ou exógenas que, mesmo em baixas concentrações, são capazes de inibir ou retardar a oxidação de um substrato (HALLIWELL, 1990). Os antioxidantes endógenos são essenciais para o bom funcionamento celular e, sob condições de estresse oxidativo, podem necessitar do auxílio de antioxidantes da dieta. Os sistemas antioxidantes impedem a formação de radicais livres por eliminar seus precursores ou inibir sua catálise ou por reagir com os radicais já formados, eliminando-os ou inibindo-os (GUTTERIDGE & MITCHELL, 1999). Esses sistemas são constituídos por substâncias enzimáticas e não enzimáticas.

Os sistemas enzimáticos compreendem principalmente glutathiona peroxidase, superóxido dismutase (SOD) e catalase (MATES et al., 1999). Glutathiona (GSH), um dos mais importantes antioxidantes endógenos, bem como vitaminas E e C, flavanoides e tiois formam o grupo dos não enzimáticos (DOBASHI et al., 2000, MCCALL & FREI, 1999).

Considerado como primeiro elemento de defesa contra EROs, SOD catalisa a dismutação de O_2^- a H_2O_2 , o qual é convertido a H_2O e O_2 pela catalase ou glutathiona peroxidase (DARLINGTON & STONE, 2001). Suas isoformas compreendem: - SOD Cu/Zn (SOD1), localizada no citoplasma, núcleo e espaço intermembrana mitocondrial, e cujas mutações se associam a doenças neurodegenerativas; - SOD Mn (SOD2), localizada na mitocôndria, e cujos polimorfismos se associam a cardiomiopatias; - SOD extracelular (SOD3), localizada principalmente nos compartimentos extracelulares, e cuja mutação aumenta o risco de doença cardiovascular (AFONSO et al., 2007).

Na AR, há controvérsias quanto os níveis de SOD no fluido sinovial. Marklund et al. (1986) mostraram diminuição desses níveis, ao passo que Olivieri et al. (1991) não detectaram alteração da sua quantidade. Em estudo mais recente, foi demonstrada diminuição da atividade de SOD3 no líquido sinovial de pacientes com AR (AFONSO et al., 2007). Corroborando com esse achado, foi sugerido papel protetor de SOD em modelo experimental de artrite (ROSS et al., 2004; IYAMA et al., 2001). Ainda, grupos de pesquisa têm desenvolvido miméticos de SOD e obtido bons resultados em modelos experimentais de artrite (CUZZOCREA et al., 2000; CUZZOCREA et al., 2005). Dados da literatura têm proposto ainda ação antiinflamatória semelhante à SOD para catalase e glutathione peroxidase (DAI et al., 2003; SEVEN et al., 2008).

Obtidos da dieta, os antioxidantes não enzimáticos contribuem para a proteção contra AR. Constituídos por substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas, diferenciam-se pela disponibilidade e ação nos tecidos. Vitamina E remove radicais livres, inibe a formação de ácido araquidônico e a atividade da lipoxigenase, além de ser regenerada pela glutathione reduzida e vitamina C (DARLINGTON & STONE, 2001). Essa última estimula a secreção de procolágeno, participa da estabilização das fibrilas de colágeno e síntese de GAGs (HENDERSON et al., 1991; DOWLING et al., 1990). Em modelo de artrite por adjuvante, a suplementação com vitamina C reduziu o influxo celular, edema e dor (SAKAI et al., 1999; DAVIS et al., 1990).

Em concordância com o exposto até aqui, dados da literatura sugerem que o reduzido sistema antioxidante constitui um fator de risco para o desenvolvimento da artrite (HELIOVARA et al., 1994; COMSTOCK et al., 1997). Apesar do número crescente de estudos indicando contribuição de antioxidantes da dieta na terapia da AR, ainda não é clara a sua participação na etiologia dessa doença.

1.7. Fitol

Estudos na década de 50 para investigar o conteúdo de ácido graxo nos produtos lácteos identificaram o ácido fitânico (ácido 3,7,11,15-tetrametilhexadecanoico) como o maior constituinte de muitos produtos da dieta, particularmente os oriundos de animais de pasto. Entretanto, maior interesse por esse ácido só surgiu quando níveis elevados foram associados à doença de Refsum, uma síndrome caracterizada pelo acúmulo de ácido fitânico no sangue e tecidos devido à deficiência funcional da fitanoil-CoA hidroxilase. Atualmente, inúmeras desordens metabólicas, como síndrome de Zellweger e condrodysplasia puntiforme

rizomélica, são associadas ao acúmulo desse ácido graxo (VAN DEN BRINK & WANDERS, 2006; VERHOEVEN & JAKOBS, 2001).

Considerado como precursor do ácido fitânico e provavelmente o mais abundante isoprenoide acíclico na biosfera, fitol (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol) se caracteriza por ser um álcool acíclico de cadeia longa e ramificada, constituinte da molécula da clorofila e a ela ligado por uma ligação éster (Figura 2). Parte integrante da clorofila a e presente em menor proporção nas clorofilas b, c e d e bacterioclorofila a, fitol é onipresente no ambiente marinho e encontrado em óleos vegetais e na carne e produtos lácteos derivados de ruminantes. Seus ésteres estão presentes nos fosfolipídios bacterianos, derivados de glicerol, ésteres de mamíferos e vitamina K. Sua síntese ocorre pela via do acetato/mevalonato ou piruvato e gliceraldeído, dependendo do organismo fotossintético (RONTANI & VOLKMAN, 2003).

Após sua ingestão, fitol pode ser liberado da clorofila pela ação da clorofilase, ou durante a digestão dos vegetais, por bactérias presentes no intestino, sendo aí absorvido (VAN DEN BRINK & WANDERS, 2006). Sua metabolização ocorre principalmente no fígado, tendo como intermediários o ácido fitênico e dihidrofitol, levando à produção de ácido fitânico (STEINBERG et al., 1966; SU & SCHMID, 1975).

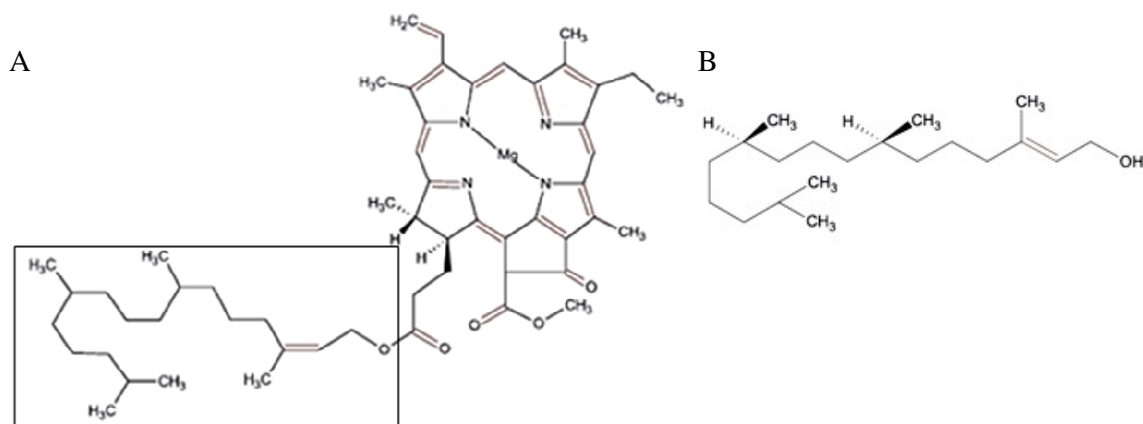


Figura 2 – Estrutura da clorofila (A) e do fitol (B). No canto inferior esquerdo, posicionamento do fitol como cadeia lateral na molécula de clorofila (LANFER-MARQUEZ, 2003).

Apesar dos vegetais conterem grande quantidade de fitol, eles não parecem ser uma fonte importante de fitol/ácido fitânico em humanos, já que o homem parece ser incapaz

de liberá-lo a partir da clorofila. Entretanto, fitol livre é rapidamente absorvido no intestino delgado de mamíferos. Em estudos com clorofila marcada radioativamente, dada por via oral, cerca de 95% dela permaneceu intacta no tubo digestivo de ratos e humanos (BAXTER, 1968; BAXTER et al., 1967). Em estudo de Steinberg et al. (1966), a dieta com fitol a quatro diferentes espécies levou ao acúmulo de ácido fitânico, particularmente no fígado e soro. Mize et al. (1966) observaram ainda concentração radioativa no fígado, tecido adiposo, músculo e pele em ratos alimentados com fitol marcado radioativamente. Os autores detectaram ainda radioatividade em todas as classes lipídicas estudadas, tanto no fígado quanto no plasma, particularmente nos triglicerídeos e fosfolipídios.

Em estudo mais recente, camundongos submetidos a uma dieta rica em fitol apresentaram acúmulo desse álcool no intestino delgado e fígado, com nenhuma detecção no cérebro, coração e rim. Os autores sugeriram que a degradação do fitol ocorria principalmente no fígado, por um processo estereoespecífico e regulado pela via do receptor ativado por proliferador peroxissomal (PPAR) (GLOERICH et al., 2007).

Presente particularmente em ruminantes, ácido fitânico pode ser encontrado no tecido adiposo, fígado, plasma, leite e rúmen desses animais. Em humanos, as maiores fontes desse ácido são a carne de ruminantes, gordura animal, laticínios e pescados (VAN DEN BRINK & WANDERS, 2006; LANFER-MARQUEZ, 2003), com cerca de 50% desse ácido sendo absorvido e metabolizado (BROWN et al., 1993). Suas quantidades elevadas são tóxicas para o organismo, sendo necessária, portanto, a sua metabolização. Transportado no plasma pelas lipoproteínas de baixa (LDL) e muita baixa (VLDL) densidades, ácido fitânico é acumulado particularmente no fígado e, em condições de estresse, infecção ou fome, é liberado para a degradação (BRITTON et al., 1989).

Diferente de muitos ácidos graxos, a degradação do ácido fitânico ocorre via α -oxidação, devido à presença de um grupo metil na posição 3, com formação de CO_2 e ácido pristânico (ácido 2,6,10,14-tetrametilpentadecanoico), um ácido com um carbono a menos e um grupo metil na posição 2 e cuja metabolização ocorre via β -oxidação (WIERZBICKI et al., 2002).

A degradação do fitol é iniciada pela sua conversão à fitenal via álcool desidrogenase e posterior produção de ácido fitênico pela enzima microsomal aldeído desidrogenase (FALDH). Esse produto é ativado ao seu éster de CoA (fitenoil-CoA) no retículo endoplasmático ou peroxissomo, seguido pela formação de ácido fitânico e posterior α -oxidação (VAN DEN BRINK et al., 2004; VAN DEN BRINK et al., 2005). Entretanto, uma via alternativa foi proposta para ruminantes, na qual fitol é convertido em dihidrofitol,

após o que há formação de fitanal e posterior produção de ácido fitânico (VAN DEN BRINK et al., 2004) (Figura 3).

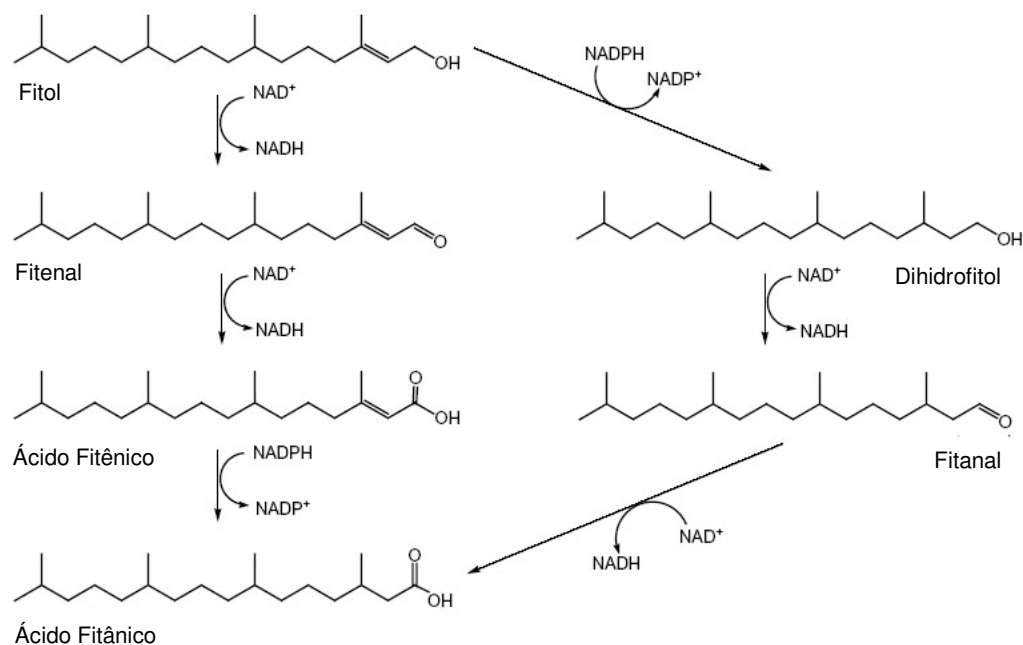


Figura 3 – Vias de degradação do fitol a ácido fitânico. No lado esquerdo, esquema da via de degradação proposta para mamíferos. No lado direito, esquema da via de degradação para ruminantes (Modificado de VAN DEN BRINK et al., 2004).

A degradação do fitol a ácido fitânico envolve ainda a participação do PPAR- α , que regula a expressão das enzimas FALDH e álcool desidrogenase (GLOERICH et al., 2007). Ativado por uma variedade de ligantes naturais e sintéticos, dentre os quais fitol e ácido fitânico (GOTO e al., 2005; ELLINGHAUS et al., 1999), PPAR- α age no metabolismo lipídico e no transporte e distribuição de ácidos graxos na célula. Pela ativação da β -oxidação, colabora ainda com a degradação dos mediadores lipídicos inflamatórios (CHINETTI et al., 2000).

No estudo de Gloerich et al. (2007), camundongos *knock-out* para PPAR- α , submetidos à dieta rica em fitol, apresentaram acúmulo desse álcool e níveis reduzidos de ácido fitânico no fígado. Os autores avaliaram ainda a capacidade de degradação do fitol por aqueles animais, através da produção de ácido fitênico, e os resultados mostraram uma menor, mas significativa, formação do ácido quando fitol e fitenal foram utilizados como

substrato. Foi sugerido então que a regulação do metabolismo do fitol envolvia vias dependentes e independentes de PPAR- α .

A partir da década de 60, quando se demonstrou a conversão do fitol a ácido fitânico e o envolvimento desse último nas doenças peroxissomais e nas atividades biológicas (SCHLUTER et al., 2002), é crescente o interesse por esse ácido. Como consequência, muitos estudos têm utilizado o fitol como seu precursor.

Além do uso como predecessor do ácido fitânico, fitol tem sido empregado como ativador do complexo NADPH oxidase em modelos experimentais, na tentativa de se compreender a participação desse complexo em doenças autoimunes. De fato, após demonstração de que ratos apresentando maior atividade de NADPH oxidase foram protegidos da artrite (OLOFSSON et al., 2003), os autores mostraram ainda uma associação entre o baixo *burst* oxidativo, o polimorfismo do *Ncf1* e o desenvolvimento da artrite, o que foi comprovado pela administração do fitol.

De forma semelhante, Huberle et al. (2009) mostraram a participação da via NADPH oxidase em modelo de neurite autoimune alérgica em ratos, no qual o tratamento com o fitol diminuiu a gravidade da doença.

1.8. Inibidores de 5-fosfodiesterase

A modulação de mediadores pró e antiinflamatórios por inibidores específicos de fosfodiesterase é uma estratégia crescente no tratamento das doenças inflamatórias (PERRY & HIGGS, 1998). Em estudo de Francischi et al. (2000), em modelo de artrite induzida por adjuvante, foi mostrado que rolipram, o inibidor de 4-fosfodiesterase, promoveu efeitos antiinflamatórios e antinociceptivo associados à redução na produção local e sistêmica de TNF- α . Esse resultado permite sugerir que outros inibidores de fosfodiesterase podem agir de forma semelhante.

Considerado como importante segundo mensageiro, guanosina monofosfato cíclico (GMPc) controla muitos processos celulares, como a inflamação. Seu processo de sinalização é complexo e interligado a outros sistemas (HOUSLAY & MILLIGAN, 1997; HOUSLAY, 1998). Concentrações intracelulares de GMPc são controladas pela guanilato ciclase e sua degradação é mediada por fosfodiesterases. Apesar das 5, 6 e 9-fosfodiesterases degradarem GMPc, a primeira parece ser a mais importante nesse processo (BEAVO, 1995). Considerando que a via NO-GMPc participa da nocicepção em artrite inflamatória, inibidores de fosfodiesterases exercem efeitos antinociceptivos pelo aumento dos níveis intracelulares

de GMPc. Corroborando com essa ação, estudos com sildenafil, um inibidor de 5-fosfodiesterase utilizado no tratamento da disfunção erétil, mostraram antinocicepção em modelos de dor (ASOMOZA-ESPINOSA et al., 2001; JAIN et al., 2001). Entretanto, zaprinast, outro inibidor de 5-fosfodiesterase, não teve efeito em modelos de hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂) e carragenina (AMARANTE & DUARTE, 2002), sugerindo que o efeito antinociceptivo de inibidores de 5-fosfodiesterase pode depender do modelo experimental utilizado.

Descritas como uma grande família de enzimas, as fosfodiesterases se diferenciam, dentre outros aspectos, pela distribuição tecidual, especificidade de substrato e regulação pelas quinases. Elas degradam rapidamente adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e GMPc em 5'AMP e 5'GMP, respectivamente, inativando-os (GLOSSMANN et al., 1999). Por regular a sinalização de nucleotídeos cíclicos envolvidos em funções fisiológicas, fosfodiesterases têm sido alvo de terapias em doenças como asma, depressão, disfunção erétil e outras (ROTELLA, 2002; TORPHY, 1998).

Considerado como o primeiro inibidor seletivo de 5-fosfodiesterase utilizado na disfunção erétil, sildenafil é um potente relaxante vascular e uma ferramenta para o estudo das ações de GMPc (BOOLELL et al., 1996). Criado para o tratamento da hipertensão e angina, sildenafil é utilizado na disfunção erétil, hipertensão pulmonar e esclerose múltipla (UTHAYATHAS et al., 2007). Em animais e seres humanos, tem sido sugerido um papel analgésico de sildenafil (JAIN et al., 2003; AMBRIZ-TUTUTI et al., 2005; UTHAYATHAS et al., 2007). Ainda, sildenafil reduziu fenômenos inflamatórios em diferentes modelos experimentais (SANTOS et al., 2005; ISERI et al., 2009) e promoveu angiogênese e neurogênese em modelo de acidente vascular cerebral (AVC) em ratos (ZHANG et al., 2002; ZHANG et al., 2003; VISSER et al., 2009).

Ao lado do sildenafil, tadalafil e vardenafil são os principais inibidores de 5-fosfodiesterase utilizados na disfunção erétil (SHABSIGH, 2004). Embora eles apresentem mecanismos similares de ação, variações na estrutura, farmacocinética e especificidade de fosfodiesterase podem contribuir para diferenças entre eles (BLOUNT et al., 2004). Reforçando essa possibilidade, foi mostrado que tadalafil diminuiu significativamente os níveis de TNF- α e IL-1 β induzidos por hipóxia em artérias pulmonares de rato, o que não ocorreu com o sildenafil e vardenafil (TSAI et al., 2006).

Considerado como outra opção no tratamento da disfunção erétil, tadalafil se caracteriza pelo uso vantajoso devido à rápida absorção, meia-vida longa (17,5 horas para uma dose de 20 mg) e biodisponibilidade independente de alimento ou álcool (MCMAHON,

2003; Kim, 2003), além de sua segurança cardiovascular e boa tolerabilidade. Em estudos experimentais, Zhang et al. (2006) mostraram a participação do tadalafil na recuperação funcional, neurogênese e angiogênese em modelo de AVC isquêmico. Na neurotomia cavernosa em ratos, tadalafil restabeleceu as alterações induzidas pela cirurgia (VIGNOZZI et al., 2006) e, em modelo de transplante pulmonar, melhorou a performance pulmonar e reduziu EROs após reperfusão (WEISS et al., 2009).

Além das ações de inibidores de fosfodiesterase descritas até aqui, a associação entre os efeitos biológicos dessa classe de drogas e a inibição de citocinas tem sido proposta. De fato, Haddad et al. (2002) demonstraram diminuição da produção de TNF- α e IL-6 pelo zaprinast por células epiteliais alveolares expostas ao lipopolissacarídeo (LPS). Em estudo de Fuhrmann et al. (1999), os autores mostraram que zaprinast diminuiu a liberação de PGE₂ por células epiteliais suínas expostas ao ácido araquidônico, embora não tenha afetado a liberação de IL-8 induzida por TNF- α em células bronquiolares.

1.9. Osteoartrite

Considerada como uma das mais comuns desordens articulares, a osteoartrite é uma doença crônica degenerativa caracterizada pela fibrilação da cartilagem articular, remodelamento ósseo e hipertrofia e inflamação da membrana sinovial. Em alguns casos, a esclerose do osso subcondral e a formação de osteófitos podem ser observadas (POOLE, 1999; MARTIN et al., 1997). Sua etiologia envolve fatores genéticos, hormonais, mecânicos e idade (GHOSH & CHERAS, 2001).

Atualmente, o tratamento da osteoartrite se baseia em drogas como antiinflamatórios não-esteroidais, corticosteroides, ácido hialurônico, condroitin sulfato e glucosamina. Elas aliviam os sintomas gerais, mantêm a mobilidade e reduzem a dor e rigidez articulares (HOCHBERG & DOUGADOS, 2001). Entretanto, essas terapêuticas não revertem os processos da doença. De forma semelhante à artrite, modelos experimentais de osteoartrite são utilizados para a compreensão de sua etiologia e patogênese e busca de terapias que alterem e revertam o curso da doença.

Caracterizada por eventos mecânicos e bioquímicos, responsáveis pelo desequilíbrio entre a síntese e degradação da matriz (MALEMUD, 1999), a cartilagem osteoartrítica apresenta degradação da rede de colágeno e uma redução dos agregados de proteoglicanos. Esse último fenômeno pode ser decorrente de uma inibição da síntese ou

aumento da degradação de proteoglicanos, bem como pela diminuição da retenção dessas moléculas devido à deficiência de ácido hialurônico (SCHÖN et al., 2006).

Ao lado da cartilagem, estruturas como membrana sinovial, osso subcondral, ligamentos e músculos periarticulares são afetados na osteoartrite (LOUGHLIN, 2005). Acredita-se que essa doença seja uma insuficiência articular global em que há participação de todas as estruturas articulares, embora a importância recaia sobre a interação cartilagem, osso subcondral e sinóvia (SANZ et al., 2006).

Apesar de secundária até há pouco tempo, a participação da membrana sinovial na osteoartrite é considerada essencial para a continuidade do processo, já que ela sintetiza e libera inúmeros mediadores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias, proteases, radicais livres e mediadores lipídicos, que modulam a atividade de condrócitos induzindo-os ao catabolismo (ARMANDA et al., 2004). Esse processo é iniciado pela fagocitose de detritos da cartilagem pelos sinoviócitos e contribui na dor, edema e rigidez articulares (HILL et al., 2001; SAITO et al., 2002). Entretanto, a membrana sinovial também é responsável pelo aumento na síntese de citocinas antiinflamatórias, como IL-4, 10 e 13 (ALAAEDDINE et al., 1999; JOVANOVIC et al., 1998).

A produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias por sinoviócitos e condrócitos, observada na osteoartrite, contribui, ao lado das disfunções mitocondriais (RUIZ-ROMERO et al, 2009), para a síntese de EROs. Segundo Henrotin et al (2003), essas espécies colaboram para a disfunção e degradação da cartilagem. Em concordância, NO degrada a cartilagem articular através da ativação de metaloproteinases, inibição da síntese de agregan e colágeno e indução da morte de condrócitos (YORIMITSU et al., 2008). Além de induzir a apoptose das células cartilaginosas, H_2O_2 diminui a síntese de proteoglicanos e promove a peroxidação lipídica (ASADA et al., 2001; TIKU et al., 2000).

Utilizando o modelo de osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) em ratos, nosso grupo demonstrou que ocorre aumento na liberação de NO no lavado articular desses animais. Essa elevação foi associada ao aumento da atividade de NOS_i na membrana sinovial. Ainda, quando doador de NO ou inibidor de NOS foi administrado profilaticamente em ratos submetidos à TLCA, foi observada redução da hipernocicepção nesses animais, ao passo que quando foram administrados de forma terapêutica, isto é, após a indução do modelo, esses compostos não tiveram efeito. Em conjunto, os resultados sugerem que a manipulação dos níveis de NO não parece ser efetiva na modulação da hipernocicepção articular nesse modelo animal de osteoartrite (CASTRO et al., 2006).

2. Justificativa

O papel do óxido nítrico (NO) e dos sistemas redox na fisiopatologia de artrites ainda não está esclarecido. Em virtude da experiência do nosso grupo com o modelo de artrite induzida por zymosan (AZy) e osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior, associado ao papel dual de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) em modelos inflamatórios experimentais, investigou-se o efeito de um ativador de adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase) – fitol – sobre parâmetros inflamatórios na AZy e osteoartrite.

Ainda, baseado na ação dual do NO sobre a hipernocicepção articular em modelo de AZy e no seu efeito indutor ou inibidor da migração celular, a depender do sítio inflamatório, decidiu-se investigar o efeito do fitol em modelos de contorção abdominal por ácido acético e peritonite induzida por zymosan.

Considerando que inibidores de 5-fosfodiesterase, que agem via modulação do sistema L-arginina-NO, têm atividade antiinflamatória e que esse efeito não foi explorado para o tadalafil, cuja aplicação clínica tem aumentado, investigou-se o possível efeito antiinflamatório do tadalafil em artrites.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

- Avaliar o efeito do fitol em modelos de artrite e peritonite induzidas por zymosan, bem como em osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior e contorção abdominal por ácido acético;
- Avaliar o efeito do tadalafil em modelos de artrite induzida por zymosan e osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior.

3.2. Objetivos específicos

- Estudar a participação do fitol e tadalafil na migração celular, incapacitação articular e degradação da cartilagem articular em ratos submetidos à artrite induzida por zymosan (AZy), nas fases aguda e crônica da doença;
- Estudar o efeito do fitol sobre a migração celular aguda e crônica em camundongos submetidos à AZy;
- Investigar a participação do fitol na migração celular em camundongos submetidos à peritonite induzida por zymosan;
- Avaliar o efeito do fitol em modelo de contorção abdominal por ácido acético;
- Investigar o efeito do fitol e tadalafil na incapacitação articular em modelo de osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior;
- Estudar os possíveis mecanismos de ação do fitol e tadalafil na AZy, através da quantificação de mediadores inflamatórios locais, como óxido nítrico (NO), interleucina-1 β (IL-1 β), IL-10, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e quimioatraente neutrofílico -1 (CINC-1).

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (150-180g) e camundongos Swiss (25-30g) machos, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará - UFC. Os animais foram submetidos a uma temperatura adequada (22-25°C), com 12h de ciclo claro/escuro e livre acesso à água e ração. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes preconizadas pelo Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 2003), com todos os esforços feitos para minimizar o sofrimento dos animais. A parte do trabalho referente ao fitol foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEPA da UFC, sob o número 09/08, enquanto o do tadalafil foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais – CEUA da Universidade Estadual do Ceará – UECE, sob o número 08340731-6. Em todos os experimentos, foram utilizados 6 animais por grupo.

4.2. Drogas utilizadas

As seguintes drogas foram adquiridas da Sigma-Aldrich do Brasil: Fitol, zymosan, ácido acético, óleo mineral, 3-morfolinosidnonimina (SIN-1), 1H- [1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-ona (ODQ). Naloxona e tadalafil (Cialis®) foram adquiridos dos Laboratórios Cristália do Brasil Ltda e Eli Lilly do Brasil, respectivamente. Os demais reagentes utilizados apresentavam grau de pureza e propriedades analíticas adequadas.

4.3. Indução da artrite por zymosan (AZy)

Ratos e camundongos foram submetidos a uma leve anestesia com éter etílico e, em seguida, induzida artrite através da injeção intra-articular (i.art.), no joelho direito, de 1 mg ou 100 µg de zymosan, para ratos e camundongos, respectivamente, dissolvidos em solução salina estéril apirogênica. Após 6 horas (fase aguda) ou 7 dias (fase crônica) da artrite por zymosan (AZy), os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg) intra-peritoneal (i.p.), sacrificados e ex-sanguinados.

4.4. Administração do fitol e tadalafil na artrite por zymosan (AZy)

Para observar a ação do fitol no modelo de AZy, ratos foram submetidos ao pré-tratamento s.c. com fitol (170 mg/200 µL) (OLOFSSON et al., 2003) 30 minutos, 1, 3, 5 ou 8 dias antes da administração i.art. de zymosan (1 mg/50 µL de salina estéril) (ROCHA et al.,

1999), sendo sacrificados 6 horas após a indução da artrite. Na fase crônica da AZy, ratos receberam fitol s.c. 5 dias antes da administração i.art. de zymosan. Animais *naive* receberam apenas salina s.c. e i.art. e o grupo controle recebeu óleo mineral (veículo do fitol) (HUBERLE et al., 2009) s.c. e zymosan i.art..

Para o estudo inicial em camundongos, foi feita uma cinética do efeito sistêmico (s.c.) da administração do fitol (42,5 mg/50 μ L) 1, 6, 12 ou 24 horas antes da injeção i.art. de zymosan (100 μ g/25 μ L) e sacrifício após 6 horas da AZy. Na tentativa de se elaborar uma curva dose-resposta e tomando-se como base a cinética, camundongos receberam fitol (4,25 – 42,5 mg/ 5-50 μ L) s.c. 6 horas antes da indução da artrite, sendo sacrificados após 6 horas da AZy. Ainda na fase aguda da artrite, camundongos foram submetidos à injeção i.art. de fitol (8,5 mg/10 μ L) 1 hora antes ou 1,5 horas após zymosan. Na fase crônica, camundongos receberam fitol (42,5 mg/50 μ L) s.c. 6 horas antes da AZy, sendo sacrificados após 7 dias. Animais *naive* receberam salina s.c. e fitol (10 μ L) ou óleo mineral (10 μ L) ou salina i.art.. Grupo controle recebeu óleo mineral s.c. ou i.art. e zymosan i.art.. As doses de fitol foram calculadas baseadas na sua densidade ($d = 0,85$ g/mL).

Para avaliar o efeito do tadalafil na AZy, ratos foram submetidos ao tratamento v.o. com tadalafil (0,02 - 0,5 mg/kg) 2 horas após a administração i.art. de zymosan (1 mg/50 μ L de salina estéril). Animais *naive* receberam salina v.o. e i.art.. Grupo controle recebeu salina v.o. e zymosan i.art..

Para os experimentos com outras drogas, ratos foram submetidos às seguintes administrações:

- SIN-1 (doador de NO) (10 μ g) i.art., 2 horas após zymosan i.art.;
- ODQ (inibidor de guanilato ciclase solúvel) (4 μ g) i.art., 2 horas após zymosan i.art..

Para os grupos ODQ + (tadalafil ou SIN-1) e naloxona (antagonista de receptor μ -opioide) + tadalafil, ODQ e naloxona (1 mg; i.p.) foram administrados 1,5 horas após zymosan i.art..

4.5. Indução da osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA)

Após anestesia (hidrato de cloral – 400 mg/kg; i.p.), ratos foram submetidos à depilação do joelho direito e assepsia local. Uma incisão parapatelar foi feita, seguida pelo deslocamento lateral da patela, permitindo acesso ao espaço articular. O ligamento cruzado

anterior foi facilmente visualizado e cirurgicamente excisado. O aumento do deslocamento anterior da tíbia em relação ao fêmur foi usado como forma de se confirmar a transecção do ligamento. A síntese dos tecidos foi feita por planos. O grupo *sham* foi submetido ao procedimento cirúrgico, sem haver a excisão do LCA. Os animais foram sacrificados após 70 dias da transecção (Castro et al., 2006).

4.6. Administração do fitol e tadalafil na osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA)

Para observar a ação do fitol no modelo de osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA), ratos foram submetidos ao pré-tratamento s.c. com fitol (170 mg/200 µL) (OLOFSSON et al., 2003) ou óleo mineral (200 µL) (veículo do fitol) (HUBERLE et al., 2009), 5 dias antes e 35 dias depois da TLCA.

Para o efeito do tadalafil no modelo de osteoartrite por TLCA, ratos foram submetidos ao tratamento v.o. com tadalafil (0,5 mg/kg) ou salina, do 4º ao 7º dias após TLCA. A dose de tadalafil utilizada se baseou nos resultados obtidos no modelo de AZy.

4.7. Indução da peritonite por zymosan e administração do fitol

Camundongos foram submetidos à administração i.p. de zymosan (100 µg/100 µL), sendo sacrificados (hidrato de cloral – 400 mg/kg; i.p.) após 4 horas (LEITE et al., 2009). Assemelhando-se ao realizado na AZy, grupos de animais foram pré-tratados com fitol s.c. (42,5 mg/50 µL) 30 minutos, 1, 6, 12 ou 24 horas antes da peritonite por zymosan. Animais *naive* receberam apenas salina s.c. e i.p.. Grupo controle foi submetido à administração de óleo mineral s.c. e zymosan i.p..

4.8. Contorção abdominal por ácido acético e administração do fitol

Camundongos foram submetidos à administração i.p. de ácido acético (0,6%). Após 10 minutos, o número de contorções abdominais foi contabilizado por um período de 20 minutos, após o que os animais foram sacrificados (hidrato de cloral – 400 mg/kg; i.p.). Assemelhando-se ao realizado na peritonite, grupos de animais foram pré-tratados com fitol s.c. (42,5 mg/50 µL) 30 minutos, 1, 6, 12 ou 24 horas antes da injeção i.p. de ácido acético. Grupo controle foi submetido à administração de óleo mineral s.c. e ácido acético i.p..

4.9. Análise do influxo celular

Após 6 horas (fase aguda) ou 7 dias (fase crônica) da AZy, procedeu-se à lavagem das cavidades articulares através de duas injeções intra-articulares, seguidas de aspiração, de 0,2 mL ou 50 μ L de EDTA diluído em PBS (10 mM), em ratos ou camundongos, respectivamente (LEITE et al., 2009). O exsudato articular coletado foi utilizado para a contagem da celularidade total em câmara de Neubauer e, após centrifugação, os sobrenadantes foram estocados a -70°C para posterior utilização.

Após 4 horas de peritonite, procedeu-se à lavagem das cavidades peritoneais através da incisão e desbridamento da pele abdominal e posterior injeção de 2 mL de EDTA diluído em PBS (10 mM) (LEITE et al., 2009). O exsudato peritoneal foi coletado com pipeta Pasteur e utilizado para a contagem da celularidade total em câmara de Neubauer.

4.10. Incapacitação articular

O teste de incapacitação articular para ratos foi utilizado, conforme descrito por Tonussi e Ferreira (1992). Após a injeção de Zy, os animais foram postos para deambular em um cilindro metálico que gira a uma velocidade de 3 rpm. Foram colocadas sapatilhas metálicas em volta das patas traseiras e os animais foram postos para deambular para se habituarem.

A pata direita foi conectada a um circuito simples computadorizado, para aquisição de dados. O Tempo de Suspensão da Pata (TSP), definido como o tempo em que o animal deambula sem tocar o cilindro com a pata injetada, por um período de 60 segundos, foi tomado como diretamente proporcional à incapacitação articular.

Para osteoartrite por TLCA, o TSP foi registrado por 10 minutos, iniciando-se no 1º dia até o 14º dia após TLCA.

4.11. Determinação da produção de NO

A produção de NO nos sobrenadantes articulares foi determinada através da quantificação dos níveis de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, utilizando-se o kit comercialmente disponível (Cayman Chemical, USA).

4.12. Quantificação e identificação de glicosaminoglicanos (GAGs) na cartilagem articular

Após 7 dias de indução da AZy, ratos foram sacrificados e a cartilagem da extremidade distal do fêmur foi retirada cirurgicamente, pesada após secagem *overnight* a 80°C e homogeneizada em acetona. Em seguida, uma suspensão de PROLAV 750^R em tampão Tris-HCl/NaCl (4 mg enzima/mL tampão) foi adicionada ao pó cetônico e o material foi digerido em banho-maria (56°C) por 48 horas. A mistura reacional obtida foi mantida em banho-maria (37°C) por 30 minutos, adicionado, em seguida, ácido tricloroacético (concentração final de 10% w/v), agitada a 4°C por 15 minutos e centrifugada (10.000 g, 15 min, 25°C). Em seguida, foi adicionado etanol ao sobrenadante e a mistura foi mantida *overnight* a 4°C e novamente centrifugada (10.000 g, 15 min, 15°C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado (GAG) foi dissolvido em água destilada e separado através de eletroforese em gel de agarose (0,6%), sendo corado com azul de toluidina (0,1%). A lâmina foi escaneada para determinação da intensidade luminosa de cada mancha e calculada uma densidade ótica (D.O) relativa, comparando-se a um padrão de condroitin. Após esse procedimento, o único GAG extraído da cartilagem foi o condroitin sulfato (BEZERRA et al., 2004). Para comparação, padrões de condroitin sulfato e heparan sulfato foram submetidos ao mesmo protocolo. Os dados foram expressos em µg de GAG/mg de cartilagem seca.

4.13. Determinação dos níveis de IL-1β, TNF-α, IL-10 e CINC-1

Os níveis de IL-1β, TNF-α, IL-10 e CINC-1 foram quantificados nos sobrenadantes articulares dos ratos, submetidos à AZy e sacrificados após 6 horas, e avaliados por ELISA.

Microplacas (NUNC-Immuno® Plate) de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos policlonais anti-IL-1β, anti-TNF-α, anti-IL10 ou anti-CINC-1 e incubadas *overnight* a 4°C. Os anticorpos foram fornecidos pelo Dr. Steeve Poole (National Institute for Biological Standards and Control, UK). Após o bloqueio das placas (albumina 1% por 1 h), os padrões de citocinas e as amostras foram adicionados em duplicata por 2 horas (22°C). Um anticorpo secundário (coelho) biotilado foi adicionado, seguindo-se incubação por 1 hora (22°C). Por último, 100 µL de avidina-peroxidase (diluída a 1:5000; DAKO A/S, Denmark) foi adicionada a cada poço. Após 30 minutos, as placas foram lavadas e o reagente O-fenilenodiamina (OPD - 40 µg/poço) e H₂O₂ foram adicionados. A reação foi interrompida

com H₂SO₄ (1M) e a leitura da D.O. foi realizada a 490 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.14. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Para comparações múltiplas entre médias, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey (P<0,05). Para comparações entre duas médias, foi utilizado o teste t de Student (P<0,05). O n° de contorções abdominais foi expresso em mediana, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis para comparação entre elas (P<0,05).

5. Resultados

5.1. Efeito do fitol sobre o influxo celular (IC) agudo na artrite por zymosan (AZy) em camundongos

Na figura 4A está ilustrado o efeito da administração profilática sistêmica (s.c.) do fitol (42,5 mg/50 μ L) 24, 12, 6 ou 1 h antes da injeção i.art. de 0,1 mg de zymosan em camundongos. Ocorreu redução significativa do IC medido após 6 h da AZy, nos grupos de 24, 12 e 6 h, sem diferença entre eles, quando comparado ao que recebeu óleo mineral, utilizado como veículo do fitol ($P < 0,05$).

Considerando que a cinética revelou 6 h como o tempo mais precoce para ação do fitol, buscou-se construir uma curva dose-resposta. Esse resultado está ilustrado na figura 4B e mostra o efeito da administração sistêmica (s.c.) de 4,25 – 42,5 mg (5 – 50 μ L) de fitol, 6 h antes da injeção i.art. de zymosan, sobre o IC medido após 6 h. As doses de 8,5; 21,25 e 42,5 mg reduziram de forma similar o IC, comparadas aos animais que receberam óleo mineral s.c. ($P < 0,05$).

Uma vez que a via de administração do fitol pode alterar seu efeito e considerando a possibilidade de ação direta em células sinoviais, foi avaliado o efeito de sua administração local (i.art.). Esse resultado está mostrado na figura 4C, na qual a administração i.art. de 8,5 mg (10 μ L) de fitol, dado 1 h antes (profilático) ou 1,5 h (terapêutico) após a injeção de 0,1 mg de zymosan i.art. levou a significativa redução do IC ($P < 0,05$), quando comparada à injeção i.art. de óleo mineral. Observou-se ainda que a administração de fitol ou óleo mineral em articulações *naive* não promoveu IC.

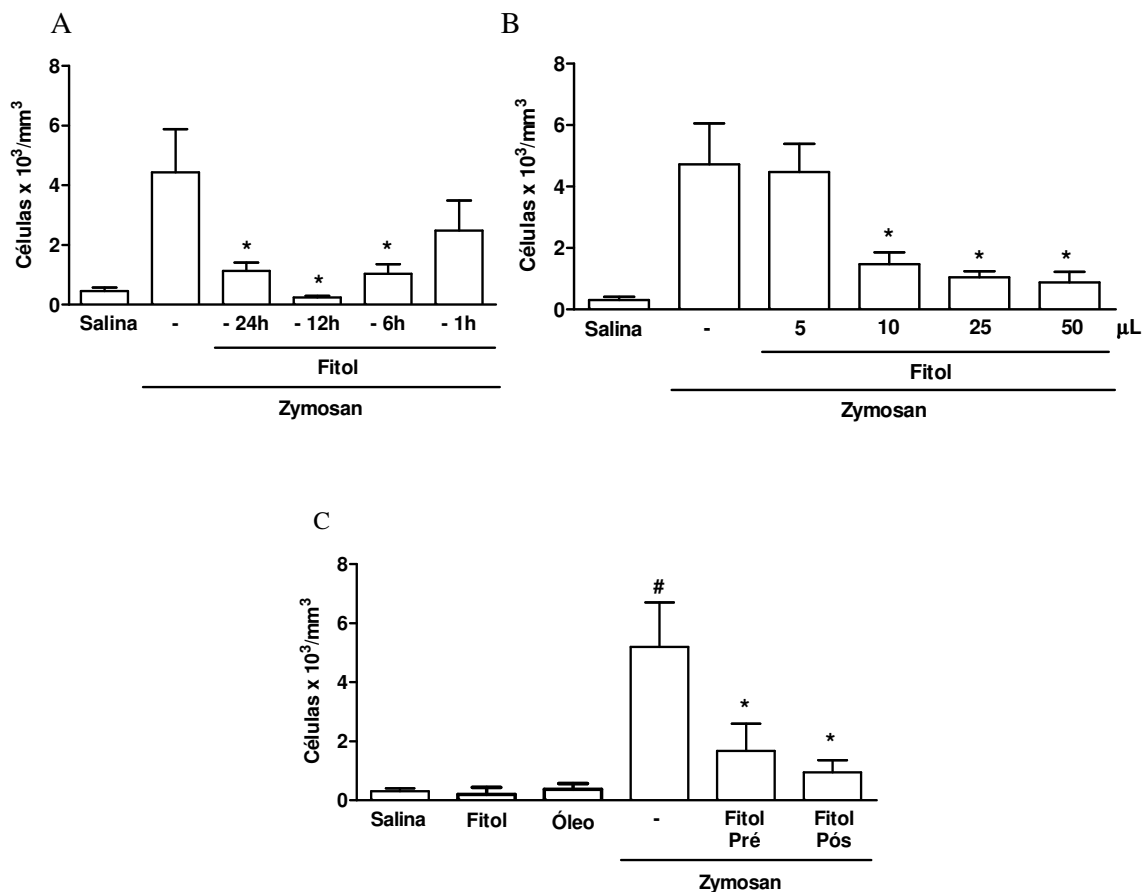


Figura 4- Efeito do fitol sobre o IC agudo na AZy em camundongos. Camundongos receberam 0,1 mg de zymosan i.art. e o IC foi medido no lavado articular coletado 6 h após. **(A)** cinética do efeito sistêmico (s.c.) de 42,5 mg (50 µL) de fitol ou 50 µL de óleo mineral (-). **(B)** curva dose-resposta do efeito sistêmico (s.c.) de fitol (4,25 – 42,5 mg/5 – 50 µL) 6 h antes do zymosan i.art.. **(C)** grupos receberam 8,5 mg (10 µL) de fitol i.art. 1 h antes (fitol-pré) ou 1,5 h após (fitol-pós) zymosan i.art.. Grupos *naive* receberam salina, fitol (8,5 mg - 10 µL) ou óleo mineral (10 µL) i.art. e um grupo controle (-) recebeu óleo mineral (10 µL) i.art. 1 h antes de zymosan i.art. Os dados representam a média ± e.p.m. de células x 10³/mm³; n=6/grupo. #,*P<0,05 comparado a *naive* e controle, respectivamente, usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

5.2. Efeito do fitol sobre a hipernociceção articular e influxo celular (IC) agudo na AZy em ratos

Na artrite induzida por pristano (OLOFSSON et al., 2003), foi demonstrado que o melhor intervalo de tempo para administração de 170 mg (200 μ L) do fitol foi 5 dias antes da indução da artrite. Esse resultado foi reproduzido no presente estudo, como ilustrado na figura 5A, revelando que a dose de 170 mg do fitol inibiu, de forma significativa ($P < 0,05$), a hipernociceção articular, quando injetado 5 dias antes da indução da AZy. O mesmo foi observado para a redução do IC pelo fitol, quando comparado ao intervalo de 3 ou 8 dias antes da indução da AZy, como ilustrado na figura 5B. Adicionalmente, esses resultados demonstram que o efeito do fitol na AZy ocorre, embora em doses diferentes, independente da espécie estudada.

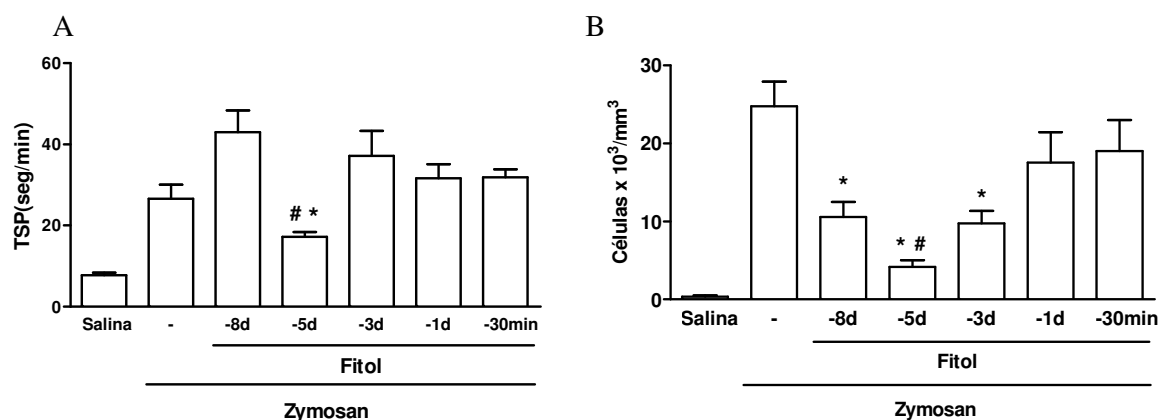


Figura 5- Efeito do fitol sobre a hipernociceção e IC agudo na AZy em ratos. A hipernociceção foi medida através do teste de incapacitação articular (TSP/1 min), a cada hora, até 6 horas após injeção de 1 mg de zymosan i.art. em ratos. Os resultados representam a cinética do efeito da injeção s.c. de 170 mg (200 μ L) de fitol ou 200 μ L de óleo mineral (-) antes do zymosan sobre a hipernociceção (A) e IC (B). Os dados representam a média \pm e.p.m. em (A) do pico do TSP e em (B) do número de células x 10³/mm³; n=6/grupo. *:# $P < 0,05$ comparado a controle (-) e diferentes tempos do fitol, respectivamente, usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

5.3. Efeito do fitol sobre o influxo celular (IC) crônico na AZy

Semelhante ao observado na fase aguda, a administração de fitol diminuiu de forma significativa o IC na fase crônica da AZy, tanto em camundongos (Figura 6A) quanto em ratos (Figura 6B) ($P < 0,05$). Salienta-se que nessa fase ocorre sinovite, com predomínio de linfomononucleares. Assim, o efeito de uma única injeção de fitol promoveu uma ação tão prolongada, permitindo-se sugerir uma alteração do dano estrutural pelo fitol na AZy.

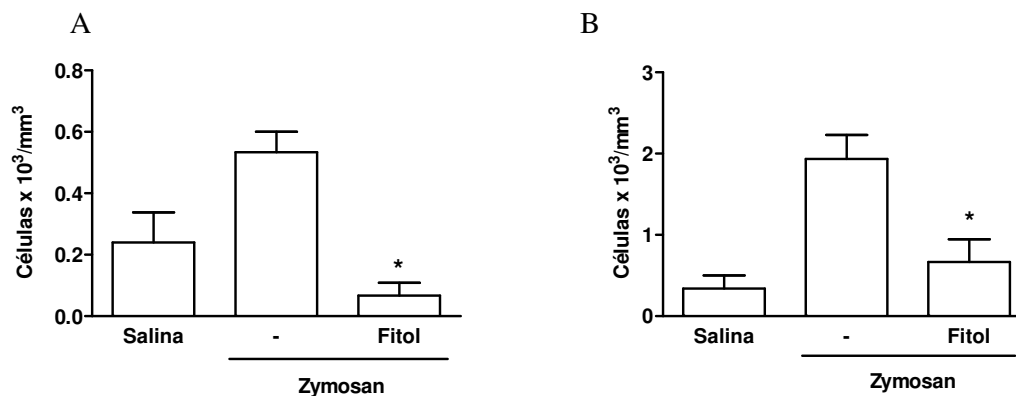


Figura 6- Efeito do fitol sobre o IC crônico na AZy. Camundongos e ratos receberam 0,1 ou 1 mg de zymosan i.art., respectivamente. O IC foi medido no lavado articular coletado 7 d após. **(A)** camundongos receberam 42,5 mg (50 μ L) de fitol s.c. 6 h antes do zymosan. **(B)** ratos receberam 170 mg (200 μ L) de fitol s.c. 5 d antes do zymosan. Grupos *naive* receberam salina e grupos controles (-) receberam 50 μ L ou 200 μ L de óleo mineral s.c., 6 h ou 5 d antes do zymosan, para camundongos ou ratos, respectivamente. Os dados representam a média \pm e.p.m. de células x 10³/mm³; n=6 / grupo. * $P < 0,05$ comparado a controle, usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

5.4. Efeito do fitol sobre o influxo celular (IC) agudo na peritonite por zymosan

No intuito de investigar se o efeito do fitol variava conforme o sítio inflamatório, avaliou-se a ação da administração do fitol, na mesma dose efetiva da AZy em camundongos, sobre a peritonite induzida por zymosan. Os resultados estão ilustrados na figura 7, revelando redução significativa do IC em relação ao controle tratado com óleo mineral. Comparando-se esse efeito com o obtido na AZy, houve uma pequena diferença, uma vez que o fitol inibiu o IC na peritonite, mesmo quando injetado tão precocemente quanto 30 minutos antes da indução, ao passo que só foi observada essa inibição na artrite quando o fitol foi injetado 6 h antes.

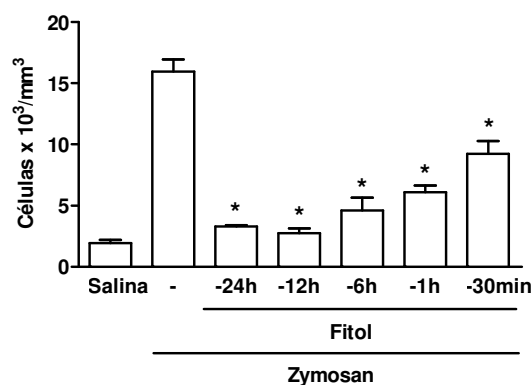


Figura 7- Efeito do fitol sobre o IC agudo na peritonite por zymosan. Camundongos receberam 0,1 mg de zymosan i.p. e o IC foi medido no lavado peritoneal coletado 4 h após. Cinética do efeito sistêmico (s.c.) de 42,5 mg (50 μ L) de fitol ou 50 μ L de óleo mineral (-). Os dados representam a média \pm e.p.m. de células x 10³/mm³; n=6/grupo. *P<0,05 comparado a controle (-), usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

5.5. Efeito do fitol sobre a hipernociceção no modelo de contorções abdominais por ácido acético

O mecanismo de hipernociceção articular no modelo de AZy envolve mediação central e periférica (TONUSSI & FERREIRA, 1992; ROCHA et al., 1999). No intuito de verificar se o efeito antinociceptivo do fitol ocorria em outras situações, avaliou-se o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, no qual se considera uma participação maior da mediação central no mecanismo de dor (RIBEIRO et al., 2000). O resultado está ilustrado na figura 8, na qual a cinética da administração do fitol revelou redução do número de contorções abdominais quando o fitol foi injetado até 1 hora antes da injeção do estímulo.

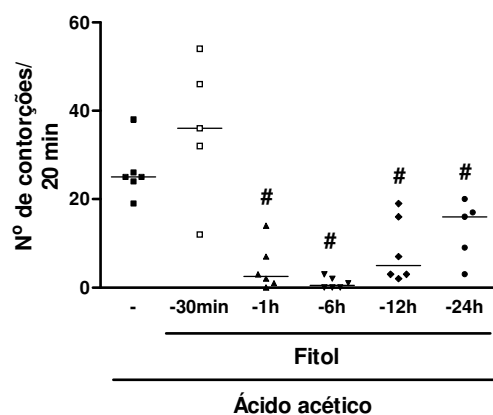


Figura 8- Efeito do fitol sobre a hipernociceção no modelo de contorções abdominais por ácido acético. Camundongos receberam 0,6% de ácido acético i.p. e o nº de contorções foi medido 10 min após. Cinética do efeito sistêmico (s.c.) de 42,5 mg (50 µL) de fitol ou 50 µL de óleo mineral (-). Os dados representam a mediana do nº de contorções; n=6/grupo; #P<0,05 comparado a controle (-), usando Kruskal-Wallis.

5.6. Efeito do fitol sobre a lesão da cartilagem articular na AZy

Considerando o efeito do fitol sobre o influxo celular, exercido tanto na fase aguda quanto crônica, e os resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa, demonstrando que ocorre perda de GAGs da matriz da cartilagem articular em ratos submetidos à AZy (BEZERRA et al., 2004), investigou-se o efeito do fitol sobre esse parâmetro. A administração do fitol reverteu de forma significativa a perda de GAGs da matriz, medida pela determinação da concentração de condroitin sulfato/mg de cartilagem articular, restaurando os níveis aos observados em animais *naive* (Figura 9A). A figura 9B ilustra uma amostra da eletroforese em gel de agarose de GAGs (condroitin sulfato) dos grupos estudados. Nos animais pré-tratados com o fitol, houve um nítido aumento da intensidade das bandas eletroforéticas comparada à do grupo controle, assemelhando-se ao do grupo *naive*. Ainda, a administração de fitol não interferiu no tipo de GAG presente na cartilagem, já que foi mantida a produção de condroitin sulfato e a de heparan sulfato não foi identificada, assemelhando-se aos grupos *naive* e controle.

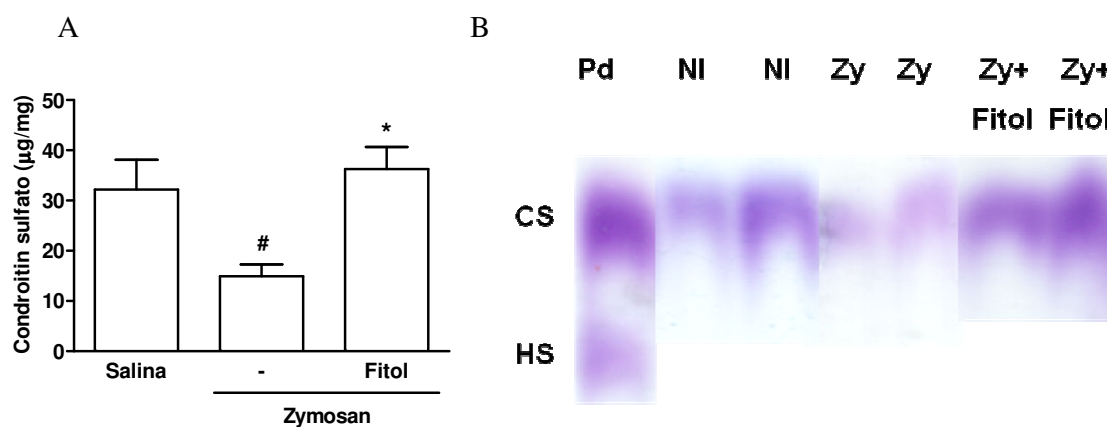


Figura 9- Efeito do fitol sobre a lesão da cartilagem articular na AZy. Ratos receberam 1 mg de zymosan i.art.. A lesão da cartilagem foi avaliada pela determinação da concentração de condroitin sulfato (CS)/mg de cartilagem extraída aos 7 d de artrite. Um grupo recebeu fitol (170 mg/200 µL; s.c.) 5 d antes do zymosan e o controle (-) recebeu 200 µL de óleo mineral, cujos resultados estão ilustrados em (A). (B) Ilustração da eletroforese em gel de agarose de amostra dos grupos *naive* (NI), controle (Zy) e tratado com fitol (Zy + Fitol). Os dados representam a média ± e.p.m. do conteúdo de CS; n=6/grupo. Padrão = Pd; Heparan sulfato = HS; #, *P<0,05 comparado a *naive* e controle, respectivamente, usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

5.7. Efeito do fitol sobre a hipernociceção articular na osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA)

Considerando que os mecanismos de dor em artrite podem ter vias comuns, investigou-se o efeito do fitol na hipernociceção no modelo de osteoartrite por TLCA em ratos. De maneira similar ao observado na AZy, os animais tratados com fitol, administrado 5 d antes da TLCA, apresentaram inibição da hipernociceção, conforme ilustrado na figura 10A, refletindo a evolução ao longo de 14 d, ou na figura 10B, refletindo o pico de hipernociceção avaliado entre 4 e 7 dias após a TLCA, quando ela é máxima.

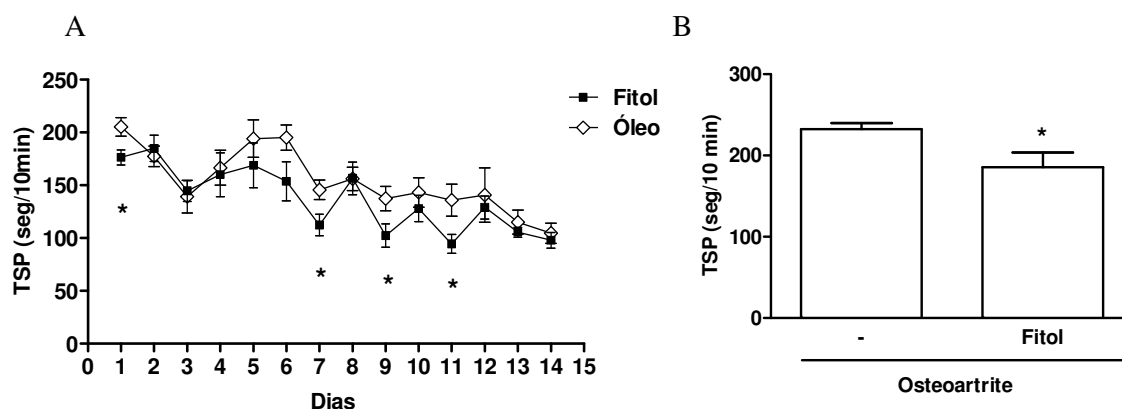


Figura 10- Efeito do fitol sobre a hipernociceção na osteoartrite por TLCA. A osteoartrite foi induzida pela TLCA em ratos e a hipernociceção foi medida através do teste de incapacitação articular (TSP/10 min), a cada dia, a partir da TLCA, por até 14 dias. Os resultados representam o efeito do fitol (170 mg/200 μ L; s.c.) na evolução da hipernociceção ao longo dos 14 dias (A) ou sobre o pico de incapacitação articular, medido entre 4 e 7 d (B). Os dados representam a média \pm e.p.m. do TSP/10 min; n=6/grupo. *P<0,05 comparado a controle (-), que recebeu óleo mineral (200 μ L; s.c.), usando teste t de Student.

5.8. Efeito do fitol sobre a liberação de mediadores inflamatórios na AZy em ratos

Numa tentativa de explorar os mecanismos envolvidos no efeito antiinflamatório e condroprotetor do fitol, investigou-se a liberação de mediadores inflamatórios no lavado articular, obtido após 6 h de indução da AZy. Essa avaliação é particularmente relevante, uma vez que é medida diretamente no lavado articular, refletindo com maior fidedignidade o que deve ocorrer no ambiente articular. Esse fato não ocorreria, por exemplo, caso se tivesse utilizado estimulação celular *in vitro* ou dosagem em sangue periférico. A forma de avaliação aqui usada refletiu ainda o efeito ao nível de síntese proteica e foi quantificada por ELISA. Esses resultados estão ilustrados na figura 11. Os níveis de NO, medidos através da concentração de nitrito (NO_2^-)/nitrito (NO_3^-), mostraram redução significativa (**A**), semelhante ao observado na dosagem de IL-1 β (**B**) e TNF- α (**C**), o que poderia sugerir efeito inespecífico sobre a redução na liberação de citocinas pró-inflamatórias. Questionando essa especulação, os níveis de IL-10, citocina cuja regulação e função se distinguem de IL-1 e TNF, também foram acentuados e significativamente reduzidos (**D**) e os de CINC-1, usados como refletindo os níveis de IL-8, não se modificaram (**E**). A injeção isolada de fitol não alterou a liberação dos mediadores, exceto por provocar elevação nos níveis IL-1 β em animais *naive*.

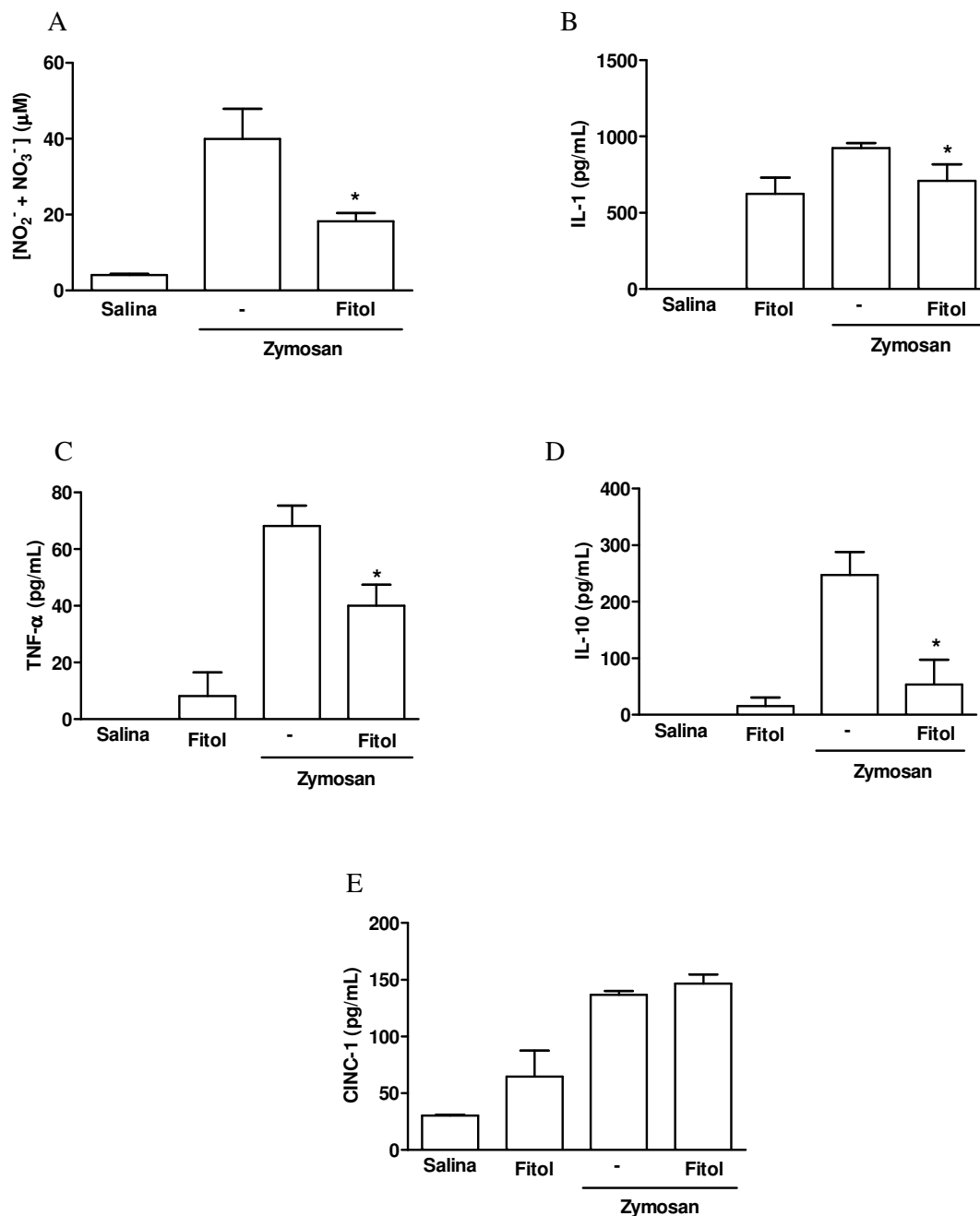


Figura 11- Efeito do fitol sobre a liberação de mediadores inflamatórios na AZy. Ratos receberam 1 mg de zymosan i.art. e os mediadores foram dosados no lavado articular coletado após 6 h. Um grupo recebeu fitol (170 mg/200 µL; s.c.) 5 d antes do zymosan e o controle (-) recebeu óleo mineral (200 µL; s.c.). Os resultados representam média ± e.p.m dos níveis de NO (A), IL-1β (B), TNF-α (C), IL-10 (D) e CINC-1 (E); n=6/grupo. *P<0,05 comparado ao controle, usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

5.9. Efeito do tadalafil sobre a hipernociceção articular e influxo celular (IC) agudo na AZy

Considerando o papel contraditório da via L-arginina-NO-GMPc na hipernociceção, bem como o efeito antinociceptivo de inibidores de 5-fosfodiesterase dependente do modelo experimental (ASOMOZA-ESPINOSA et al., 2001; AMARANTE & DUARTE, 2002) e a escassez de dados demonstrando analgesia pelo tadalafil, investigou-se o efeito do tadalafil em fenômenos inflamatórios. A administração oral de 0,02-0,5 mg/kg de tadalafil, 2 horas após a injeção de 1 mg de zymosan i.art. em ratos, reduziu de forma dose-dependente a hipernociceção articular (TSP) em relação ao controle tratado com salina (Figura 12A). A dose de 0,5 mg/kg reduziu significativamente o TSP na 3ª e 4ª h após a AZy, bem como o IC agudo ($P < 0,05$) (Figura 12B).

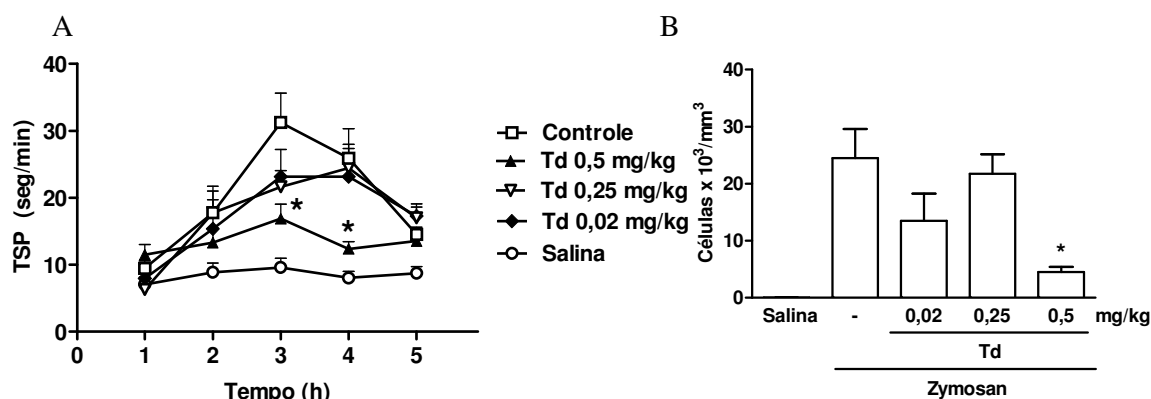


Figura 12- Efeito do tadalafil sobre a hipernociceção e IC agudo na AZy. Ratos receberam 1 mg de zymosan i.art.. A hipernociceção foi medida através do teste de incapacitação articular (TSP/1 min), a cada hora, até 5 horas após injeção de zymosan. Os resultados representam a curva dose-resposta do efeito sistêmico (via oral – v.o.) de tadalafil (Td) (0,02 – 0,5 mg/kg) ou salina (-) 2 h após zymosan i.art. sobre a hipernociceção (A) e IC (B). Os dados representam a média \pm e.p.m. em (A) do TSP e em (B) do número de células $\times 10^3/\text{mm}^3$; $n=6/\text{grupo}$. $*P < 0,05$ comparado a controle (-), usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

5.10. Efeito do tadalafil, SIN-1, ODQ e naloxona sobre a hipernociceção articular e influxo celular (IC) agudo na AZy

Baseado no estudo de Jain et al. (2003), no qual a analgesia da morfina foi revertida pela co-administração de sildenafil e azul de metileno, um inibidor de GMPC, bem como em dados do nosso grupo mostrando ação analgésica de doadores de NO na AZy (ROCHA et al., 2002), decidiu-se investigar os possíveis mecanismos de ação pelos quais tadalafil exercia seus efeitos.

Na figura 13A, a administração oral e terapêutica (2 h após a injeção de zymosan i.art.) de 0,5 mg/kg de tadalafil reduziu significativamente o pico da hipernociceção articular, registrado como o maior valor do TSP entre a 3^a e 4^a h após Zy, fenômeno que foi revertido pela co-administração i.art. de ODQ (1,5 h após o Zy), um inibidor de guanilato ciclase solúvel, sugerindo a participação de GMPC na antinociceção do tadalafil. Entretanto, a co-administração de tadalafil e naloxona intraperitoneal, um antagonista de receptor μ -opioide, não interferiu nesse efeito antinociceptivo, sugerindo que tadalafil não agia via liberação de opioides endógenos. Reproduzindo os resultados publicados pelo nosso grupo, a administração i.art. de SIN-1 (2 h após o Zy), um doador de NO, diminuiu o pico do TSP, ação que foi revertida pelo ODQ ($P < 0,05$).

À semelhança da hipernociceção articular, a co-administração de tadalafil e ODQ reverteu a diminuição do IC agudo promovido pelo tadalafil e sua co-administração com naloxona não alterou o IC. Diferente do observado no TSP, a injeção de SIN-1 ou sua co-administração com ODQ não interferiu no IC (Figura 13B).

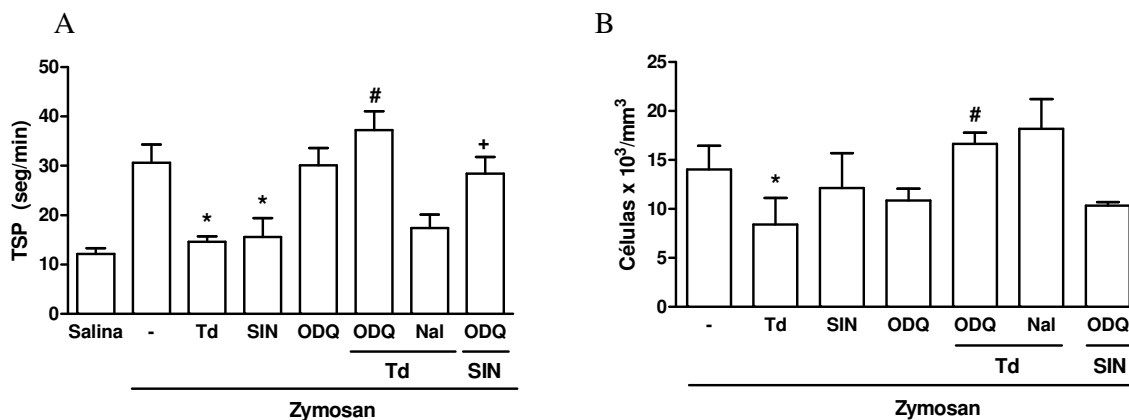


Figura 13- Efeito do tadalafil, SIN-1, ODQ e naloxona sobre a hipernociceção e influxo celular (IC) agudo na AZy. Ratos receberam 1 mg de zymosan i.art.. A hipernociceção foi medida através do teste de incapacitação articular (TSP/1 min), a cada hora, até 6 horas após injeção de zymosan. Os resultados representam o efeito sistêmico (v.o.) de tadalafil (Td) (0,5 mg/kg), SIN-1 (10 µg; i.art.), ODQ (4 µg; i.art) ou salina (-) 2 h após zymosan i.art. sobre a hipernociceção (A) e IC (B). Nas co-administrações, ODQ e naloxona (1 mg; i.p.) foram administrados 1,5 h após zymosan. Os dados representam a média ± e.p.m. em (A) do pico do TSP e em (B) do número de células x 10³/mm³; n=6/grupo. *,#,+ P<0,05 comparado a controle (-) ou tadalafil ou SIN-1, respectivamente, usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

5.11. Efeito do tadalafil sobre a hipernociceção articular na osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA)

De maneira similar ao observado com o fitol, em modelo de osteoartrite por TLCA, os animais tratados com tadalafil, administrado do 4º ao 7º dias da transecção, apresentaram inibição significativa da hipernociceção, conforme ilustrado na figura 14, refletindo o pico de hipernociceção.

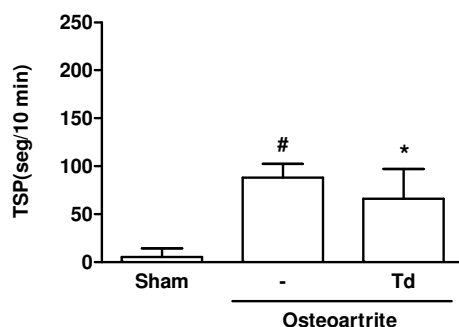


Figura 14- Efeito do tadalafil sobre a hipernociceção na osteoartrite por TLCA. A osteoartrite foi induzida pela TLCA em ratos e a hipernociceção foi medida através do teste de incapacitação articular (TSP/10 min), a cada dia, a partir da TLCA, por até 14 dias. Os resultados representam o efeito do tadalafil (0,5 mg/kg; v.o.) na evolução da hipernociceção sobre o pico de incapacitação articular, medido entre 4 e 7 d. Grupo *sham* foi submetido ao procedimento cirúrgico, sem TLCA. Os dados representam a média \pm e.p.m. do TSP/10 min; $n=6$ /grupo. [#],* $P<0,05$ comparado a *sham* e controle (-), respectivamente, usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

5.12. Efeito do tadalafil sobre a liberação de mediadores inflamatórios na AZy em ratos

À semelhança do realizado com o fitol e dando continuidade à investigação dos mecanismos de ação do tadalafil, avaliou-se o efeito antiinflamatório do tadalafil sobre a liberação de mediadores inflamatórios no lavado articular, obtido após 6 h de indução da AZy. Esses resultados estão ilustrados na figura 15.

Diferente do observado com o fitol, a administração oral e terapêutica (2 h após o zymosan i.art.) do tadalafil não alterou os níveis de IL-1 (A). Entretanto, tadalafil reduziu significativamente os níveis de TNF- α (B) e IL-10 (C), não interferindo nos níveis de CINC-1 (D) ($P < 0,05$).

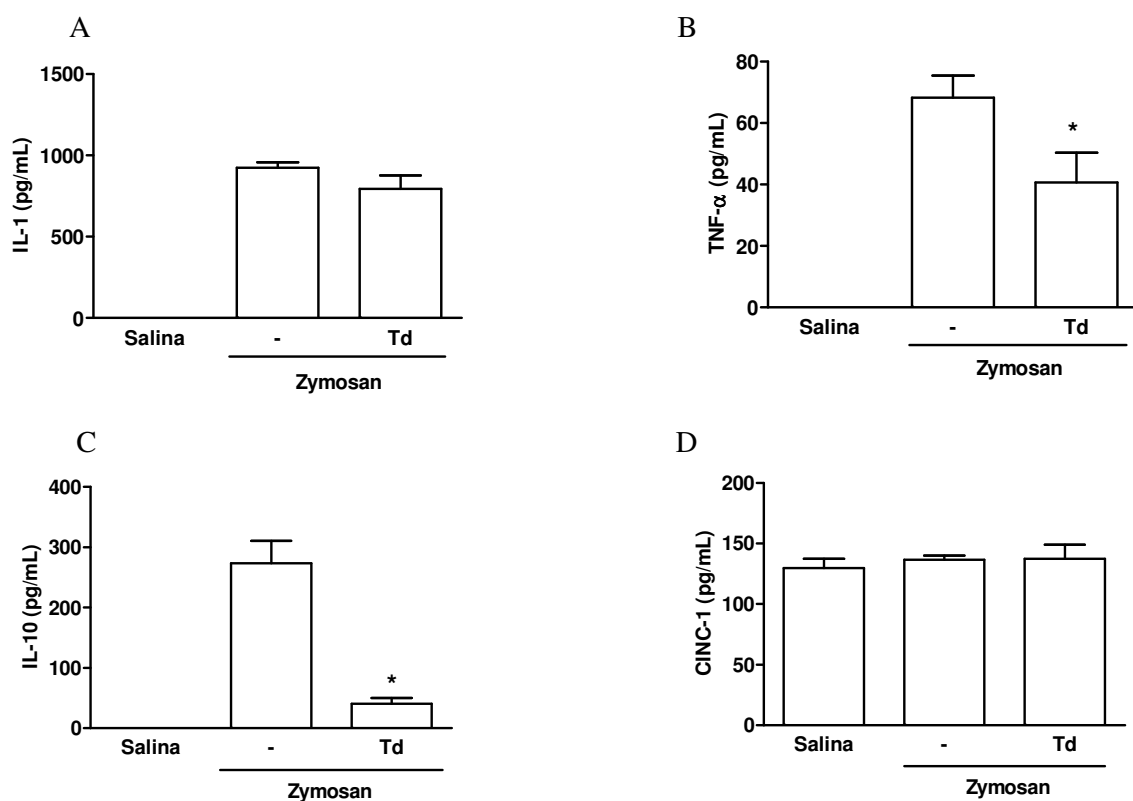


Figura 15- Efeito do tadalafil sobre a liberação de mediadores inflamatórios na AZy. Ratos receberam 1 mg de zymosan i.art. e os mediadores foram dosados no lavado articular coletado após 6 h. Um grupo recebeu tadalafil (0,5 mg/kg) v.o. 2 h após zymosan e o controle (-) recebeu salina. Os resultados representam média \pm e.p.m dos níveis de IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-10 (C) e CINC-1 (D); n=6/grupo. * $P < 0,05$ comparado a controle, usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

6. Discussão

Esse trabalho avaliou os efeitos de um ativador do complexo NADPH oxidase e de um inibidor de 5-fosfodiesterase na modulação de diferentes modelos experimentais. O elo entre esses compostos seria o sistema L-arginina-NO-GMPc, mas os mecanismos distintos envolvidos levaram a discussão dos resultados em duas etapas.

I- Efeito do fitol na modulação de diferentes modelos experimentais

O papel de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) é frequentemente considerado como pró-inflamatório e essas substâncias estão associadas ao desenvolvimento de lesões teciduais em processos flogísticos. Pelo menos no caso de artrites crônicas, essa idéia parece ainda ser preponderante.

De fato, como abordado na introdução desse trabalho, a inibição da óxido nítrico sintase indutível (NOSi) foi realizada como tentativa de se proteger os animais, submetidos à artrite experimental, da lesão da cartilagem (BEZERRA et al., 2004). Essa proposição se baseia no fato de que a produção de grandes quantidades de NO pela NOSi, durante as reações inflamatórias, possibilitaria a sua combinação com outras espécies reativas, como o ânion superóxido (O_2^-), formando peroxinitrito ($ONOO^-$) e promovendo o dano tecidual.

As EROs participam dos mecanismos de defesa contra agentes infecciosos, particularmente bactérias. O sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase), abordado na introdução desse trabalho, é ativamente envolvido na produção dessas substâncias. Ao lado desse papel protetor, a superprodução dessas espécies reativas, em situações inflamatórias como artrites crônicas, tem sido associada ao dano tecidual.

O gene *Ncf1* (*neutrophil cytosolic factor 1*) codifica a proteína Ncf1 (ou p47^{phox}), uma das subunidades do sistema NADPH oxidase, envolvida na transferência de um elétron para a redução do oxigênio (O_2) e formação de O_2^- . Surpreendentemente, identificou-se que esse gene está relacionado à gravidade da artrite induzida por pristano, de modo que animais *knock-out* para *Ncf1* apresentaram maior intensidade de sinovite, dano à cartilagem articular e erosão do osso subcondral. Esse efeito foi associado a um menor *burst* oxidativo, o que se opõe à ideia comum de que níveis elevados de espécies reativas promovem inflamação e lesão tissular (VAN DE LOO et al., 2003).

Essa breve introdução tem o intuito de apresentar o resumo da primeira etapa dos resultados desse trabalho, no qual foi demonstrado que animais submetidos à artrite ou

peritonite induzida por zymosan, quando tratados com fitol, um agente ativador da atividade de NADPH oxidase, apresentaram redução dos índices de inflamação. Esse efeito foi medido por queda na migração celular, tanto na fase aguda quanto crônica, inibição da hipernocicepção e reversão da lesão da matriz da cartilagem articular. A dosagem de mediadores inflamatórios, liberados na articulação dos animais submetidos à artrite induzida por zymosan (AZy), mostrou redução de citocinas pró-inflamatórias, bem como de NO. Em conjunto, os resultados corroboram com o papel antiinflamatório proposto para EROs, conforme supracitado. Como contribuição original, foi demonstrado que esses efeitos são dependentes do bloqueio da produção local de citocinas e ocorrem independente da espécie, estímulo, tecido avaliado ou via de administração.

A administração subcutânea e profilática do fitol promoveu redução do influxo celular agudo e crônico, tanto em ratos quanto em camundongos. Uma cinética do efeito do fitol em camundongos mostrou que a injeção 6, 12 ou 24 horas antes da AZy promoveu uma significativa, embora semelhante, redução da migração celular aguda, medida no lavado articular após 6 horas de artrite. Ainda, a curva dose-resposta mostrou que três doses (8,5; 21,25 e 42,5 mg) produziram efeito semelhante quando administradas 6 horas antes da AZy. Em ratos, de forma similar ao relatado na literatura (OLOFSSON et al., 2003), o melhor efeito foi conseguido quando se administrou o fitol 5 dias antes da indução da artrite. Vale ressaltar que o volume de fitol, fornecido como uma preparação oleosa (200 µL – equivale a 170 mg do composto ativo), injetado em ratos foi o mesmo utilizado no modelo de artrite induzida por pristano (OLOFSSON et al., 2003).

O objetivo desse trabalho foi utilizar o fitol como ferramenta para entender o possível papel protetor da ativação do sistema NADPH oxidase na AZy. Assim, a administração profilática e terapêutica local (intra-articular) do fitol foi efetiva em reduzir parâmetros inflamatórios, tanto em ratos quanto em camundongos. É interessante ressaltar que a redução da migração celular observada ocorreu tanto quando o fitol foi injetado subcutâneo quanto intra-articular. Em estudo anterior, na artrite induzida por pristano, o fitol foi mais efetivo quando injetado pela via subcutânea, em comparação à injeção intraperitoneal ou intra-nasal (HULTQVIST et al., 2006).

O fato de se ter observado bloqueio da migração celular com a administração intra-articular, mesmo quando o fitol foi dado após a indução da artrite, isto é, uma intervenção terapêutica, diferente da via sistêmica subcutânea, que funcionou apenas de forma profilática, sugere fortemente ação local do fitol sobre células residentes sinoviais. Considerando que os macrófagos sinoviais expressam aumento da NOSi na AZy e

osteoartrite em ratos, como nosso grupo demonstrou em estudos anteriores (BEZERRA et al., 2004; CASTRO et al., 2006), pode-se especular que essas células seriam o alvo do fitol injetado intra-articular. Entretanto, a comprovação desse dado demanda ainda investigação.

É interessante notar que os efeitos observados na fase crônica da AZy foram obtidos após uma única administração do fitol, sugerindo um efeito duradouro na modulação da resposta inflamatória. Embora esse resultado seja aparentemente surpreendente, foi demonstrado que o aumento do *burst* oxidativo, após a administração do fitol, ocorre no primeiro dia após a sua injeção e persiste por pelo menos 7 semanas, em neutrófilos de ratos (OLOFSSON et al., 2003). Os resultados aqui observados confirmam esse efeito duradouro. Os neutrófilos têm sido as células mais diretamente relacionadas aos efeitos do fitol, uma vez que linfócitos T do sangue periférico de ratos não apresentaram atividade oxidativa, após a estimulação com PMA (13-acetato 12-miristato de forbol), um ativador de NADPH oxidase, quando comparados a neutrófilos (GELDERMAN et al., 2006).

O fato de se ter conseguido efeito com a administração intra-articular de fitol na AZy leva a especular que células residentes sinoviais também podem ser alvo do efeito do fitol. A membrana sinovial é composta basicamente de sinoviócitos do tipo A e B, os primeiros com características fenotípicas de macrófagos e os últimos semelhantes a fibroblastos. Há ainda células dendríticas e mastócitos, com as primeiras estando envolvidas primordialmente com os mecanismos de apresentação de antígeno.

Considerando o potencial de produção de NO e espécies reativas por macrófagos sinoviais, pode-se sugerir que o fitol, além de agir sobre os neutrófilos circulantes e migrantes para o foco da artrite, atua nos sinoviócitos do tipo A, interferindo na iniciação e perpetuação da resposta inflamatória local. Proposição semelhante pode ser feita para o caso da cavidade peritoneal, uma vez que células residentes peritoneais, particularmente macrófagos, estão envolvidas nos processos de migração e dor inflamatória em peritonite experimental (RIBEIRO et al., 2000). De fato, os resultados aqui obtidos, mostrando redução da migração celular em camundongos submetidos à peritonite induzida por zymosan ou no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, respectivamente, reforçam essa possibilidade.

Em conjunto, os dados obtidos nos modelos experimentais aqui estudados mostram a atividade inespecífica e sistêmica da ativação do sistema NADPH oxidase, decorrente da injeção do fitol. Essa atividade promove efeitos antiinflamatórios em ambas as espécies, ratos e camundongos, em diferentes estímulos inflamatórios, zymosan e ácido acético, e em dois sítios distintos, as cavidades articular e peritoneal. Nesse último aspecto,

nosso grupo de pesquisa mostrou recentemente que o efeito da administração de inibidores de NOS sobre a migração celular varia conforme o tecido estudado. Assim, ratos submetidos à artrite induzida por zymosan ou lipopolissacarídeo (LPS) e pré-tratados com inibidores de NOSi apresentaram redução da migração de neutrófilos, ao passo que, quando submetidos à peritonite pelos mesmos estímulos, ocorreu aumento do número de células migradas para a cavidade peritoneal (LEITE et al., 2009).

Apesar dos avanços, o tratamento das artropatias crônicas inflamatórias necessita de medicamentos que alterem de forma definitiva a sua evolução. Esse fato é particularmente verdade no que se refere à osteoartrite. Considerada inicialmente como uma doença de desgaste articular, sabe-se hoje que a osteoartrite apresenta sinovite, com participação de mediadores inflamatórios, embora em uma magnitude aparentemente menor do que o que ocorre na artrite reumatoide. Uma das necessidades não atendidas no tratamento da osteoartrite são as drogas ditas condroprotetoras que exerceriam papel modificador da evolução da doença, impedindo a progressão do dano à matriz da cartilagem articular. Fato semelhante pode ser dito em relação à lesão da cartilagem articular e degradação do osso subcondral na artrite reumatoide, embora o advento das DMARDs (Drogas antireumáticas modificadoras da doença) e dos biológicos modificadores da resposta tenha alterado significativamente a evolução dessa doença.

A relevância desse último aspecto pode ser vista até mesmo nos estudos com artrite induzida por pristano, em que se buscou demonstrar que o efeito protetor do dano histológico pela injeção de fitol era semelhante ao observado em animais tratados com metotrexato ou etanercepte, um receptor solúvel de TNF usado na prática clínica para o tratamento de pacientes com artrite reumatoide (HULTQVIST et al., 2006). Entretanto, esses autores não analisaram diretamente o dano à cartilagem articular, uma vez que os resultados avaliaram a intensidade da sinovite e quantificação de COMP (proteína oligomérica da matriz da cartilagem), utilizado como parâmetro de lesão estrutural da matriz da cartilagem. Considerando que é possível se bloquear a sinovite sem alterar a progressão da lesão, o efeito condroprotetor precisaria ser demonstrado.

Na tentativa de se demonstrar esse efeito modificador (condroprotetor), avaliou-se a matriz da cartilagem articular dos animais submetidos à AZy e pré-tratados com o fitol. Os resultados mostraram reversão da lesão da cartilagem nos animais tratados com fitol, através da determinação da concentração de condroitin sulfato por miligrama de cartilagem extraída, sugerindo proteção do dano estrutural. Estendendo essas observações em artrite experimental, os resultados revelaram ainda que ratos submetidos ao modelo de osteoartrite

por transecção do ligamento cruzado anterior apresentaram significativa redução da hipernocicepção, quando tratados com fitol. Não foi possível obter resultados de condroproteção no modelo de osteoartrite. A razão é que o tempo necessário – 70 dias – de observação nesse modelo faz necessário estudar a cinética da administração do fitol com tão longo intervalo de tempo.

Prosseguindo na busca de oferecer mecanismos de ação para o efeito do fitol, foram medidos os níveis de mediadores inflamatórios liberados no lavado articular de ratos submetidos à AZy. Buscou-se realizar a medida de superóxido, através do método de redução do ferricitocromo C, usando as células do lavado articular, mas não foi possível obter níveis mensuráveis nos animais do grupo controle.

Uma alternativa indireta para ver o efeito do fitol sobre a produção de EROs seria medir os níveis de NO no lavado articular, o que foi feito pela determinação da concentração de nitrito/nitrato. Como esperado, a administração do fitol reduziu de forma significativa esses níveis. Acredita-se que esse resultado se deve ao efeito do fitol em reduzir a migração de polimorfonucleares para a articulação, uma vez que essas células são as maiores fontes de NO liberado a nível intra-articular na AZy. Entretanto, é possível que o fitol tenha inibido a atividade de NOS em macrófagos sinoviais, o que contribuiria para esse efeito de redução nos níveis de NO.

Foi observada ainda a diminuição dos níveis de TNF- α , IL-1 e IL-10 pelo fitol. A injeção isolada de fitol não alterou a liberação dos mediadores, exceto por provocar elevação dos níveis de IL-1 β em animais *naive*. Até o momento, não foi possível ainda ser esclarecido esse aumento. Essa é a primeira demonstração da redução de liberação de citocinas *in vivo* em artrite por um agente ativador de NADPH oxidase. Esse efeito surge como um possível mecanismo de ação do fitol como um agente antiinflamatório e condroprotetor. Esses dados estão de acordo com a demonstração *in vitro* de que camundongos *knock-out* para p47^{phox} ou gp91^{phox}, proteínas envolvidas com a atividade da NADPH oxidase, apresentaram aumento na expressão gênica nas células sinoviais para TNF- α , IL-1 β , metaloproteinase de matriz-3 (MMP-3), MMP-9 e, talvez mais relevante, do ativador do receptor do ligante de NF- κ B (RANK-L). O RANK-L está diretamente envolvido com os mecanismos de reabsorção óssea, particularmente os de natureza inflamatória (VAN DE LOO et al., 2003).

Os resultados obtidos com as dosagens, mostrando redução dos níveis intra-articulares dessas citocinas, sugerem que o efeito ocorre em nível proteico, embora não se possa descartar a possibilidade de inibição da expressão dos genes dessas proteínas. Em

conjunto, os dados sugerem uma relevância da atividade do complexo NADPH oxidase na fisiopatologia de artropatias crônicas inflamatórias.

A redução na produção de IL-10, por definição considerada didaticamente como citocina antiinflamatória, pode ser decorrente de um efeito inespecífico do fitol sobre as células sinoviais, residentes ou migradas, bem como sobre a proliferação e ativação linfocitária local, promovendo uma redução indiscriminada (inespecífica) e uma diminuição geral de citocinas. Entretanto, o fato de que a liberação do quimioatraente neutrofílico-1 (CINC-1) no lavado articular não foi alterada pelo fitol se opõe a essa proposição. CINC-1, em ratos, é considerada análoga à IL-8 em humanos e camundongos e tem seu mecanismo distinto das citocinas ditas pró-inflamatórias. Nesse momento, não se dispõe de proposições para especular sobre os mecanismos envolvidos nesse achado.

II – Efeito do tadalafil em artrites

Nesse trabalho, os resultados obtidos, após a administração do tadalafil em animais submetidos à AZy, revelaram inibição da nocicepção e da migração de neutrófilos na fase aguda do modelo. O tadalafil foi administrado por via oral, de forma terapêutica, isto é, 2 horas após a injeção do zymosan, e seu efeito foi associado à redução dos níveis de TNF- α no lavado articular. Mais interessante, o efeito antinociceptivo do tadalafil se observou também no modelo de osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior, revelando a possibilidade de ter vias comuns nos mecanismos de nocicepção em modelos de artrite. Essa suposição parece independe da participação de polimorfonucleares neutrófilos, células exuberantes na AZy e praticamente inexistentes no modelo de osteoartrite (CASTRO et al., 2006).

Baseado nos dados já publicados, parece não haver relatos de efeito analgésico *per se* para o tadalafil. Em pacientes com dor complexa regional, há um relato de alívio pelo tadalafil, mas esse efeito foi atribuído a alterações microvasculares ao invés de uma ação analgésica direta (GROENEWEG et al., 2008).

Conforme abordado na introdução, o efeito do sistema L-arginina-NO em dor é motivo de controvérsia. Como exemplo, o doador de NO 3-morfolinossidnonimina (SIN-1) produziu analgesia ou hipernocicepção em ratos a depender da dose e modelo estudado (SOUSA & PRADO, 2001). Em estudo anterior do nosso grupo, foi demonstrado que ocorre aumento dos níveis de NO intra-articular, durante a evolução do modelo de osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior em ratos, e que esse efeito se associa a aumento da

atividade de NOS_i em sinoviócitos. Entretanto, inibidores de NOS não bloqueiam a hipernocicepção quando administrados de forma terapêutica (CASTRO et al., 2006).

O papel do sistema L-arginina-NO na dor em osteoartrite ainda está por ser esclarecido. É possível que a hipernocicepção associada ao aumento dos níveis de NO seja decorrente da formação de agentes oxidantes como peroxinitrito. No modelo de AZy, foi demonstrado que o bloqueio da formação de peroxinitrito promoveu antinocicepção (BEZERRA et al., 2004). Considerando que existem vias comuns em modelos de osteoartrite e AZy, pode-se especular que EROs ou ERNs participem dos mecanismos de dor em osteoartrite.

O efeito antinociceptivo e de inibição da migração de neutrófilos pelo tadalafil foi revertido pela administração do composto ODQ, sugerindo que o mecanismo envolvido nessa analgesia é via ativação de GMPc, similar ao relatado na literatura para o mecanismo de antinocicepção pelo SIN-1 (ROCHA et al., 2002). Resultados similares foram descritos para o sildenafil, demonstrando que o aumento da atividade antinociceptiva da morfina promovida pelo sildenafil foi revertida quando se co-administrou azul de metileno, usado como um inibidor de GMPc (JAIN et al., 2003). Nesse mesmo estudo, a administração de naloxona, um antagonista de receptor μ -opioide, reverteu o efeito antinociceptivo do sildenafil. No presente trabalho, a co-administração de naloxona não reverteu os efeitos do tadalafil, levando-se a sugerir que seu efeito independe da liberação de opioides endógenos.

No intuito de se avançar nos mecanismos envolvidos na antinocicepção promovida pelo tadalafil, os níveis intra-articulares de citocinas foram avaliados. O tratamento com tadalafil reduziu os níveis de TNF- α , sem alterar os de IL-1 β ou CINC-1. Esse resultado é original em demonstrar que um inibidor de 5-fosfodiesterase produz efeito *in vivo*, reduzindo a liberação de TNF- α , e que esse efeito ocorre paralelo à sua ação antinociceptiva, revelando associação entre esses fenômenos.

A liberação de uma cascata de citocinas tem como conseqüência a sensibilização de nociceptores (CUNHA et al., 1991), de modo que TNF- α induz a liberação de IL-1 β e IL-6, associado à produção de outros mediadores como produtos da ciclo e lipoxigenases. Particularmente, o TNF- α pode promover a liberação de IL-8, citocina associada à ativação de aminas simpatomiméticas (CUNHA et al. 1992). Em ratos, CINC-1 é considerada a correspondente da IL-8 em camundongos e humanos, estando diretamente relacionada ao desenvolvimento de hiperalgesia inflamatória em ratos (CUNHA et al., 2008). No presente

estudo, a administração de tadalafil não alterou os níveis de CINC-1, descartando esse mecanismo como tentativa de se explicar os efeitos antiinflamatórios observados.

Considerando a rica irrigação sinovial, é razoável supor que o efeito do tadalafil se dê sobre células endoteliais na sinóvia. Entretanto, a expressão da 5-fosfodiesterase na articulação só foi demonstrada, até o presente momento, em condrócitos, após a estimulação com IL-1 (GENG et al., 1998). Em uma linhagem de células sinoviais, também foi identificada a atividade de 5-fosfodiesterase (KIM et al., 2008), levando-se a especular que o efeito antiinflamatório do tadalafil em artrite ocorra por ação em sinoviócitos, condrócitos e, possivelmente, células endoteliais.

Em resumo, os resultados aqui apresentados mostram que fitol, um ativador de NADPH oxidase, promove efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos independente da espécie, estímulo, tecido e via de administração. Essas ações se associam à redução na liberação local de NO e citocinas. Paralelamente, tadalafil tem efeito antiinflamatório e antinociceptivo similar, associado ao bloqueio na liberação local de TNF. Esses achados sugerem que ativadores de NADPH oxidase, possivelmente a partir de compostos da dieta, modifiquem a história natural de artropatias inflamatórias. O efeito antinociceptivo de inibidores de 5-fosfodiesterase deve ser explorado, uma vez que esses compostos encontram progressiva indicação em patologias inflamatórias que cursam com dano vascular e hipóxia.

7. Conclusões

A partir dos resultados obtidos com fitol e tadalafil, as seguintes conclusões podem ser obtidas:

- Fitol exerce efeito antiinflamatório em modelos de AZy, peritonite induzida por zymosan, em ratos e camundongos, reduzindo o influxo celular nas fases aguda e crônica;

- Fitol tem efeito analgésico em modelo de AZy, contorção abdominal por ácido acético e osteoartrite por TLCA;

- Fitol é protetor da lesão da cartilagem articular na AZy;

- Fitol reduz os níveis intra-articulares de NO, IL-1 e TNF- α na AZy, o que se associa com sua ação antiinflamatória;

- Tadalafil tem efeitos antiinflamatórios terapêuticos *in vivo* na AZy, reduzindo o influxo celular na fase aguda;

- Tadalafil tem efeito analgésico em modelos de AZy e osteoartrite por TLCA, estando associado à ativação de GMPc no neurônio nociceptivo e diminuição da liberação de TNF- α . Esse efeito não envolve a liberação de opioides endógenos.

Referências bibliográficas

AFONSO, V., CHAMPY, R., MITROVIC, D., COLLIN, P., LOMRI, A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. **Joint Bone Spine**, v. 74, n. 4, p. 324-329, 2007.

AGO, T., FUTOSHI, K., HIDEKAZU, H., RYU, T., TAKASHI, I., DAISUKE, K., HIDEKI, S. Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 8, p. 4474-4479, 2003.

ALAAEDDINE, N., DI BATTISTA, J.A., PELLETIER, J.P., KIANSA, K., CLOUTIER, J.M., MARTEL-PELLETIER, J. Differential effects of IL-8, LIF (pro-inflammatory) and IL-11 (anti-inflammatory) on TNF-alpha-induced PGE(2) release and on signaling pathways in human OA synovial fibroblasts. **Cytokine**, v. 11, n. 12, p. 1020-1030, 1999.

AMARANTE, L.H., DUARTE, I.D. The kappa-opioid agonist (+/-)-bremazocine elicits peripheral antinociception by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 454, n. 1, p. 19-23, 2002.

AMBRIZ-TUTUTI, M., VELÁZQUEZ-ZAMORA, D.A., URQUIZA-MARÍN, H., GRANADOS-SOTO, V. Analysis of the mechanism underlying the peripheral antinociceptive action of sildenafil in the formalin test. **European Journal of Pharmacology**, v. 512, p. 121-127, 2005.

ARMANDA, L., CARAMES, B., CILLERO-PASTOR, B., BLANCO GARCIA, F.J. Fisiopatología de la artrosis: ¿cuál es la actualidad?. **Revista Española de Reumatología**, v. 31, n. 6, p. 379-393, 2004.

ASADA, S., FUKUDA, K., NISHISAKA, F., MATSUKAWA, M., HAMANISI, C. Hydrogen peroxide induces apoptosis of chondrocytes: involvement of calcium ion and extracellular signal-regulated protein kinase. **Inflammation Research**, v. 50, n. 1, p. 19-23, 2001.

ASOMOZA-ESPINOSA, R., ALONSO-LÓPEZ, R., MIXCOATL-ZECUATL, T., AGUIRRE-BAÑUELOS, P., TORRES-LÓPEZ, J.E., GRANADOS-SOTO, V. Sildenafil increases diclofenac antinociception in the formalin test. **European Journal of Pharmacology**, v. 418, p. 195-200, 2001.

BABIOR, B. M., KIPNES, R. S., CURNUTTE, J. T. Biological defense mechanisms: production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 52, n. 3, p. 741-744, 1973.

BAR-SHAI, M., REZNICK, A.Z. Reactive nitrogen species induce nuclear factor-kappa-B-mediated protein degradation in skeletal muscle cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, n. 12, p. 2112-2125, 2006.

BAXTER, JH., STEINBERG, D., MIZE, C.E., AVIGAN, J. Absorption and metabolism of uniformly ^{14}C -labeled phytol and phytanic acid by the intestine of the rat studied with thoracic duct cannulation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v.137, p. 277-290, 1967.

BAXTER, J.H. Absorption of chlorophyll phytol in normal man and in patients with Refsum's disease. **Journal of Lipid Research**, v. 9, p. 636-641, 1968.

BEAVO, J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiological Reviews**, v. 75, p. 725-745, 1995.

BECKMAN, J.S., YE, Y.Z., ANDERSON, P.G., CHEN, J., ACCAVITTI, M.A., TARPEY, M.M., WHITE, C.R. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 375, n. 2, p. 81-88, 1994.

BERGENDI, L., BENES, L., DURACKOVA, Z., FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sciences**, v. 65, p. 1865-1874, 1999.

BETTERIDGE, D.J. What is oxidative stress? **Metabolism**, v. 49, p. 3-8, 2000.

BEZERRA, M.M., BRAIN, S.D., GREENACRE, S., JERONIMO, S.M., de MELO, L.B., KEEBLE, J., ROCHA, F.A.C. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 172-182, 2004.

BEZERRA, M.M., BRAIN, S.D., GIRÃO, V.C.C., GREENACRE, S., KEEBLE, J., ROCHA, F.A.C. Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 374, n. 4, p. 265-273, 2007.

BLOUNT, M.A., BEASLEY, A., ZORAGHI, R., SEKHAR, K.R., BESSAY, E.P., FRANCIS, S.H., CORBIN, J.D. Binding of tritiated sildenafil, tadalafil, or vardenafil to the phosphodiesterase-5 catalytic site displays potency, specificity, heterogeneity and cGMP stimulation. **Molecular Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 144-152, 2004.

BOKOCH, G. M., KNAUS, U.G. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, p. 502-508, 2003.

BOLANOS, J.P., HEALES, S.J., LAND, J.M., CLARCK, J.B. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: Differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, n. 5, p. 1965-1972, 1995.

BOOLELL, M., GEPI-ATTEE, S., GINGELL, J.C., ALLEN, M.J. Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. **British Journal of Urology**, v. 78, p. 257-261, 1996.

BRAHN, E. Animals models of rheumatoid arthritis: clues to etiology and treatment. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 265, p. 42-53, 1991.

BRITTON, T.C., GIBBERD, F.B., CLEMENS, M.E., BILLIMORIA, J.D., SIDEY, M.C. The significance of plasma phytanic acid levels in adults. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 52, p. 891-894, 1989.

BROWN, P.J., MEI, G., GIBBERD, F.B., BURSTON, D., MAYNE, P.D., MCCLINCHY, J.E., SIDEY, M.C. Diet and Refsum's disease. The determination of phytanic acid and phytol in certain foods and application of this knowledge to the choice of suitable convenience foods for patients with Refsum's disease. **Journal of Human Nutrition Dietetics**, 6: 295-305, 1993.

BYLUND, J., GOLDBLATT, D. and SPEERT, D.P. Chronic granulomatous disease: from genetic defect to clinical presentation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 568, p. 67-87, 2005.

CASTRO, R.R., CUNHA, F.Q., SILVA JR, F.S., ROCHA, F.A.C. A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis - evidence of a role for nitric oxide. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, p. 769-776, 2006.

CHANG, Y.H., PEARSON, C.M., ABE, C. Adjuvant polyarthritis IV: induction by a synthetic adjuvant: immunologic, histopathologic and other studies. **Arthritis & Rheumatism**, v. 23, n. 1, p. 62-71, 1980.

CHENEVIER-GOBEAUX, C., LEMARECHAL, H., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., POIRAUDEAU, S., EKINDJIAN, O.G., BORDERIE, D. Superoxide production and NADPH oxidase expression in human rheumatoid synovial cells: regulation by interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α . **Inflammation Research**, v. 55, n. 11, p. 483-490, 2006.

CHINETTI, G., FRUCHART, J.C., STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. **Inflammation Research**, v. 49, n. 10, p. 497-505, 2000.

CLANCY, R.M., REDISKE, J., TANG, X., NIJHER, N., FRENKEL, S., PHILIPS, M., ABRAMSON, S.B. Outside-in signaling in the chondrocyte. Nitric oxide disrupts fibronectin-induced assembly of a subplasmalemmal actin/rho A/focal adhesion kinase signaling complex. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 7, p. 1789-1796, 1997.

COMSTOCK, G.W., BURKE, A.E., HOFFMAN, S.C., HELZLOUER, K.J., BENDICH, A., MASI, A.T., NORKUS, E.P., MALAMET, R.L., GERSHWIN, M.E. Serum concentrations of α -tocopherol, β -carotene, and retinol preceding the diagnosis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 56, p. 323-325, 1997.

CONNER, E.M., GRISHAM, M.B. Inflammation, free radicals, and antioxidants. **Nutrition**, v. 12, p. 274-277, 1996.

- CROSS, A. R., SEGAL, A.W. The NADPH oxidase of professional phagocytes: prototype of the NOX electron transport chain systems. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1657, p. 1–22, 2004.
- CUNHA, F.Q., LORENZETTI, B.B., POOLE, S., FERREIRA, S.H. Interleukyn-8 as a mediator of sympathetic pain. **British Journal of Pharmacology**, v. 104, p. 765-767, 1991.
- CUNHA, F.Q., POOLE, S., LORENZETTI, B.B., FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, n. 3, p. 660-664, 1992.
- CUNHA, T.M., VERRI, W.A.Jr., SCHIVO, I.R., NAPIMOGA, M.H., PARADA, C.A., POOLE, S., TEIXEIRA, M.M., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 824-832, 2008.
- CUZZOCREA, S., MCDONALD, M.C., MOTA-FILIFE, H., MAZZON, E., COSTANTINO, G., BRITTI, D., MAZZULLO, G., CAPUTI, A. P., THIEMERMANN, C. Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of collagen-induced arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 43, n. 2, p. 320-328, 2000.
- CUZZOCREA, S., MAZZON, E., di PAOLA, R., GENOVESE, T., MUIA, C., CAPUTI, A.P., SALVEMINI, D. Synergistic interaction between methotrexate and a superoxide dismutase mimetic: pharmacologic and potential clinical significance. **Arthritis & Rheumatism**, v. 52, n. 12, p. 3755-3760, 2005.
- DAI, L., CLAXSON, A., MARKLUND, S.SL., FEAKINS, R., YOUSAF, N., Y CHERNAJOVSKY, Y., WINYARD, P.G. Amelioration of antigen-induced arthritis in rats by transfer of extracellular superoxide dismutase and catalase genes. **Gene Therapy**, v. 10, p. 550–558, 2003.
- DARLINGTON, L.G., STONE, T.W. Antioxidants and fatty acids in the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders. **British Journal of Nutrition**, v.85, n. 3, p. 251-269, 2001.
- DAVIS, R., ROSENTHAL, K., CESARIO, L., ROUW, G. Vitamin C influence on localized adjuvant arthritis. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 80, p. 414-418, 1990.
- DENG, Y-M., XIE, Q-M., TANG, H-F., SUN, J-G., DENG, J-F., CHEN, J-Q., YANG, S-Y. Effects of ciclamilast, a new PDE 4 PDE4 inhibitor, on airway hyperresponsiveness, PDE4D expression and airway inflammation in a murine model of asthma. *European Journal of Pharmacology*, v. 547, n. 1-3, p. 125–135, 2006.
- DOBASHI, K., GHOSH, B., ORAK, J.K., SINGH, I., SINGH, A.K. Kidney ischemia-reperfusion: modulation of antioxidant defenses. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 205, p. 1–11, 2000.

DOWLING, E.J., WINROW, V.R., MERRY, P., BLAKE, D.R. Oxidants, joint inflammation and anti-inflammatory strategies. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 264, p. 463-474, 1990.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUMONDE, D.C., GLYNN, L.E. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction fibrin. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 43, p. 373-383, 1962.

DUSI, S., DONINI, M., ROSSI, F. Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p40phox, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47phox or p67phox. **Biochemical Journal**, v. 314, p. 409-412, 1996.

ELLINGHAUS, P., WOLFRUM, C., ASSMANN, G., SPENER, F., SEEDORF, U. Phytanic acid activates the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in sterol carrier protein 2-/sterol carrier protein x-deficient mice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 5, p. 2766-2772, 1999.

FLETCHER, D.S., WIDMER, W.R., LUELL, S., CHRISTEN, A., OREVILLO, C., SHAH, S., VISCO, D. Therapeutic administration of a selective inhibitor of nitric oxide synthase does not ameliorate the chronic inflammation and tissue damage associated with adjuvant-arthritis in rats. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 284, n. 2, p. 714-721, 1998.

FRANCISCHI, J.N., YOKORO, C.M., POOLE, S., TAFURI, W.L., CUNHA, F.Q., TEIXEIRA, M.M. Anti-inflammatory and analgesic effects of the phosphodiesterase 4 inhibitor rolipram in a rat model of arthritis. *European Journal of Pharmacology*, v. 399, p. 243-249, 2000.

FRASNELLI, M.E., TARUSSIO, D., CHOBASZ-PÉCLAT, V., BUSSO, M., SO, A. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Research Therapy**, v. 7, p. R370-R379, 2005.

FURST, D.E., KEYSTONE, E.C., FLEISCHMANN, R., MEASE, P., BREEDVELD, F.C., SMOLEN, J.S., KALDEN, J.R., BRAUN, J., BRESNIHAN, B., BURMESTER, G.R., De BENEDETTI, F., DÖRNER, T., EMERY, P., GIBOFSKY, A., KAVANAUGH, A., KIRKHAM, B., SCHIFF, M.H., SIEPER, J., SINGER, N., Van RIEL, P.L., WEINBLATT, M.E., WEISMAN, M.H., WINTHROP, K. Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases, 2009. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, p. i2-i29, 2010.

GELDERMAN, K.A., HULTQVIST, M., HOLMBERG, J., OLOFSSON, P., HOLMDAHL, R. T cell surface redox levels determine T cell reactivity and arthritis susceptibility. **PNAS**, v. 103, n. 34, 2006.

GENG, Y., ZHOU, L., THOMPSON, W.J., LOTZ, M. Cyclic GMP and cGMP-binding phosphodiesterase are required for interleukin-1-induced nitric oxide

synthesis in human articular chondrocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 27484–27491, 1998.

GHOSH, P., CHERAS, P.A. Vascular mechanisms in osteoarthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 15, n. 5, p. 693-709, 2001.

GLOERICH, J., van den BRINK, D.M., RUITER, J.P.N., van VLIES, N., VAZ, F.M., WANDERS, R.J.A., FERDINANDUSSE S. Metabolism of phytol to phytanic acid in the mouse, and the role of PPAR α in its regulation. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 1, p. 77-85, 2007.

GLOSSMANN, H., PETRISCHOR, G., BARTSCH, G. Molecular mechanisms of the effects of sildenafil. **Experimental Gerontology**, v. 34, p. 305-318, 1999.

GOEKOOP-RUITERMAN, Y.P.M., de VRIES-BOUWSTRA, J.K., ALLAART, C.F., van ZEBEN, D. KERSTENS, P.J., HAZES, J.M., ZWINDERMAN, A.H., RONDAY, H.K., HAN, K.H., WESTEDT, M.L., GERARDS, A.H., van GROENENDAEL, J.H., LEMS, W.F., van KRUGTEN, M.V., BREEDVELD, F.C., DIJKMANS, B.A. Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the BeSt study): a randomized, controlled trial. **Arthritis & Rheumatism**, v. 52, p. 3381–3390, 2005.

GOTO, T.S., TAKAHASHI, N., KATO, S., EGAWA, K., EBISU, S., MORIYAMA, T., FUSHIKI, T., KAWADA, T. Phytol directly activates peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and regulates gene expression involved in lipid metabolism in PPAR α -expressing HepG2 hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, n. 2, p. 440–445, 2005.

GRIENDLING, K.K., SORESCU, D., LASSÈGUE, B., USHIO-FUKAI, M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 20, n. 10, p. 2175–2183, 2000.

GUTTERIDGE, J.M, MITCHELL, J. Redox imbalance in the critically ill. **British Medical Bulletin**, v. 55, p. 49-75, 1999.

HADDAD, J.J., LAND, S.C., TARNOW-NORDI, W.O., ZEMBALA, M., KOWALCZYK, D., LAUTERBACH, R. Immunopharmacological potential of selective phosphodiesterase inhibition. I. Differential regulation of lipopolysaccharide-mediated proinflammatory cytokine (interleukin-6 and tumor necrosis factor- α) biosynthesis in alveolar epithelial cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, p. 559-566, 2002.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant? **Free Radical Research Communications**, v. 9, p. 1–32, 1990.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3^a ed. Oxford University Press, 1999.

HELIOVARA, M., KNEKT, P., AHO, K., AARAN, R-K., ALFTHAN, G., AROMAA, A. Serum antioxidants and risk of rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Disease**, v. 53, p. 51-53, 1994.

HENDERSON, E., GROOTVELD, M. BLAKE, D. Origins of free radical-mediated damage in the inflamed joint. **European Journal of Rheumatology and Inflammation**, v. 11, n. 1, p. 27-35, 1991.

HENROTIN, Y.E., BRUCKNER, P., PUJOL, J.P. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 11, n. 10, p. 747-755, 2003.

HEYMER, B., SPANEL, R., HFERKAMP, O. Experimental models of arthritis. **Current Topics in Pathology**, v. 71, p. 123-152, 1982.

HILL, C.L., GALE, D.G., CHAISSON, C.E., SKINNER, K., KAZIS, L., GALE, M.E., FELSON, D.T. Knee effusions, popliteal cysts, and synovial thickening: association with knee pain in osteoarthritis. **The Journal of Rheumatology**, v. 28, n. 6, p. 1330-1337, 2001.

HITCHON, C.A, EL-GABALAWY, H.S. Oxidation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 6, n. 6, p. 265-278, 2004.

HOCHBERG, M.C., DOUGADOS M. Pharmacological therapy of osteoarthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 15, p. 583-593, 2001.

HOCHBERG, M.C., SILMAN, A.J., SMOLEN, J.S., WEINBLATT, M.E. and WEISMAN, M.H. Rheumatology, 3th edition, Mosby, vol. 1, 2003.

HOUSLAY, M.D., MILLIGAN, G. Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, p. 217-224, 1997.

HOUSLAY, M.D. Adaption in cAMP signalling processes: a central role in cyclic AMP phosphodiesterases. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 9, p. 161-167, 1998.

HUBERLE, A., BEYEEN, A.D., ÖCKINGER, J., AYTURAN, M., JAGODIC, M., DE GRAAF, K.L., FISSOLO, N., MARTA, M., OLOFSSON, P., HULTQVIST, M., HOLMDAHL, R., OLSSON, T., WEISSERT, R. Advanced Intercross Line Mapping Suggests That *Ncf1* (*Ean6*) Regulates Severity in an Animal Model of Guillain-Barre´ Syndrome. **The Journal of Immunology**, v. 182, p. 4432-4438, 2009.

HULTQVIST, M., OLOFSSON, P., HOLMBERG, J., BÄCKSTRÖM, B.T., TORDSSON, J., HOLMDAHL, R. Enhanced autoimmunity arthritis, and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the *Ncf1* gene. **The Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 101, n. 34, p. 12646-12651, 2004.

HULTQVIST, M., HOLMDAHL, R. Nef1 (p47phox) polymorphism determines oxidative burst and the severity of arthritis in rats and mice. **Cellular Immunology**, v. 233, p. 97-101, 2005.

HULTQVIST, M., OLOFSSON, P., GALDERMAN, K.A., HOLMBERG, J., HOLMDAHL, R. A new arthritis therapy with oxidative burst inducers. **PLoS Medicine**, v. 3, p. 1625-1636, 2006.

IALENTI, A., MONCADA, S., di ROSA, M. Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 2, p. 701-706, 1993.

ISERI, S.O., ERSOY, Y., ERCAN, F., YUKSEL, M., ATUKEREN, P., GUMUSTAS, K., ALICAN, I. The effect of sildenafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, on acetic acid-induced colonic inflammation in the rat. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 24, p. 1142-1148, 2009.

IYAMA, S., OKAMOTO, T., SATO, T., YAMAUCHI, N., SATO, Y. SASAKI, K., TAKAHASHI, M., TANAKA, M., ADACHI, T., KOGAWA, K., KATO, J., SAKAMAKI, S., NIITSU, Y. Treatment of murine collagen-induced arthritis by ex vivo extracellular superoxide dismutase gene transfer. **Arthritis & Rheumatism**, v. 44, p. 2160-2167, 2001.

JAIN, N.K., PATIL, C.S., SINGH, A., KULKARNI, S.K. Sildenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **Brain Research**, v. 909, p. 170-178, 2001.

JAIN, N.K., PATIL, C.S., SINGH, A., KULKARNI, S.K. Sildenafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, enhances the antinociceptive effect of morphine. **Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 150-156, 2003.

JOVANOVIC, D., PELLETIER, J.P., ALAAEDDINE, N., MINEAU, F., GENG, C., RANGER, P., MARTEL-PELLETIER, J. Effect of IL-13 on cytokines, cytokine receptors and inhibitors on human osteoarthritic synovium and synovial fibroblasts. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 6, p. 40-49, 1998.

KAUR, H., HALLIWELL, B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. **FEBBS Letters**, v. 350, n. 1., p. 9-12, 1994.

KEFFER, J., PROBERT, L., CAZLARIS, H., GEORGOPOULOS, S., KASLARIS, E., KIOUSSIS, D., KOLLIAS, G. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic Arthritis & Rheumatism model of arthritis. **EMBO Journal**, v. 10, n. 13, p. 4025-4031, 1991.

KEYSTONE, E.C., SCHORLEMMER, H.U., POPE, C., ALLISON, A.C. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis & Rheumatism**, v. 20, n. 7, p. 1397-1401, 1977.

KEYSTONE, E.C., KAVANAUGH, A.F., SHARP, J.T., TANNENBAUM, H., HUA, Y., TEOH, L.S., FISCHKOFF, S.A., CHARTASH, E.K. Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumour necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy: a randomized, placebo-controlled, 52-week trial., **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, p. 1400-1411, 2004.

KIM, N.N. Phosphodiesterase type 5 inhibitors: a biochemical and clinical correlation survey. **International Journal of Impotence Research**, v. 15, S13-S19, 2003.

KIM, K.O., PARK, S.Y., HAN, C.W., CHUNG, H.K., RYU, D.H., HAN, J.S. Effect of sildenafil citrate on interleukin-1 β -induced nitric oxide synthesis and iNOS expression in SW982 cells. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 40, p. 286-293, 2008.

KLIPPEL, J.H., CROFFORD, L.J., STONE, J.H. and WEYAND, C.M. *Primer on the Rheumatic Diseases*. 12 ed. Canada: Arthritis Foundation, 2001.p. 209-217.

KOVACIC, P., POZOS, R.S., SOMANATHAN, R., SHANGARI, N., O'BRIEN, P.J. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: Focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 22, p. 2601-2603, 2005.

KRESSE, H., GLOSSL, J. Glycosaminoglycan degradation. **Advances in Enzymology**, v. 60, p. 217-311, 1987.

LAMBETH, J.D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 181-189, 2004.

LANFER-MARQUEZ, U.M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, p. 227-242, 2003.

LEE, D.M., WEINBLATT, M.E. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 358, p. 903-911, 2001.

LEITE, A.C.R.M., CUNHA, F.Q., DAL-SECCO, D., FUKADA, S.T., GIRÃO, V.C.C., ROCHA, F.A.C. Effects of nitric oxide on neutrophil influx depends on the tissue: role of leukotriene B₄ and adhesion molecules. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, n. 5, p. 818-825, 2009.

LIOCHEV, S.I., FRIDOVICH, I. The role of O₂ in the production of OH: in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 16, p. 29-33, 1994.

LOUGHLIN, J. The genetic epidemiology of human primary osteoarthritis: current status. **Expert reviews in Molecular Medicine**, v. 7, n. 9, p. 1-12, 2005.

MACMILLAN-CROW, L.A., CROW, J.P., KERBY, J.D., BECKMAN, J.S. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human

renal allografts. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 93, n. 21, p. 11853-11858, 1996.

MAJITHIA, V., GERACI, S.A. Rheumatoid Arthritis: Diagnosis and Management. **The American Journal of Medicine**, v. 120, 936-939, 2007.

MALEMUD, C.J. Fundamental pathways in osteoarthritis: an overview. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p. 659-61, 1999.

MARKLUND, S.L., BJELLE, A., ELMQVIST, L.G. Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in rheumatoid arthritis and in reactive arthritides. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 45, n. 10, p. 847-51, 1986.

MARTIN, K., LETHBRIDGE-CEJKU, M., MULLER, D.C., ELAHI, D., ANDRES, R., TOBIN, J.D., HOCHBERG, M.C. Metabolic correlates of obesity and radiographic features of knee osteoarthritis: data from the Baltimore longitudinal study of aging. **Journal of Rheumatology**, v. 24, n. 4, p. 702-707, 1997.

MATES, J.M., PEREZ-GOMEZ, C., De CASTRO, I.N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, p. 595-603, 1999.

MCCALL, M.R., FREI, B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1034-53, 1999.

MCCARTNEY-FRANCIS, N., ALLEN, J.B., MIZEL, D.E., ALBINA, J.E., XIE, Q.W., NATHAN, C.F., WAHL, S.M. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 178, p. n. 2, p. 749-754, 1993.

MCCARTNEY-FRANCIS, N.L., SONG, X., MIZEL, D.E., WAHL, S.M. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease. **Immunology**, v. 166, p. 2734-2740, 2001.

MCMAHON, C.G. Tadalafil A Viewpoint by Chris G. McMahon. **Drugs**, v. 63, n. 20, p. 2213-2214, 2003.

MCNEIL, J.D., WIEBKIN, O.W., BETTS, W.H., CLELAND, L.G. Depolymerization products of hyaluronic acid after exposure to oxygen-derived free radicals. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 44, n. 11, p. 780-789, 1985.

MEIER, B., JESAITIS, A.J., EMMENDORFFER, A., ROESLER J., QUINN, M.T. The cytochrome b-558 molecules involved in the fibroblast and polymorphonuclear leucocyte superoxide-generating NADPH oxidase systems are structurally and genetically distinct. **Biochemical Journal**, v. 289, p. 481-486, 1993.

MEIER, B. Superoxide generation of phagocytes and nonphagocytic cells. **Protoplasma**, v. 217, p. 117-124, 2001.

MEYER, J.W., HOLLAND, J.A., ZIEGLER, L.M., CHANG, M.M., BEEBE, G., SCMITT, M. E. Identification of a functional leukocyte-type NADPH oxidase in

human endothelial cells: a potential atherogenic source of reactive oxygen species. **Endothelium**, v. 7, n. 1, p. 11–22, 1999.

MILLER, D.M., BUETTNER, G.R., AUST, S.D. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. **Free Radicals Biology & Medicine**, v. 8, p. 95-108, 1990.

MIZE, C.E, AVIGAN, J., BAXTER, J.H., FALES, H.M., STEINBERG, D. Metabolism of phyto1-U-¹⁴C and phytanic acid-U-¹⁴C in the rat. **Journal of Lipid Research**, v. 7, p. 692-697, 1966.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB Journal**, v. 6, p. 3051-3064, 1992.

OLIVER, S.J., BRAHN, E. Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective. **Journal of Rheumatology**, v. 44, p. 56-60, 1996.

OLIVIERI, O., GIRELLI, D., TREVISAN, M.T., BASSI, A., ZORZAN, P., BAMBARA, L. M., CORROCHER, R., KOSTER, J.F., SWAAKA, J.G., TERASAWA, K. Red blood cell susceptibility to lipid peroxidation, membrane lipid composition and antioxidant enzymes in patient with rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 18, n. 8, p. 1263–1264, 1991.

OLOFSSON, P., HOLMBERG, J., TORDSSON, J., LU, S., ÅKERSTRÖM, B., HOLMDAHL, R. Positional identification of Ncf1 as a gene that regulates arthritis severity in rats. **Nature Genetics**, v. 33, n. 1, p. 25-32, 2003.

PERRY, M.J., HIGGS, G.A. Chemotherapeutic potential of phosphodiesterases inhibitors. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 2, n. 4, p. 472–81, 1998.

POOLE, A.R. An introduction of the pathophysiology of osteoarthritis. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p. 662-670, 1999.

QUINN, M.T., GAUSS, K.A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with non-phagocyte oxidases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, p. 760–781, 2004.

RIBEIRO, R.A., VALE, M.L., THOMAZZI, S.M., PASCHOALATO, A.B.P., POOLE, S., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, p. 111-118, 2000.

ROCHA, F.A.C., ARAGÃO, Jr.A.G.M., OLIVEIRA, R.C., POMPEU, M.M.L., VALE, M.R., RIBEIRO, R.A. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan – induced arthritis in rats. **Inflammation Research**, v. 48, n. 9, p. 485-490, 1999.

ROCHA, F.A.C., DE BRUM-FERNANDES, A.J. Evidence that peroxynitrite affects human osteoblast proliferation and differentiation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 3, p. 434-442, 2002.

ROCHA, J.C.S., PEIXOTO, M.E., JANCAR, S., CUNHA, F.Q., RIBEIRO, R.A., ROCHA, F.A.C. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in

zymosan-induced arthritis in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 4, p. 588-596, 2002.

ROCHA, F.AC., TEIXEIRA, M.M., ROCHA, J.C.S., GIRÃO, V.C.C., BEZERRA, M.M., RIBEIRO, R.A., CUNHA, F.Q. Blockade of leukotriene B4 prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. **European Journal of Pharmacology**, v. 497, n. 1, p. 81– 86, 2004.

RONTANI, J-F., VOLKMAN, J.K. Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. **Organic Geochemistry**, v. 34, p. 1–35, 2003.

ROSS, A.D., BANDA, N.K., MUGGLI, M., AREND, W.P. Enhancement of collagen-induced arthritis in mice genetically deficient in extracellular superoxide dismutase. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 11, p. 3702-3711, 2004.

ROTELLA, D.P. Phosphodiesterase 5 inhibitors: current status and potential applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, p. 674–682, 2002.

RUIZ-ROMERO, C., CALAMIA, V., MATEOS, J., CARRIERA, V., MARTINEZ-GOMARIZ, M., FERNANDEZ, M., BLANCO, F.J. Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 8, p. 171-189, 2009.

SAITO, I., KOSHINO, T., NAKASHIMA, K., UESUGI, M., SAITO, T. Increased cellular infiltrate in inflammatory synovial of osteoarthritic knees. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 10: p. 156-162, 2002.

SAKAGUCHI, N., TAKAHASHI, T., HATA, H., NOMURA, T., TAGAMI, T., YAMAZAKI, S., SAKIHAMA, T., MATSUTANI, T., NEGISHI, I., NAKATSURU, S., SAKAGUCHI, S. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. **Nature**, v. 426, p. 454-460, 2003.

SAKAI, A., HIRANO, T., OKAZAKI, R., OKIMOTO, N., TANAKA, K., NAKAMURA, T. Large dose ascorbic acid administration suppresses the development of arthritis in adjuvant-injected rats. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 119, n. 3-4, p. 121-126, 1999.

SANTOS, C.L., SOUZA, M.H.L.P., GOMES, A.S., LEMOS, H.P., SANTOS, A.A., CUNHA, F.Q., WALLACE, J.L. Sildenafil prevents indomethacin-induced gastropathy in rats: role of leukocyte adherence and gastric blood flow. **British Journal of Pharmacology**, v. 146, n. 4, p. 481–486, 2005.

SANZ, SC., BRUGES-ARMAS, J., HERRERO-BEAUMONT, G. Importância do osso subcondral e da membrana sinovial na patogenia e no tratamento da osteoatrose. **Acta Reumatologica Portuguesa**, v. 31, n. 4, p. 205-213, 2006.

SCHALLER, M., BURTON, D.R., DITZEL, H.J. Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. **Nature Immunology**, v. 2, n. 8, p. 746-53, 2001.

SCHLUTER, A., BARBERA, M.J., IGLESIAS, R., GIRALT, M., VILLAROYA, F. Phytanic acid, a novel activator of uncoupling protein-1 gene transcription and brown adipocyte differentiation. **Biochemical Journal**, v. 362, p. 61-69, 2002.

SCHÖN, S., HUEP, G., PRANTE, C., MÜLLER, S., CHRIST, R., HAGENA, F-W., KUHN, J., KLEESIEK, K., GÖTTING, C. Mutational and functional analyses of xylosyltransferases and their implication in osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, p. 442-448, 2006.

ŠENOLT, L., VENCOVSKÝ, J., PAVELKA, K., OSPELT, C., GAY, S. Prospective new biological therapies for rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, p. 102-107, 2009.

SEVEN, A., GÜZEL, S., ASLAN, M., HAMURYUDAN, V. Lipid, protein, DNA oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 538-543, 2008.

SHABSIGH, R. Therapy of ED: PDE-5 inhibitors. **Endocrine**, v. 23, p. 135-141, 2004.

SONEJA, A., DREWS, M., MALISNKI, T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. **Pharmacological Reports**, v. 57 (Suppl.), p. 108-119, 2005.

SOUSA, A.M., PRADO, W.A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Research**, v. 897, p. 9-19, 2001.

STANCZYK, J., OSPELT, C., GAY, S. Is there a future for small molecule drugs in the treatment of rheumatic diseases? **Current Opinion in Rheumatology**, v. 20, p. 257-262, 2008.

STEFANOVIC-RACIC, M., MEYERS, K., MESCHTER, C., COFFEY, J.W., HOFFMAN, R.A., EVANS, C.H. N-monomethyl arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, suppresses the development of adjuvant arthritis in rats. **Arthritis & Rheumatism**, v. 37, p. 1062-1069, 1994.

STEFANOVIC-RACIC, M., MEYERS, K., MESCHTER, C., COFFEY, J.W., HOFFMAN, R.A., EVANS, C.H. Comparison of the nitric oxide synthase inhibitors methylarginine and aminoguanidine as prophylactic and therapeutic agents in rat adjuvant arthritis. **The Journal of Rheumatology**, v. 22, n. 10, p. 1922-1928, 1995.

STEINBERG, D., AVIGAN, J., MIZE, C.E., BAXTER, J.H., CAMMERMEYER, J., FALES, H.M., HIGHET, P.F. Effects of dietary phytol and phytanic acid in animals. **Journal of Lipid Research**, v. 7, p. 684-691, 1966.

SU, K.L., SCHMID, H.H. Metabolism of long-chain isoprenoid alcohols. Incorporation of phytol and dihydrphytol into the lipids of rat brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 380, p. 119-126, 1975.

SWEENEY, S.E., FIRESTEIN, G.S. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 3, p. 372-378, 2004.

TIKU, M.L., SHAH, R., ALLISON, G.T. Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation. Possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 26, p. 20069-20076, 2000.

TONUSSI, C.R., FERREIRA, S.H. Rat knee- joint incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, v. 48, p. 421-427, 1992.

TORPHY, T.J. Phosphodiesterase isozymes. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 157, n. 2, p. 351-370, 1998.

TSAI, B.M., TURRENTINE, M.W., SHERIDAN, B.C., WANG, M., FIORE, A.C., BROWN, J.W., MELDRUM, D.R. Differential effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary artery cytokine expression. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 81, p. 272-278, 2006.

UTHAYATHAS, S., KARUPPAGOUNDER, S.S., THRASH, B.M., PARAMESHWARAN, K., SUPPIRAMANIAM, V., DHANASEKARAN, M. Versatile effects of sildenafil: recent pharmacological applications. **Pharmacological Reports**, v. 59, n. 2, p. 150-163, 2007.

VALE, M.L., BENEVIDES, V.M., SACHS, D., BRITO, G.A., ROCHA, F.A.C., POOLE, S., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q., RIBEIRO, R.A. Antihyperalgesic effect of pentoxifylline on experimental inflammatory pain. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, n. 7, p. 833 – 844, 2004.

VALKO, M., IZAKOVIC, M., MAZUR, M., RHODES, C.J., TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 266, n. 1-2, p. 37-56, 2004.

VALKO, M., MORRIS, H., CRONIN, M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1161-1208, 2005.

VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T.D., MAZUR, M., TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

Van de LOO, F.A.J., BENNINK, M.B., ARNTZ, O.J., SMEETS, R.L., LUBBERTS, E., JOOSTEN, L.A.B., van LENT, P.L.E.M., COENEN-DE-ROO, C.J.J., CUZOCREA, S., SEGAL, B.H., HOLLAND, S.M., van den BERG, W.B. Deficiency of NADPH oxidase components p47phox and gp91phox caused granulomatous

synovitis and increased connective tissue destruction in experimental arthritis models. **American Journal of Pathology**, v. 163, n. 4, p. 1525-1537, 2003.

Van de PUTTE, L.B., ATKINS, C., MALAISE, M., SANY, J., RUSSELL, A.S., van RIEL, P.L. SETTAS, L., BIJLSMA, J.W., TODESCO, S., DOUGADOS, M., NASH, P., EMERY, P., WALTER, N., KAUL, M., FISCHKOFF, S., KUPPER, H. Efficacy and safety of adalimumab as monotherapy in patients with rheumatoid arthritis for whom previous disease modifying antirheumatic drug treatment has failed. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 63, p. 508-516, 2004.

Van den BRINK, D.M., van MIERT, J.N.I., DACREMONT, G., RONTANI, J-F., JANSEN, G.A., WANDERS, R.J.A. Identification of fatty aldehyde dehydrogenase in the breakdown of phytol to phytanic acid. **Molecular Genetics and Metabolism**, 82: 33-37, 2004.

Van den BRINK, D.M., van MIERT, J.N, DACREMONT, G., RONTANI, J.F. and WANDERS, R.J. Characterization of the final step in the conversion of phytol into phytanic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 26838-26844, 2005.

Van den BRINK, D.M., WANDERS, R.J.A. Phytanic acid: production from phytol, its breakdown and role in human disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 15, p. 1752-1765, 2006.

Van der VEEN, R.C., DIETLIN, T.A., HOFMAN, F.M., PEN, L., SEGAL, B.H., HOLLAND, S.M. Superoxide prevents nitric oxide-mediated suppression of helper T lymphocytes: decreased autoimmune encephalomyelitis in nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase knockout mice. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 5177-5183, 2000.

VERHOEVEN, N.M., JACOBS, C. Human metabolism of phytanic acid and pristanic acid. **Progress in Lipid Research**, v. 40, p. 453-466, 2001.

VIGNOZZI, L., FILIPPI, S., MORELLI, A., AMBROSINI, S., LUCONI, M., VANNELLI, G. B., DONATI, S., CRESCIOLI, C., ZHANG, X-H., MIRONE, V., FORTI, G., MAGGI, M., Effect of Chronic Tadalafil Administration on Penile Hypoxia Induced by Cavernous Neurotomy in the Rat. **Journal of Sexual Medicine**, v. 3, n. 3, p. 419-431, 2006.

VILLA-FORTE, A. Anticytokine therapy in non-rheumatoid arthritis indicationsa in 2009. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 21, p. 251-255, 2009.

VISSER, Y.P., WALTHER, F.J., LAGHMANI, E.H., BOERSMA, H., van der LAARSE, A., WAGENAAR, G.T.M. Sildenafil attenuates pulmonary inflammation and fibrin deposition, mortality and right ventricular hypertrophy in neonatal hyperoxic lung injury. **Respiratory Research**, v. 10, p. 30, 2009.

WEISS, E.S., CHAMPION, H.C., WILLIAMS, J.A., BAUMGARTNER, W.A., SHAH, A.S. Long-acting oral phosphodiesterase inhibition preconditions against reperfusion injury in an experimental lung transplantation model. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 137, n. 5, p. 1249-1257, 2009.

WIERZBICKI, A.S., LLOYD, M.D., SCHOFIELD, C.J., FEHERT, M.D., GIBBERD, F.B. Refsum's disease: a peroxisomal disorder affecting phytanic acid α -oxidation. **Journal of Neurochemistry**, v. 80, n. 5, p. 727-735, 2002.

WINYARD, P.G., MOODY, C.J., JACOB, C. Oxidative activation of antioxidant defence. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 30, p. 453-461, 2005.

YORIMITSU, M. NISHIDA, K., SHIMIZU, A., DOI, H., MIYAZAWA, S., KOMIYAMA, T., NASU, Y., YOSHIDA, A., WATANABE, S., OZAKI, T. Intra-articular injection of interleukin-4 decreases nitric oxide production by chondrocytes and ameliorates subsequent destruction of cartilage in instability-induced osteoarthritis in rat knee joints. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 16, n. 7, p. 764-771, 2008.

ZHANG, R., WANG, Y., ZHANG, L., ZHANG, Z., TSANG, W., LU, M., CHOPP, M. Sildenafil (Viagra) induces neurogenesis and promotes functional recovery after stroke in rats. **Stroke**, v. 33, p. 2675-2680, 2002.

ZHANG, R., WANG, L., ZHANG, L., CHEN, J., ZHU, Z., ZHANG, Z., CHOPP, M. Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat. **Circulation Research**, v. 92, p. 308-313, 2003.

ZHANG, L., ZHANG, Z., ZHANG, R.L., CUI, Y., LAPOINTE, M.C., SILVER, B., CHOPP, M. Tadalafil, a long-acting type 5 phosphodiesterase isoenzyme inhibitor, improves neurological functional recovery in a rat model of embolic stroke. **Brain Research**, v. 1118, n. 1, p. 192-198, 2006.

PUBLICAÇÕES

RESEARCH PAPER

Effects of nitric oxide on neutrophil influx depends on the tissue: role of leukotriene B₄ and adhesion molecules

ACRM Leite¹, FQ Cunha², D Dal-Secco², SY Fukada², VCC Girão³ and FAC Rocha¹

¹Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil,

²Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, and

³Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

Background and purpose: We investigated the effect of nitric oxide synthase (NOS) inhibition on polymorphonuclear cell (PMN) influx in zymosan or lipopolysaccharide (LPS)-induced arthritis and peritonitis.

Experimental approach: Wistar rats received intra-articular (i.art.) zymosan (30–1000 mg) or LPS (1–10 mg). Swiss C57/Bl6 mice genetically deficient in intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1^{-/-}) or in b₂-integrin (b₂-integrin^{-/-}) received zymosan either i.art. or i.p. PMN counts, leukotriene B₄ (LTB₄), tumour necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-10 (IL-10) levels were measured in joint and peritoneal exudates. Groups received the NOS inhibitors N^G-nitro-L-arginine methyl ester (LN), nitro-L-arginine, N-[3-(aminomethyl)benzyl] acetamide or aminoguanidine, prior to zymosan or LPS, given i.p. or s.c. in the arthritis and peritonitis experiments respectively. A group of rats received LN locally (i.art. or i.p.), 30 min prior to 1 mg zymosan i.art.

Key results: Systemic or local NOS inhibition significantly prevented PMN migration in arthritis while increasing it in peritonitis, regardless of stimuli, concentration of NOS inhibitors and species. NOS inhibition did not alter TNF-α and IL-10 but decreased LTB₄ in zymosan-induced arthritis. LN administration significantly inhibited PMN influx into the joints of ICAM-1^{-/-} and b₂-integrin^{-/-} mice with zymosan-arthritis, while not altering PMN influx into the peritoneum of mice with zymosan-peritonitis.

Conclusions and implications: Nitric oxide has a dual modulatory role on PMN influx into joint and peritoneal cavities that is stimulus- and species-independent. Differences in local release of LTB₄ and in expression of ICAM-1 and b₂-integrin account for this dual role of NO on PMN migration.

British Journal of Pharmacology (2009) **156**, 818–825; doi:10.1111/j.1476-5381.2008.00094.x; published online 13 February 2009

Keywords: Neutrophils; zymosan; arthritis; leukotrienes; cytokines; adhesion molecules

Abbreviations: 1400W, N-[3-(aminomethyl)benzyl] acetamide; AG, aminoguanidine; b₂-integrin^{-/-}, mice genetically deficient for the b₂-integrin; i.art., intra-articular; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; ICAM-1^{-/-}, mice genetically deficient for ICAM-1; IL-10, interleukin-10; iNOS, inducible NOS; iNOS^{-/-}, mice genetically deficient for the iNOS gene; LN, N^G-nitro-L-arginine methyl ester; L-NMMA, N^G-monomethyl-L-arginine; LPS, lipopolysaccharide; LTB₄, leukotriene B₄; MIP, macrophage inflammatory protein; NA, N^G-nitro-L-arginine; PMN, polymorphonuclear cell; TNF-α, tumour necrosis factor-α; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; VLA-4, very late antigen-4

Introduction

Neutrophil migration into inflammatory sites is a crucial step in host defence, whereas inflammatory tissue damage is also associated with neutrophil accumulation. The release of proteolytic lysosomal enzymes, metalloproteinases and reactive oxygen/nitrogen-derived species mediate neutrophil damage to tissues. Therefore, strategies to limit neutrophil trafficking are positively associated with the clinical benefit obtained in inflammatory diseases, such as rheumatoid

arthritis (O'Dell, 2004). The recruitment of neutrophils in arthritis is a multi-mediator process with the participation of leukotriene B₄ (LTB₄), the complement fragment C5a, cytokines and chemokines. We have previously shown that antigen-induced neutrophil migration requires the chemokines macrophage inflammatory protein

Correspondence: Dr Francisco Airton Rocha, Rua Dr José Lourenço, 1930- Aldeota, CEP 60115-281, Fortaleza, CE, Brazil. E-mail: arocha@ufc.br Received 14 July 2008; revised 6 October 2008; accepted 20 October 2008
www.brjpharmacol.org

Dual role of nitric oxide on neutrophil migration

ACRM Leite *et al*

inflammatory protein (MIP)-1a and MIP-2 and CD₄⁺ T-cell-derived tumour necrosis factor- α (TNF- α) acting through an LTB₄-dependent mechanism (Ramos *et al.*, 2006). The events involved in neutrophil migration require interaction of reciprocal adhesion molecules present on neutrophils and endothelial cells. Rolling is mediated by E- and P-selectins (on endothelial cells) and L-selectin (on leukocytes) interacting with their respective carbohydrate ligands. Thereafter, adhesion and transmigration are mediated by the leukocyte β_2 -integrins, CD11a/CD18, CD11b/CD18 and CD11c/CD18, which interact with immunoglobulins, intercellular

adhesion molecule-1 (ICAM-1), ICAM-2 and ICAM-3, while other integrins, very late antigen-4 (VLA-4) and $\alpha_5\beta_3$ interact with vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, present mainly on endothelial cells (Muller, 2003). These processes are regulated by a variety of mediators, including nitric oxide (NO) (Mulligan *et al.*, 1998).

There are several reports showing that NO modulates neutrophil migration. Selective inhibition of both the inducible NOS (iNOS) and endothelial NOS isoforms increases neutrophil adhesion to endothelium, whereas NO donors decrease both adhesion and transmigration of leukocytes (Hickey and Kubes, 1997; Dal Secco *et al.*, 2003). Moreover, NO was shown to down-regulate the expression of the adhesion molecules, MAC-1 (CD11b/CD18), selectins (P, L), ICAM-1 (CD54) and VCAM-1 (Lefer and Lefer, 1996; Spiecker *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1999; Dal Secco *et al.*, 2006). In the peritoneum, we showed that NO released by both constitutive and iNOS depressed neutrophil recruitment that was partially due to a reduction in the apoptosis of emigrated neutrophils into the peritoneal cavity (Secco *et al.*, 2003). Recently, we demonstrated that this effect is mediated via a soluble guanylate cyclase-dependent mechanism (Dal Secco *et al.*, 2006). There are controversies regarding the role of NO in the neutrophil migration into joints and peritoneal cavities. In the zymosan-induced peritonitis in mice genetically deficient for the iNOS gene (iNOS^{-/-}), a slight increase in neutrophil recruitment was observed 1 h after injection of zymosan, as compared with wild-type mice. However, between 2 and 4 h, neutrophil migration was significantly decreased, which was coupled to a reduction of MIP-2 and interleukin-10 (IL-10) levels in the peritoneal exudate (Ajuebor *et al.*, 1998). On the other hand, the accumulation of neutrophils in the synovium of mice subjected to zymosan-arthritis was similar in iNOS^{-/-} and wild-type animals (van de Loo *et al.*, 1998). In streptococcal cell wall-induced arthritis in rats, NOS inhibitors reduced neutrophil influx (McCartney-Francis *et al.*, 2001). However, in ovalbumin-induced arthritis in rats, the NOS inhibitor, nitro-L-arginine, did not alter neutrophil influx (Bombini *et al.*, 2004). Tissue specificities, concentration of the mediator, animal species and inflammatory stimuli may all account for these

apparent discrepancies regarding the role of these molecules in neutrophil recruitment. Herein, we demonstrate that NOS inhibition either decreases or increases neutrophil migration in acute arthritis or peritonitis, respectively, regardless of the concentration of NOS inhibitors, animal species and inflammatory stimuli. This was not influenced by the local release of TNF- α and IL-10. On the other hand, NOS inhibition significantly decreased LTB₄ release into the joints in zymosan-arthritis, while not altering LTB₄ levels in zymosan-peritonitis. In addition, differences in the local expression of the adhesion molecules β_2 -integrin and ICAM-1 also seem to be responsible for the phenomenon.

Methods

Animals

All animal procedures and these experimental protocols were approved by the local ethics committees on animal experimentation

at the Faculty of Medicine both of the Federal University of Ceará and of the University of São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brazil. All efforts were made to minimize animal suffering and the number of animals used associated with valid statistical evaluation. Male Wistar rats (180–200 g) or male Swiss mice (25–30 g) ($n = 6$ per group) were provided by the central animal house of the Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil. Experiments with C57/Bl6, mice genetically deficient for the β_2 -integrin (β_2 -integrin^{-/-}) or for ICAM-1 (ICAM-1^{-/-}) (18–20 g) ($n = 6$ per group) were carried out at the Department of Pharmacology of the Faculty of

Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brazil. Breeding pairs of mice with targeted disruption of the ICAM-1

and β_2 -integrin genes were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). They were housed in cages in temperature-controlled rooms with 12 h light/dark cycles and free access to food and water.

Induction of arthritis and peritonitis – assessment of cell counts and determination of LTB₄, TNF- α and IL-10 levels

Rats received an intra-articular (i.art.) injection of either zymosan (30–1000 mg 50 mL⁻¹ total volume) or lipopolysaccharide

(LPS) from *E. coli* O111:B4 (1–10 mg in 50 mL total volume), dissolved in sterile saline, or saline (50 mL) into their right knee joints. Mice received i.art. injection of zymosan (30–100 mg in 25 mL total volume) or saline (25 mL) into their right knee joints. Other groups of rats received either 1000 mg zymosan or 10 mg LPS i.p. or saline and the mice groups received either 30–100 mg zymosan or saline i.p. The animals were terminally anesthetized (chloral hydrate 400 mg·kg⁻¹ i.p.), killed by cervical dislocation and ex-sanguinated, either 4 or 6 h after injection of the stimuli, for the peritonitis or arthritis experiments respectively. The articular cavities were then washed twice with 200 mL (rats) or 50 mL (mice) whereas the peritoneal cavities were washed with 7 mL (rats) or 2 mL (mice) of PBS containing 10 mmol·L⁻¹ EDTA. The exudates were collected by aspiration for determination of total cell counts using a Neubauer chamber. After centrifuging (500 x *g* for 10 min), the supernatants were stored for determination of LTB₄, TNF- α and IL-10, using ELISA. Briefly, 96-well microtiter plates (Nunc Immunoplates) were coated overnight at 4°C with immunoaffinity-purified polyclonal antibodies against the respective cytokines. These antibodies were provided by Dr S Poole (National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom). After blocking the plates (1% albumin for 1 h), concentrations of cytokines and samples were loaded in duplicate for 2 h (22°C). A secondary rabbit biotinylated immunoaffinity-purified antibody was added, followed by incubation for 1 h (22°C). Finally, 100 mL of avidin-horseradish peroxidase (1:5000 dilution; DAKO A/S, Denmark) was added to each well; after 30 min, the plates were washed and the colour reagent o-phenylenediamine (40 mg·well⁻¹) was added. After 15 min, the reaction was stopped with 1 mol·L⁻¹ H₂SO₄ and the optical density was measured at 490 nm. Cytokine concentration was expressed as pg·mL⁻¹.

Drug treatments

Evaluation of the dose-range, stimuli and various NOS inhibitors on the polymorphonuclear cell (PMN) influx into the joints or

Peritoneum

In an attempt to test the effect of systemic NOS inhibition on cell influx, the animals subjected to arthritis received the test compounds intra-peritoneally (i.p.) whereas those subjected to peritonitis received test compounds subcutaneously (s.c.). Groups of rats received the non-selective NOS inhibitors, N_G-nitro-L-arginine methyl ester (LN 10–30 mg·kg⁻¹) given either i.p. or s.c. for arthritis and peritonitis experiments, respectively, 30 min prior to injection of zymosan. Other groups received LN 1 mg·kg⁻¹ i.art. or LN 10 mg·kg⁻¹ i.p. prior to 1 mg zymosan, to evaluate the effect of local NOS inhibition. Other NOS inhibitors tested included the non-selective NOS inhibitor N_G-nitro-L-arginine (NA 50 mg·kg⁻¹) or the selective iNOS inhibitors, aminoguanidine (AG 50 mg·kg⁻¹) or N-[3-(aminomethyl)benzyl] acetamide (1400W: 1 mg·kg⁻¹) given 30 min prior to the zymosan, either i.p. or s.c. for arthritis or peritonitis experiments respectively. In an attempt to test the effect in another species, groups of mice received LN (30 mg·kg⁻¹) i.p. or s.c. 30 min before injection

of zymosan into the joints or the peritoneum respectively. The doses were chosen on the basis of previous experiments (Secco *et al.*, 2003).

Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm SEM. To compare the differences between means, we used one-way ANOVA followed by Tukey's test. $P < 0.05$ was considered significant.

Chemicals and reagents

Most agents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). 1400W and the LTB₄ ELISA kit were purchased from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA).

Results

Systemic and local effects of NOS inhibition in the neutrophil migration in zymosan-induced arthritis and peritonitis in rats

In previous reports (Rocha *et al.*, 1999; Benjamim *et al.*, 2000), we have demonstrated that the cells obtained either in the peritoneal or joint exudates, 4 or 6 h after the injection of zymosan, respectively, are mostly neutrophils (~90%). The results of NOS inhibition, whether non-selective (LN or NA) or selective for iNOS (AG or 1400W) in zymosan-induced arthritis and peritonitis in rats are shown in Figure 1. NOS inhibition significantly decreased neutrophil migration into the joints of rats subjected to zymosan-induced arthritis (Figure 1A), regardless of the zymosan concentration. Also, local (i.art.) administration of LN significantly reduced the neutrophil influx in the zymosan-induced-arthritis (Figure 1B). On the other hand, NOS inhibition significantly increased cell migration into the peritoneal cavity of rats after injection of 1 mg zymosan, whether LN was given systemically (Figure 1C) or locally (Figure 1D).

Systemic effect of NOS inhibition in the neutrophil influx in endotoxin (LPS)-induced arthritis and peritonitis in rats

Inasmuch as the effect of LN was similar over a large doserange, we evaluated the results using another stimulus. LN administration dose-dependently and significantly decreased neutrophil influx into the joint exudates of rats subjected to LPS-induced arthritis, regardless of the dose of LPS used (Figure 2A). Additionally, LN significantly increased neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats subjected to LPS-induced peritonitis (Figure 2B).

Analysis of LTB₄, TNF- α and IL-10 levels in the exudates of zymosan-induced arthritis and peritonitis in rats

The exudates collected from the animals used for cell influx studies, shown in Figure 1, were used for assessment of LTB₄, TNF- α and IL-10 levels. Figure 3A shows that the LTB₄ levels in the joint exudates were significantly reduced when the animals with zymosan-arthritis were pretreated with the nonselective NOS inhibitor, LN. However, LN pretreatment did not alter LTB₄ levels in the peritoneal cavity of rats subjected to zymosan-peritonitis. The levels in naïve animals were below detection limits. Neither TNF- α nor IL-10 levels in both joint and peritoneal cavities of rats with zymosan-arthritis or peritonitis were significantly altered by the administration of LN 30 min prior to the zymosan (Figure 3B,C respectively).

Systemic effect of NOS inhibition in the neutrophil influx in zymosan-induced arthritis and peritonitis in wild-type, b₂-integrin^{-/-} and CAM-1^{-/-} mice

Similar to what was seen in rats, the systemic administration of LN significantly decreased the neutrophil influx in mice with zymosan arthritis (Figure 4A), while significantly increasing the neutrophil influx in mice with zymosan-induced peritonitis (Figure 4B). Figure 4C and D show that the number of neutrophils in the articular or peritoneal exudates of animals stimulated by zymosan did not differ in wild-type, b₂-integrin^{-/-} or ICAM-1^{-/-} mice. Moreover, Figure 4C illustrates that LN significantly reduced the neutrophil influx into the joints of mice with zymosan-

induced arthritis, regardless of being administered to wild-type, b_2 -integrin $^{-/-}$ or ICAM-1 $^{-/-}$ mice. On the other hand, LN administration did not alter the neutrophil influx into the peritoneal cavity of b_2 -integrin $^{-/-}$ and ICAM-1 $^{-/-}$ mice

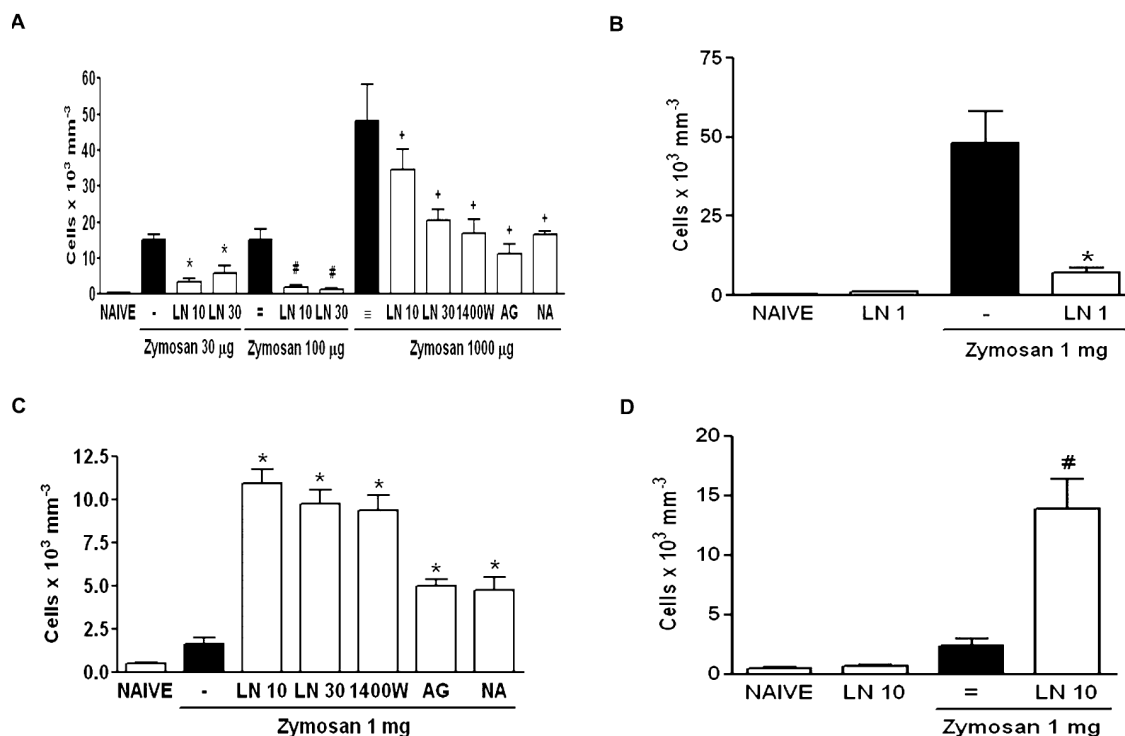


Figure 1 Systemic and local effect of NOS inhibition in the neutrophil migration in zymosan (Zy)-induced arthritis and peritonitis in rats. For systemic experiments, rats received either (30–1000 mg) zymosan intra-articular (i.art.), 1 mg zymosan i.p. or saline. LN (10–30 mg·kg⁻¹), 1400W (1 mg·kg⁻¹), aminoguanidine (AG - 50 mg·kg⁻¹) or nitro-L-arginine (NA - 50 mg·kg⁻¹) were injected i.p. or s.c. in arthritis and peritonitis, respectively, 30 min before the zymosan. For local experiments, rats received 1 mg LN i.art. or 10 mg LN i.p. 30 min prior to the injection of 1 mg zymosan i.art. or i.p. respectively; (A,B) and (C,D) represent systemic and local effect of NOS inhibition in arthritis and peritonitis respectively. Non-treated (bars marked -, =, α) rats were given saline (i.p. or s.c. for arthritis and peritonitis respectively) 30 min prior to zymosan. For local experiments, non-treated (-, =) animals were given i.art. or i.p. saline prior to zymosan. Naïve animals received only saline i.art. or i.p. Results are expressed as the mean \pm SEM of number of cells for each group of six animals. * P < 0.05 compared with non-treated (-); # P < 0.05 compared with non-treated (=); + P < 0.01 compared with non-treated (α). 1400W, N-[3-(aminomethyl)benzyl] acetamide; AG, aminoguanidine; i.art., intra-articular; LN, NG-nitro-L-arginine methyl ester; NA, NG-nitro-L-arginine; NOS, nitric oxide synthase.

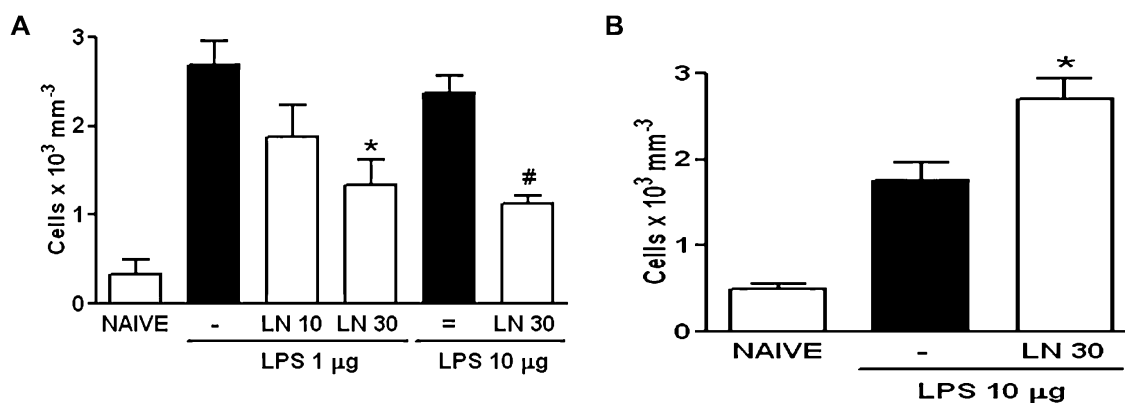


Figure 2 Systemic effect of NOS inhibition in the neutrophil influx in lipopolysaccharide (LPS)-induced arthritis and peritonitis in rats. Rats received i.p. or s.c. LN (10–30 mg·kg⁻¹) 30 min prior to i.art. or i.p. LPS (1–10 mg) respectively. Non-treated (-, =) animals received i.p. or s.c. saline prior to LPS. Naïve animals received only saline; (A) and (B) represent data from arthritis and peritonitis models respectively. Results are expressed as the mean \pm SEM of number of cells for each group of six animals. * P < 0.05 compared with non-treated (-); # P < 0.001 compared with non-treated (-); # P < 0.001 compared with non-treated (=). LN, NG-nitro-L-arginine methyl ester; NOS, nitric oxide synthase.

with zymosan-peritonitis, compared with the increase in the neutrophil influx observed in wild-type animals (Figure 4D).

Discussion

The present study provides evidence that NO has a dual effect on neutrophil influx. NOS inhibition, whether non-selective or selective for the iNOS isoenzyme, significantly decreased neutrophil migration into inflamed joints while increasing neutrophil influx when similar stimuli were applied to the peritoneal cavity. We had previously demonstrated a direct association of neutrophil infiltration and increase in the local release of nitrite (used as an index of NO production) in zymosanarthritis (Rocha *et al.*, 2002). In this report, the effect of NOS inhibition in the zymosan-arthritis occurred over a full range of zymosan concentrations. Therefore, the possibility that high concentrations of zymosan produced such a pronounced cell migration into the joints that a potentiating effect caused by NOS inhibition, as demonstrated in the peritoneum, could not be detected seems unlikely (Ajuebor *et al.*, 1998). Among other possibilities to explain the apparent discrepancy in neutrophil influx between arthritis and peritonitis models included stimulus specificities, animal species and tissue characteristics. We found that treatment of mice with zymosan arthritis with LN produced the same results observed in rats. Similar data were reported in guinea-pigs, where the combined intradermal administration of zymosan-activated plasma and LN significantly inhibited neutrophil and eosinophil accumulation (Teixeira *et al.*, 1993). In the antigen-induced arthritis model in rabbits, the administration of LN also inhibited neutrophil migration (Mello *et al.*, 1997), which was similar to the results achieved in rats subjected to streptococcal cell wall-induced arthritis treated with NG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) (McCartney-Francis *et al.*, 1993). Thus, species differences were ruled out as a cause for the dual effect of NO in cell migration. Local vasoconstriction secondary to constitutive NOS inhibition could explain our data (Paul-Clark *et al.*, 2001). The rich vascular supply to the synovium, coupled with the vasodilatation and increased vascular permeability during inflammation, makes this possibility also unlikely (Rocha *et al.*, 1999). In addition, we have demonstrated that AG reduces neutrophil influx in zymosan arthritis, without altering systemic blood pressure (Rocha *et al.*, 2002).

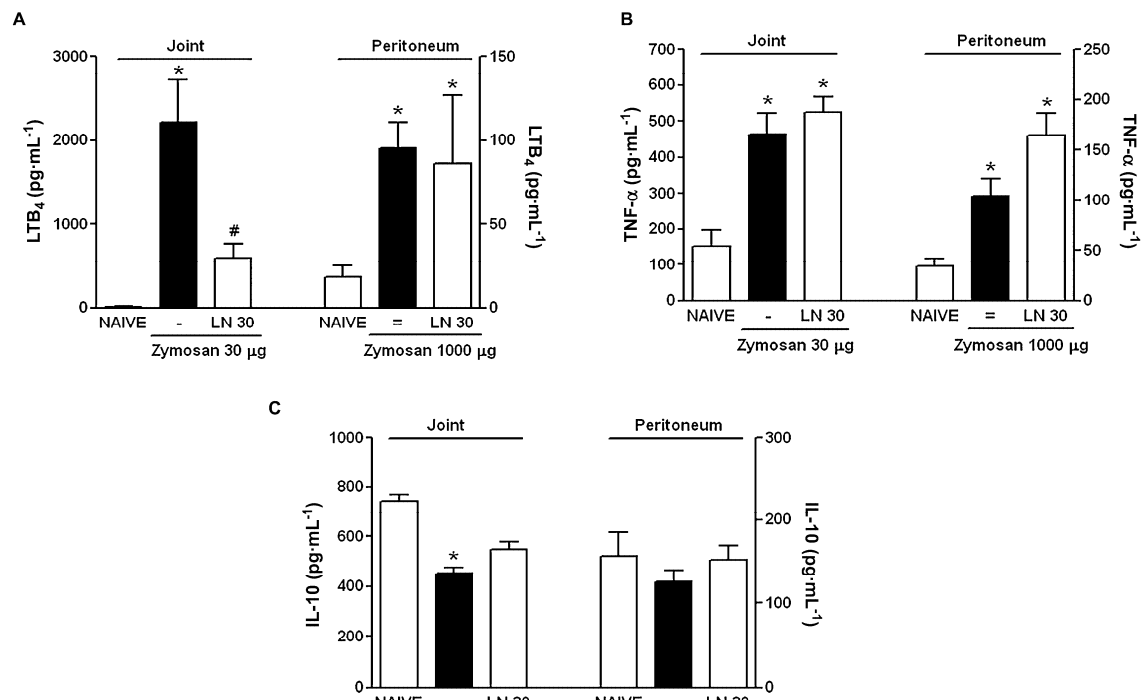


Figure 3 Analysis of LTB₄, TNF- α and IL-10 levels in the exudates of zymosan-induced arthritis and peritonitis. Rats received 30 mg·kg⁻¹ LN i.p. or s.c. 30 min prior to the injection of 30 mg zymosan i.art. or 1000 mg i.p. respectively. Non-treated (-, =) animals were given i.p. or s.c. saline prior to zymosan. Naïve animals received only saline. Results are expressed as the mean \pm SEM of LTB₄ (A), TNF- α (B) and IL-10 (C) for each group of six animals, using ELISA. * P < 0.05 compared with Naïve; # P < 0.05 compared with non-treated (-). IL-10, interleukin-10; LN, NG-nitro-L-arginine methyl ester; LTB₄, leukotriene B₄; TNF- α , tumor necrosis factor- α .

We reproduced previous data showing that NOS inhibition increased neutrophil migration in both zymosan and LPS peritonitis, in both rats and mice (Benjamim *et al.*, 2000; Tavares-Murta *et al.*, 2001; Crosara-Alberto *et al.*, 2002). In a more recent study, we confirmed those data and we have also shown that NOS inhibition led to an increase in the expression of ICAM-1 in mesenteric vessels, thus providing a possible mechanism to explain the increase in neutrophil influx caused by NOS inhibition in peritonitis (Dal Secco *et al.*, 2006). The iNOS^{-/-} mice, subjected to different inflammatory models, showed increased leukocyte recruitment into the peritoneal cavity, compared with wild-type mice (Benjamim *et al.*, 2000; Secco *et al.*, 2003). However, one report has shown that iNOS^{-/-} mice subjected to zymosan-peritonitis had decreased cell influx (Ajuebor *et al.*, 1998). Those authors associated this inhibitory effect to low levels of MIP-2 and IL-10 in the peritoneal exudate. The suppressive activity of IL-10 in PMN migration (Cassatella *et al.*, 1993; Haskó *et al.*, 1998) does not depend on iNOS modulation. Differences in the models studied may account for these discrepancies. *In vitro* studies have shown that L-NMMA decreases formyl-Met- Leu-Phe-induced chemotaxis (Kaplan *et al.*, 1989). It has also been shown that low NO levels could promote neutrophil recruitment whereas high levels would inhibit (van Uffelen *et al.*, 1996; Wanikiat *et al.*, 1997). As the NOS inhibitor LN was effective over a full range of concentrations

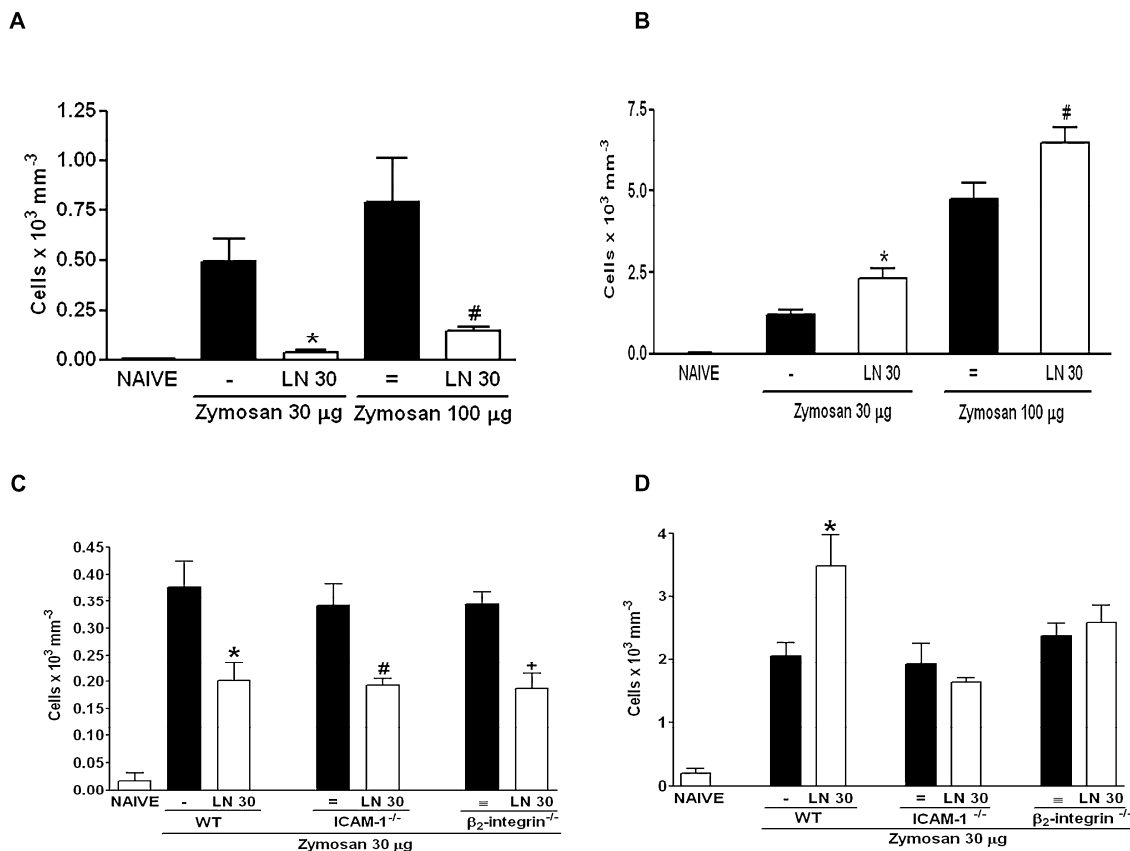


Figure 4 Systemic effect of NOS inhibition in the neutrophil influx in zymosan-induced arthritis and peritonitis in b2-integrin (b2^{-/-}) and ICAM-1 (ICAM-1^{-/-}) genetically deficient mice. Wild-type (WT) mice received 30 mg·kg⁻¹ LN i.p. or s.c. 30 min prior to i.art. or i.p. zymosan (30–100 mg) respectively. Non-treated (-, =) animals were given only saline i.p. or s.c. prior to zymosan. Naïve animals received only saline; (A,C) and (B,D) represent data from arthritis and peritonitis respectively. b2^{-/-} and ICAM-1^{-/-} mice received 30 mg·kg⁻¹ LN i.p. or s.c. 30 min prior to i.art. or i.p. zymosan (30mg) respectively. Results are expressed as the mean ± SEM of number of cells for each group of six animals. **P* < 0.05 compared with non-treated (-); #*P* < 0.05 compared with non-treated (=). i.art., intra-articular; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; ICAM-1^{-/-}, mice genetically deficient for ICAM-1; LN, NG-nitro-L-arginine methyl ester; NOS, nitric oxide synthase.

in the present *in vivo* study, we excluded this possibility. We and others have shown an increase in LTB4 release in arthritis models, as well as a suppression of neutrophil migration provided by LTB4 blockade (Crooks and Stockley, 1998; Rocha *et al.*, 2004). *In vitro*, using peripheral leukocytes of rheumatoid arthritis patients, the administration of an LTB4 antagonist inhibited the expression of the CD11b/CD18 (Mac-1) cell adhesion molecules (Alten *et al.*, 2004). The fact that NOS inhibition decreased LTB4 levels in the joint but not in the peritoneal cavity suggests that NO has a different modulatory on LTB4 levels, depending on the tissue. However, the very low levels of LTB4 in the peritoneum made it difficult to demonstrate significant differences between the groups

treated with the vehicle and the NOS inhibitor. Stimulation with an NO donor reduced LTB4 synthesis by cultured rat peritoneal macrophages (Brock *et al.*, 2003). However, to our knowledge, there are no *in vivo* reports showing that NOS inhibition differentially modulates LTB4 release into joint and peritoneal cavities. Modulation by cytokines could also be involved in the

effects of NO. Considering the prominent role played by TNF- α (Sedgwick *et al.*, 2000) and IL-10 (Alten *et al.*, 2004) in neutrophil migration, we analysed the effect of NOS inhibition on their release into the inflamed cavities. Surprisingly, though, neither TNF- α nor IL-10 levels were significantly affected by the administration of LN, thus ruling out this possibility. We have previously shown that ICAM-1^{-/-} mice had similar neutrophil influx into the peritoneal cavity, as compared with wild-type animals (Dal Secco *et al.*, 2006). Similar data were reported in other studies, using thioglycollate or glycogeninduced peritonitis (Steeber *et al.*, 1999; Crockett *et al.*, 2004). This result led us to conclude that ICAM-1 is not essential for neutrophil recruitment. In the present study, we not only

reproduced those data, but also showed that this is equally true for the b2-integrin molecule, as neutrophil numbers did not differ in b2-integrin^{-/-} animals, compared with wild-type controls. These results apply for both peritoneal and joint cavities. Due to the multi-mediator characteristic of cell migration, we speculate that in the absence of either ICAM-1 or b2-integrin, other molecules (e.g. CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18, VLA-4, α Vb3, ICAM-2, ICAM-3) may become more relevant in promoting neutrophil influx. The data on the genetically modified animals suggest that tissue specificities account for the different effect of NO in cell migration. Indeed, the blockade of neutrophil influx by NOS inhibition persisted in those animals with zymosan-arthritis,

whereas NOS inhibition was no longer effective in increasing neutrophil influx, either in ICAM-1^{-/-} or b2-integrin^{-/-} mice, when peritonitis was induced with zymosan. It is tempting to speculate on the characteristics of the peritoneal and joint cavities. Synoviocytes are immersed in an extracellular matrix with no apparent contact. Type A synoviocytes resemble macrophages whereas type B are fibroblast-like cells. Dendritic cells, as well as mastocytes, are scattered throughout the synovium, comprising a minor though significantly functional cell component that work as antigen-presenting cells (Tran *et al.*, 2005). A rich vascular

supply is provided by a fenestrated capillary network. This unique arrangement renders the synovium a basement membrane-free tissue, where nothing but the endothelium separates blood constituents from the surrounding tissue. The peritoneum is a typical mesothelium, with a structured basement membrane. The present results show an interesting functional difference regarding the modulation of adhesion molecules by NO between the joint and peritoneal cavities. Pharmacological strategies to halt or at least control cell infiltration, aiming to achieve therapeutic benefits, should take

into account that options may vary, depending on the tissue targeted. In summary, we provide evidence that neither ICAM-1 nor b2-integrin expression are necessary for neutrophil recruitment into joints and peritoneum. The dual modulatory role of NO in the acute neutrophil migration in these tissues is at least partially due to a local differential effect on LTB4 release as well as on the expression of these cell adhesion molecules.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). We thank Ana Karine R. M. Leite (student of Doctorate in Medical Sciences – Federal University of Ceará) and Maria Marcela Fernandes Monteiro and Ana Kátia dos Santos for collaboration in the experiments and Giuliana Bertozi Francisco for assistance with the ELISA analysis.

Conflicts of Interest

None.

References

- Ajuebor MN, Virág L, Flower RJ, Perretti M, Szabó C (1998). Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. *Immunology* **95**: 625–630.
- Alten R, Gromnica-Ihle E, Pohl C, Emmerich J, Steffgen J, Roscher R *et al.* (2004). Inhibition of leukotriene B4-induced CD11B/CD18 (Mac-1) expression by BIIL 284, a new long acting LTB4 receptor antagonist, in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **63**: 170–176.
- Benjamim CF, Ferreira SH, Cunha FQ (2000). Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J Infect Dis* **182**: 214–223.
- Bombini G, Canetti C, Rocha FA, Cunha FQ (2004). Tumour necrosis factor-alpha mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. *Eur J Pharmacol* **496**: 197–204.
- Brock TG, McNish RW, Mancuso P, Coffey MJ, Peters-Golden M (2003). Prolonged lipopolysaccharide inhibits leukotriene synthesis in peritoneal macrophages: mediation by nitric oxide and prostaglandins. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **71**: 131–145.
- Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G (1993). Interleukin-10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med* **178**: 2207–2211.
- Crockett ET, Remelius C, Hess K, Al-Ghawi H (2004). Gene deletion of P-Selectin and ICAM-1 does not inhibit neutrophil infiltration into peritoneal cavity following cecal ligation-puncture. *BMC Clin Pathol* **4**: 1–13.
- Crooks SW, Stockley RA (1998). Leukotriene B4. *Int J Biochem Cell Biol* **30**: 173–178.
- Crosara-Alberto DP, Darini ALC, Inoue RY, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ (2002). Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by *Staphylococcus aureus*. *Br J Pharmacol* **136**: 645–658.
- Dal Secco D, Moreira AP, Freitas A, Silva JS, Rossi MA, Ferreira SH *et al.* (2006). Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. *Nitric Oxide* **15**: 77–86.
- Haskó G, Virág L, Egnaczyk G, Salzman AL, Szabó C (1998). The crucial role of IL-10 in the suppression of the immunological response in mice exposed to staphylococcal enterotoxin B. *Eur J Immunol* **28**: 1417–1425.

- Hickey MJ, Kubes P (1997). Role of nitric oxide in regulation of leukocyte-endothelial cell interactions. *Exp Physiol* **82**: 339–348.
- Kaplan SS, Billiar T, Curran RD, Zdziarski UE, Simmons RL, Basford RE (1989). Inhibition of chemotaxis with NG-monomethyl-L-arginine: a role for cyclic GMP. *Blood* **74**: 1885–1887.
- Lefler AM, Lefler DJ (1996). The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* **32**: 743–751.
- McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF *et al.* (1993). Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med* **178**: 749–754.
- McCartney-Francis NL, Song X, Mizel DE, Wahl SM (2001). Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease. *J Immunol* **166**: 2734–2740.
- Mello SB, Novaes GS, Laurindo IM, Muscara MN, Maciel FM, Cossermelli W (1997). Nitric oxide synthase inhibitor influences prostaglandin and interleukin-1 production in experimental arthritic joints. *Inflamm Res* **46**: 72–77.
- Muller WA (2003). Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* **24**: 326–333.
- Mulligan MS, Lentsch AB, Ward PA (1998). In vivo recruitment of neutrophils: consistent requirements for L-arginine and variable requirements for complement and adhesion molecules. *Inflammation* **22**: 327–339.
- O'Dell JR (2004). Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **350**: 2591–2602.
- Paul-Clark MJ, Gilroy DW, Willis D, Willoughby DA, Tomlinson A (2001). Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending on their route of administration. *J Immunol* **166**: 1169–1177.
- Ramos CDL, Fernandes KSS, Canetti C, Teixeira MM, Silva JS, Cunha FQ (2006). Neutrophil recruitment in immunized mice depends on MIP-2 inducing the sequential release of MIP-1a, TNF- α and LTB₄. *Eur J Immunol* **36**: 2025–2034.
- Rocha FAC, Aragão AGM Jr, Oliveira RC, Pompeu MML, Vale MR, Ribeiro RA (1999). Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflamm Res* **48**: 485–490.
- Rocha FAC, Teixeira MM, Rocha JCS, Girão VCC, Bezerra MM, Ribeiro RA *et al.* (2004). Blockade of leukotriene B₄ prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. *Eur J Pharmacol* **497**: 81–86.
- Rocha JCS, Peixoto MEB, Jancar S, Cunha FQ, Ribeiro RA, Rocha FAC (2002). Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol* **136**: 588–596.
- Sato Y, Walley KR, Klut ME, English D, Dyachkova Y, Hogg JC *et al.* (1999). Nitric oxide reduces the sequestration of polymorphonuclear leukocytes in lung by changing deformability and CD 18 expression. *Am J Respir Crit Care Med* **159**: 1469–1476.
- Secco DD, Paron JA, De Oliveira SHP, Ferreira SH, Silva JS, Cunha FQ (2003). Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide* **9**: 153–164.
- Sedgwick JD, Riminton DS, Cyster JG, Körner H (2000). Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. *Immunol Today* **21**: 110–113.
- Spiecker M, Darius H, Kaboth K, Hübner F, Liao JK (1998). Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *J Leukoc Biol* **63**: 732–739.
- Steeber DA, Tang ML, Green NE, Zhang XQ, Sloane JE, Tedder TF (1999). Leukocyte entry into sites of inflammation requires overlapping interactions between the L-selectin and ICAM-1 pathways. *J Immunol* **163**: 2176–2186.
- Tavares-Murta BM, Cunha FQ, Ferreira SH (2001). Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS. *Inflammation* **25**: 247–253.
- Teixeira MM, Williams TJ, Hellewell PG (1993). E-type prostaglandins enhance local oedema formation and neutrophil accumulation but suppress eosinophil accumulation in guinea pig skin. *Br J Pharmacol* **110**: 416–422.
- Tran CN, Lundy SK, Fox DA (2005). Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology* **12**: 183–189.

- van de Loo FA, Arntz OJ, van Enkevort FH, van Lent PL, van den Berg WB (1998). Reduced cartilage proteoglycan loss during zymosaninduced gonarthritis in NOS2-deficient mice and in antiinterleukin-1-treated wild-type mice with unabated joint inflammation. *Arthritis Rheum* **41**: 634–646.
- van Uffelen BE, de Koster BM, van den Broek PJ, Van Steveninck J, Elferink JG (1996). Modulation of neutrophil migration by exogenous gaseous nitric oxide. *J Leukoc Biol* **60**: 94–100.
- Wanikiat P, Woodward DF, Armstrong RA (1997). Investigation of the role of nitric oxide and cyclic GMP in both the activation and inhibition of human neutrophils. *Br J Pharmacol* **122**: 1135–1145.

De: onbehalf of BJPedoffice+wiley.com@manuscriptcentral.com
[mailto: onbehalf of BJPedoffice+wiley.com@manuscriptcentral.com] Em nome
de BJPedoffice@wiley.com

Enviada em: segunda-feira, 21 de junho de 2010 19:36

Para: arocha@ufc.br

Assunto: 2010-BJP-0212-RP: Decision

21-Jun-2010

Dear Dr Rocha,

Re 2010-BJP-0212-RP: "Phosphodiesterase-5 inhibition by tadalafil provides TNF-dependent analgesia in experimental arthritis"

Your paper has been seen by an editor and expert referees. I enclose below the comments received that set out a number of points which will need your attention before we can consider the submission further. I would urge you to give these points your careful attention.

I hope that you will be prepared to make the necessary amendments and submit a revised manuscript within three months. This should be accompanied by a statement of how you have responded to the criticisms raised, preferably numbered point by point. Should you decide that you do not wish to submit a revised manuscript to BJP, please contact the Editorial Office so we may withdraw your manuscript from the system. Please highlight the changes to your manuscript within the document by using the track changes mode in MS Word or by using bold or colored text. Please read the author instructions carefully prior to re-submission.

Please DO NOT upload your revised manuscript as a new submission. To revise your submitted manuscript, log into <http://mc.manuscriptcentral.com/bjp> and enter your Author Centre, where you will find your manuscript title listed under "Manuscripts with Decisions." Under "Actions" click on "Create a Revision". Your manuscript number will be appended to denote the revision.

IMPORTANT: Your original files are available to you when you upload your revised manuscript. Please delete any redundant files before completing the submission.

Colour in the British Journal of Pharmacology is free; where appropriate, please consider submitting your figures in colour. You can also refer to <http://www.blackwellpublishing.com/authors/digill.asp>

Thank you for submitting your work to the British Journal of

Pharmacology.

Yours sincerely,

Professor Paul Hellewell

Senior Editor, British Journal of Pharmacology

p.g.hellewell@sheffield.ac.uk

Editor's Comments to Author:

Editor

Comments to the Author (REQUIRED):

The manuscript by Rocha et al. seems to be a revision, but probably the original ms was sent some time ago. There has been some changes in the editorial processed of BJP, and we could not trace the original reviewers. Also, the authors did not provide any point-to-point response to the comments of the previous reviewers. Therefore, the manuscript was handled as a new submission.

The manuscript was evaluated by two expert Reviewers and the Editors. The topic and findings were found interesting but also some problems and needs for revision were found out. The authors should carefully consider the comments of the Reviewers and to make changes accordingly. In addition, the authors should pay attention to 1) the discussions which in some parts is too speculative; 2) to the figures, especially the symbols in many places are not clearly explained in the figure legends; 3) to the fact that Fig 3b and Results in page 11 give contradictory information about the effect of naloxone on the TD-induced decrease of neutrophil migration.

Reviewers' Comments to Author:

Reviewer: 1

Comments to the Author

Overall, this is a potentially important manuscript, but difficult to follow in its present format. This manuscript describes the role of a phosphodiesterase inhibitor in rodent models of rheumatoid and osteoarthritis. The concept that PD5 inhibitors may be analgesic in arthritis is of interest. Two models have been used: an acute zymosan-induced model and an anterior cruciate ligament model of relevance to osteoarthritis. However, the more interesting model, the ligament model has only been studied for pain, and the results are significant, but seem marginal. In addition, the effect of the TNF antibodies have not been investigated in this model.

Major points are as follows:

Figure 1b. It is not totally clear how these results have been obtained. The results look very marginal. As the need for new drugs for OA is very important, there is a real need to concentrate on the pain relief offered by the PD5 inhibitor in this model. Later in the manuscript it is shown that the inhibitor stops inflammation. I think it would be

better if the authors concentrated on the zymosan model and then put this OA result last, fully explained and with a description of how the dose was chosen, based on the zymosan model, where the mechanisms have been evaluated.

In addition, the believed mechanism from the zymosan model should be evaluated in this model, otherwise I am not sure why it is here.

Quite a diverse range of drugs have been used to dissect mechanisms of Zy-induced inflammation. The graphs are not easy to follow. Could this be better represented as a Table?

The NO section in the Discussion needs to be tightened up. I cannot quite follow it. The discussion needs to be more closely aligned to the present results and written in a more concise manner.

Other points.

There are too many abbreviations. This is really confusing. There is no need to abbreviate zymosan, or the PD5 inhibitor, or the paw withdrawal threshold. Instead of being able to concentrate on understanding the manuscript, one is drawn in to trying to remember all the abbreviations. There are many typographical errors and figures are not labelled with their numbers. The individual parts of the figures have not been put together, which also leads to confusion.

It is not stated why the studies with TNF α antibodies have been carried out, indeed explanation of purpose is lacking in several of the results sections. The TNF antibody experiments are not mentioned in the abstract.

The data with morphine and naloxone would be good to include, to strengthen the section where all these different drugs are used.

Reviewer: 2

Comments to the Author

I think this paper has some interesting elements. However there are a few issues that need to be considered.

1. The presentation of the figures could have been better and working out which figures were which could have been made easier. Following on from this point is that explanation of the statistical treatments/comparisons is jumbled and mostly inadequate. For example it is not properly or explicitly indicated what comparisons the hash symbols and the cross symbols refer to.

2. I think figure 3b could be problematical (page 29). First off, there are no naïve cell counts. Also, I think saying that these effects of tadalafil on cell infiltration are cGMP mediated based on these data are quite difficult to accept. Clearly there's a difference here with figure 2 (page 27) where analgesia has been measured. In figure 3b, naloxone seems to have done quite a bit to the effects of tadalafil but it is a disadvantage that naloxone alone versus zymosan

challenge was not studied (the same holds for figure 2 as well - data for naloxone alone have not been provided). I think the best that can be said about the effects of tadalafil on cell infiltration is that the mechanism(s) are unclear. This might involve cGMP but the data with SIN in figure 3b suggest otherwise. This needs to be reflected in the Abstract and Discussion. Since the authors invoke TNF as being important in mediating cell infiltration, it might be interesting to see whether SIN affects TNF production.

3. Following on from this, the authors have looked at 3 cytokines and show an effect of the inhibitor on TNF. However, is there a possibility that other cytokines might be involved in these models and shouldn't this be made evident to the reader?

4. I think that the Conclusions part of the Abstract is confusing as the Authors seem to indicate that tadalafil inhibits guanylyl cyclase.

5. I think the title of the paper is misleading as it implies that TNF provides analgesia.

6. There are a few typos here and there and I think CINC-1 should be spelt out in full the first time it appears.

The 2009 BJP Guide to Receptors and Channels is now available to download free at

<http://www3.interscience.wiley.com/journal/122684220/issue>

This email and any files transmitted with it are confidential and are intended solely for the use of the individual or entity to whom they are addressed. They should not be used by anyone who is not the original intended recipient. If you have received this email in error please inform the sender and delete it from your mailbox or any other storage mechanism. The views expressed in this email and files transmitted with it are those of the individual not the Society.

Internet communications may not be secure and the British Pharmacological Society is not responsible for their abuse by third parties nor for any alteration or corruption in transmission. All emails sent to or from this address may be subject to review by authorised personnel of the Society. No contracts may be concluded on behalf of the British Pharmacological Society by means of email communication.

British Pharmacological Society

Registered in England and Wales with registered number 2877400

Registered Office: 16 Angel Gate, City Road, London, EC1V 2SG

Registered Charity no. 1030623

Phosphodiesterase-5 inhibition by tadalafil provides TNF-dependent analgesia in experimental arthritis

***¹FAC Rocha, ¹FS Silva Jr., ¹ACRM Leite, ¹AKRM Leite, ²VCC Girão & ³FQ Cunha**

¹Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil;

²Faculty of Veterinary Medicine, Ceará State University, Fortaleza, Ceará, Brazil;

³Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Running title: Tadalafil provides analgesia in experimental arthritis

***Author for correspondence: Email: arocha@ufc.br**

Summary

Background and purpose: We investigated the effect of the phosphodiesterase (PDE)-5 inhibitor tadalafil (TD) in the acute hypernociception in the zymosan (Zy) and anterior cruciate ligament transection (ACLT) arthritis models.

Experimental approach: Rats were subjected to either intra-articular (i.art.) injection of 1mg Zy or surgical ACLT, used as an osteoarthritis (OA) model. Controls received saline i.art. or sham operation, respectively. Joint pain was evaluated using the articular incapacitation test measured over 6 h following Zy or between 4 and 7 days after ACLT. Cell counts, tumor necrosis factor- α (TNF), interleukin-1 (IL-1), and CINC-1 levels were measured in joint exudates 6 h after Zy. Groups received TD (0.02 – 0.5 mg kg⁻¹ *per os*) or saline 2 h after i.art. Zy. Other groups received the μ -opioid receptor antagonist naloxone or the cGMP inhibitor 1H- [1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) prior to TD.

Key results: Administration of TD dose-dependently inhibited hypernociception in Zy and OA models. TD significantly decreased cell influx and TNF release in Zy arthritis while not altering IL-1 or CINC-1 levels. Pre-treatment with ODQ but not with naloxone prevented the anti-inflammatory effects of TD.

Conclusions and implications: Therapeutic oral administration of TD provides analgesia mediated by guanylyl cyclase inhibition that is independent of endogenous opioids release. This effect of TD is associated to a decrease in neutrophil influx and TNF release into inflamed joints.

Keywords: Tadalafil; phosphodiesterase; arthritis; pain; TNF; cytokines; zymosan

Abbreviations: ACLT, anterior cruciate ligament transection; i.art., intra-articular; iNOS, inducible NOS; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; IL-1, interleukin-1; NO, nitric oxide; OA, osteoarthritis; ODQ, 1H- [1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one; PET, paw elevation time; PDE, phosphodiesterase; PGE₂, prostaglandin E₂; TD, tadalafil; Zy, zymosan.

Introduction

Modulation of pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators by specific phosphodiesterase (PDE) inhibitors is a growing strategy for the treatment of inflammatory diseases (Perry and Higgs, 1998). Cilomilast, a cAMP-specific PDE inhibitor, has been evaluated in clinical trials for inflammatory airway diseases (Rennard *et al.*, 2006). Our group has shown that the PDE-4 inhibitor rolipram promotes antinociception and anti-inflammatory effects in a rat model of adjuvant-induced arthritis that were associated with reduction of local and systemic TNF- α production (Francischi *et al.*, 2000), raising the possibility that other PDE inhibitors share similar effects.

The nitric oxide (NO) – cyclic GMP (cGMP) pathway participates in nociception in inflammatory arthritis. Intracellular cGMP concentrations are controlled by the action of guanylyl cyclases and its degradation rate by specific phosphodiesterases; PDE-5, 6, and 9 degrade cGMP, but PDE-5 seems to be the most relevant in cGMP inactivation inside cells (Beavo, 1995). As a consequence, the antinociceptive effects of PDE inhibitors are associated with an increase of intracellular cGMP levels in the nociceptive neuron. There is considerable evidence that sildenafil, a PDE-5 inhibitor used in the treatment of erectile dysfunction, produces antinociception in pain models (Asomoza-Espinosa *et al.*, 2001; Jain *et al.*, 2001). On the other hand, it has also been reported that zaprinast, another PDE-5 inhibitor, had no effect on prostaglandin E₂ (PGE₂) and carrageenan – induced hyperalgesia (Amarante and Duarte, 2002) suggesting that the antinociceptive effect of PDE-5 inhibitors may vary among different models.

The biological effects of PDE inhibitors have been associated to cytokine inhibition. Zaprinast reduced both TNF- α and IL-6 production by murine alveolar epithelial cells exposed to lipopolysaccharide (Haddad *et al.*, 2002), and it also reduced PGE₂ release by porcine epithelial cells exposed to arachidonic acid whilst not affecting TNF- α induced IL-8 release by bronchial cells (Fuhrmann *et al.*, 1999).

Presently, there are three PDE-5 inhibitors in clinical practice to treat erectile dysfunction: sildenafil, tadalafil (TD), and vardenafil (Shabsigh, 2004). Although they present similar mechanisms of action variations in the structure, pharmacokinetics, and PDE specificity may account for differences among them (Blount *et al.*, 2004). In keeping with this assumption, it was recently demonstrated that TD, but not sildenafil

or vardenafil, significantly decreased hypoxia induced up-regulation of TNF- α and IL-1 β in isolated rat pulmonary arteries (Tsai *et al.*, 2006).

The anterior cruciate ligament transection (ACLT) model has been widely used in different species as an experimental OA model. We have recently standardized a method to reproducibly and quantitatively study joint pain that occurs in this model (Castro *et al.*, 2006). In the present study, we investigated the antinociceptive activity of TD in the zymosan (Zy) and ACLT arthritis models. Our data demonstrate that oral administration of TD provides therapeutic antinociception and is associated to decreased neutrophil influx into inflamed joints as well as with a reduction of intra-articular TNF- α levels in Zy-arthritis.

Materials and methods

Animals. Male Wistar rats (180-200g) from the animal colony of the Ceará State University (UECE) were used throughout the experiments. The experimental protocol was approved by our local ethics committee, which follows the guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation.

Evaluation of joint pain in zymosan arthritis. Rats were subjected to intra-articular (i.art.) injection of 1 mg Zy (50 μ l total volume), dissolved in sterile saline, into their right knee joints. A control group received only i.art. saline. We used the rat knee-joint incapacitation test, as a measure of inflammatory joint hypernociception (Rocha *et al.*, 1999). Briefly, after injection of the Zy, animals were put to walk on a steel rotary drum (30 cm wide x 50 cm diameter), covered with a fine-mesh non-oxidizable wire screen, which rotates at 3 rpm. Specially designed metal gaiters were wrapped around both hind-paws. After placement of the gaiters, the animals were allowed to walk freely for habituation. The right paw was then connected *via* a simple circuit to a microcomputer data input/output port. The paw elevation time (PET) is the time that during a 60 s period the inflamed hind-paw is not in contact with the cylinder. This is directly proportional to the articular incapacitation. The PET was measured at baseline and then hourly, until sacrifice, at 6 h after injection of the Zy, irrespective of the drug treatment. Results (s / 1 min) are reported as the maximal PET that occurs between 3 and 4 hours after injection of the Zy.

Assessment of articular hypernociception in the anterior cruciate ligament transection model. Animals were anesthetized with chloral hydrate (400

mg / kg) and subjected to ACLT of the right hind-paw. A sham group was subjected to the same surgical procedure, without excision of the ligament. Joint pain (hypernociception) was assessed as described above. However, the paw elevation time (PET) was measured over a 10 min period during the first 7 days following ACLT. In this model, data are presented as Δ PET, which stands for values above 115 s / 10 min established as a cut-off baseline mean value for naïve rats. Values between day 1 and day 3 after ACLT are attributed to surgical trauma. Data obtained between day 4 and 7 are used in analysis (Castro et al., 2006). Results (s / 10 min) are reported as the maximal Δ PET that occurs between days 4 and 7 after ACLT.

Assessment of cell influx and cytokines release in the joint lavage. At 6 h after injection of the Zy the animals were anaesthetized (chloral hydrate 400 mg / kg i.p.), killed by cervical dislocation, and ex-sanguinated. The synovial cavity of the knee joints was then washed with 0.4 ml saline containing 10 mM EDTA. The synovial exudates were collected by aspiration and total cell counts were performed using a Neubauer chamber. After centrifuging (500 g / 10 min), the supernatants were used for measuring the concentrations of TNF- α , IL-1 β , and CINC-1/CXCL1, using ELISA. Briefly, 96-well microtiter plates (NUNC-Immuno™ Plate) were coated overnight at 4°C with sheep polyclonal anti-rat TNF- α , sheep polyclonal anti-rat IL-1 β or sheep polyclonal anti-rat CINC-1, diluted in 50 μ l PBS buffer. These antibodies were provided by Dr. Steeve Poole (National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), UK). Blocking of nonspecific binding sites was accomplished by incubating plates with PBS containing 2% BSA for 90 min at 37°C. A secondary rabbit biotinylated immunoaffinity-purified antibody was added, followed by incubation for 1 h (22°C). Finally, 100 μ l of avidin-HRP (1:5000 dilution; DAKO A/S, Denmark) was added to each well; after 30 min the plates were washed and the color reagent OPD (40 μ g / well) was added. After 15 min, the reaction was stopped with 1 M H₂SO₄ and the O.D. was measured at 490 nm. Cytokine concentration was expressed as pg / ml.

Pharmacological interventions. Groups received TD (Cialis® - purchased from Eli Lilly do Brasil Ltda. São Paulo, SP, Brasil) (0.02 – 0.5 mg kg⁻¹) *per os*, dissolved in sterile saline, 2 h after injection of 1mg Zy into the right hind-paw (therapeutic intervention). Controls received the vehicle (saline). Other groups received naloxone, morphine sulphate (Laboratórios Cristália do Brasil Ltda. São

Paulo, SP, Brasil) or the cGMP inhibitor 1H- [1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) (Cayman Chem. Co. Ann Arbor, MI, USA), prior to TD administration. In an attempt to demonstrate the antinociceptive effect of an NO donor, a group received 3-morpholinonydnimine (SIN-1) 10 µg i.art. 2 h after Zy. Another group received a 50 µl injection of a sheep anti-rat TNF antiserum (NIBSC, UK) into the knee joint 2 h after the injection of 1 mg Zy.

Statistics. Results are expressed as means \pm S.E.M. Differences between means were evaluated using one-way ANOVA, followed by Tukey's test. Significance was set at $P < 0.05$.

Results

Antinociceptive effect of tadalafil in experimental arthritis in rats. Figure 1a shows that the administration of TD dose-dependently reduced the PET in Zy-induced arthritis in rats. The PET in the group that received TD (0.5 mg kg^{-1}) was significantly reduced (up to 49% reduction) at both 3 and 4 h following injection of the Zy, as compared to vehicle-treated rats. Similar to what was observed in Zy arthritis, the administration of TD (0.5 mg kg^{-1}) did also significantly reduce the PET in rats subjected to ACLT (experimental OA), as shown in figure 1b.

Effect of pre-treatment with naloxone upon the anti-nociceptive activity of tadalafil in Zy arthritis. Administration of naloxone (1 mg kg^{-1} i.p.) given 30 min before TD (0.5 mg kg^{-1} *per os*) did not reverse the anti-nociceptive effect of TD in the Zy arthritis thus suggesting that endogenous opioids do not contribute to the analgesic effect of TD (figure 2). As a control of the efficacy of naloxone, a group of animals subjected to Zy arthritis that received morphine prior to the Zy, thus preventing the joint hypernociception, had the morphine effect reversed by the co-administration of naloxone at the same dose that was used with TD (data not shown).

Effect of a sGMP inhibitor on the antinociceptive effect of tadalafil. The isolated i.art. administration of the cGMP inhibitor ODQ did not alter joint pain in rats subjected to Zy arthritis. However, ODQ given i.art. prior to 0.5 mg kg⁻¹ TD *per os* significantly blocked the antinociceptive effect of this later compound, indicating that the analgesic effect of TD is mediated through cGMP inhibition (figure 2). Figure 2 does also illustrate that the NO donor SIN-1 (10µg) given i.art. 2h after the Zy significantly inhibited joint pain. This therapeutic antinociceptive effect of SIN-1 effect was reversed by the co-administration of ODQ.

Effect of tadalafil in the acute cell influx in zymosan arthritis. As reported previously (Rocha et al., 1999), the cell influx into the joint cavity obtained at 6h of Zy arthritis is mostly (>85%) composed of neutrophils (data not shown). Similar to what was seen in joint hypernociception, the administration of TD (0.5 mg kg⁻¹ *per os*) significantly reduced this neutrophil infiltration (figure 3a). We should stress that the same effective dose of TD that provided analgesia (see figure 1a) did also reduce neutrophil influx into the joints in Zy arthritis. As shown in figure 3b, pre-treatment with the µ-opioid receptor antagonist naloxone did not prevent the inhibition of neutrophil migration provided by TD (0.5 mg kg⁻¹) whereas co-administration of the cGMP inhibitor ODQ significantly reversed the inhibitory effect of TD in neutrophil migration in Zy arthritis (figure 3b). Figure 3b illustrates that the NO donor SIN-1 (10µg) given i.art. 2h after the Zy did not alter cell influx.

Effect of tadalafil on cytokines release in zymosan arthritis. The effect of the administration of TD (0.5 mg kg⁻¹ *per os*) on the release of IL-1β, TNF-α, and CINC-1 into the joints is shown in figures 4a, 4b, and 4c, respectively. There was a significant decrease of TNF-α releases, while levels of IL-1β and CINC-1 were not altered.

Effect of the local administration of an anti-TNF antiserum. As expected, the intra-articular injection of an anti-TNF antiserum significantly reduced both hypernociception and cell influx into the joints of rats subjected to Zy arthritis (figures 5a, 5b).

Discussion

In the present study, we demonstrate that the PDE-5 inhibitor TD displays *in vivo* systemic anti-inflammatory activity by providing antinociception and inhibition

of neutrophil migration in Zy arthritis. TD was effective when administered *per os* in ongoing Zy arthritis and these effects were coupled to a reduction of the intra-articular levels of TNF- α . Additionally, the antinociceptive activity of TD occurred in both severely inflamed joints, with a prominent participation of neutrophils, as well as in the milder inflammatory ACLT osteoarthritis (OA) model, where there is no detectable cell influx (Castro *et al.*, 2006). Moreover, the fact that we obtained similar analgesia in two mechanistically different arthritis models indicate a common pathway involving activation of PDE-5 in joint nociception. To our knowledge, there is no data reporting intrinsic analgesia linked to TD. However, a very recently published randomized clinical trial has shown that TD alleviated symptoms in patients with the complex regional pain syndrome. This effect was attributed to microvascular changes promoted by TD, rather than to an intrinsic activity of this compound on pain mechanisms (Groeneweg *et al.*, 2008).

The role of the L-arginine:NO system in pain development in arthritis is still a matter of debate. While the administration of an NO synthase (NOS) inhibitor reversed thermal hyperalgesia in carrageenin arthritis (Lawand *et al.*, 1997) the NO donor 3-Morpholinonyldonimine (SIN-1) produced either analgesia or nociception in rats, depending on the dose and the pain model (Sousa and Prado, 2001). In the Zy-arthritis model in rats, we have shown that NOS inhibitors do not prevent analgesia in ongoing arthritis whereas exogenous NO donors displayed intrinsic antinociceptive activity (da S Rocha *et al.*, 2002). We reproduced these data in the present study, showing that SIN-1 inhibits ongoing hypernociception in Zy arthritis, while not significantly altering cell infiltration into the joints, thus suggesting that these phenomena are modulated by diverse mechanisms. Analogous to what happens in other tissues joint derived pain is not necessarily linked to the presence of inflammatory cells. In fact, though both zymosan arthritis and the ACLT model display hypernociception, there is no detectable cell influx in the ACLT whereas a prominent neutrophil infiltration is a hallmark in Zy arthritis. Similar to what we observed with TD, the antinociceptive effect of SIN-1 was reversed by the co-administration of SIN-1 and ODQ, thus suggesting that the intrinsic analgesic activity of SIN-1 depends on cGMP inhibition.

We have shown that intra-articular levels of NO increase as OA develops following ACLT, which is associated to enhanced immune-detection of the inducible

NOS isoform in synovial cells. However, NOS inhibitors were able to block the hypernociceptive response in this model only when injected prophylactically (Castro *et al.*, 2006). There are no specific data on the role of the L-arginine-NO pathway in pain development in OA. One of the proposed mechanisms for the hyperalgesia involving high NO levels is the secondary formation of potent oxidant species, e.g. peroxynitrite. We have shown that scavenging of peroxynitrite provided analgesia in the Zy arthritis model in rats (Bezerra *et al.*, 2004). Considering that OA may share common inflammatory pathways with other arthritis models, it seems plausible that reactive nitrogen/oxygen species are also involved in the hypernociceptive response associated with OA. However, this remains to be demonstrated.

As mentioned in the introduction section, antinociception following the administration of PDE-5 inhibitors may vary depending on pharmacokinetic differences as well as in the route of administration, animal species and pain models studied. Among the mechanisms responsible for the anti-inflammatory effect of TD we should include modulation of cGMP levels, endogenous opioids release and the release of inflammatory mediators.

Our data demonstrate that pretreatment with a specific soluble guanylyl cyclase inhibitor, namely ODQ, completely blocked the antinociceptive activity as well as the inhibition of neutrophil migration provided by TD. Similar data were reported with sildenafil, where the enhancement of the antinociceptive activity of morphine provoked by sildenafil was reversed by the co-administration of methylene blue, used as a cGMP inhibitor (Jain *et al.*, 2003). In that same study, naloxone, an μ -opioid antagonist, did also reverse the antinociceptive effect of sildenafil. However, in our hands, co-administration of TD and naloxone did not reverse the antinociceptive effect leading us to conclude that the analgesic effect of TD in arthritis does not depend on the release of endogenous opioids.

TNF- α is considered a pivotal cytokine in joint inflammatory hypernociception. As expected, the blockade of TNF by the local administration of an anti-TNF antiserum significantly reduced both joint hypernociception and cell influx. Interestingly, the administration of TD, in a dose that significantly prevented joint hypernociception as well as inhibited neutrophil migration, reduced TNF- α levels release into the joint exudates, as compared to vehicle-treated rats. On the other hand, intra-articular levels of the both IL-1 β and CINC-1 were not altered. This is the

first demonstration that a PDE-5 inhibitor decreases the local *in vivo* release of cytokines, specifically TNF- α . The fact that the dose of TD that was anti-inflammatory was similarly effective in reducing intra-articular TNF- α levels renders it likely that these phenomena are associated.

Inhibition of neutrophil migration by TD could be a consequence of the reduction of rolling and adhesion of leukocytes to the endothelium. Apart from being an important source of prostaglandins, neutrophils can contribute to hypernociception through the release of other substances, such as leukotriene B₄ (Rocha *et al.*, 2004). In addition, we have recently demonstrated that neutrophils-derived peroxynitrite, a reactive nitrogen species, is involved in joint hypernociception in Zy arthritis in rats (Bezerra *et al.*, 2007). Also, the antinociceptive effect of TNF- α blockade, either with antibodies or with the compounds thalidomide, pentoxifylline, and chlorpromazine in experimental arthritis was shown to be linked to a reduction in the neutrophil influx into the joints (Bombini *et al.*, 2004).

Sensitization of nociceptors occurs as a secondary process following the release of a cytokine cascade (Cunha *et al.*, 1991). For instance, during inflammation TNF- α release induces the liberation of IL-1 β and IL-6 as well as the production of cyclooxygenase products. TNF- α may also trigger the release of IL-8, that induces the production of sympathomimetic mediators (Cunha *et al.* 1992). Rats do not produce IL-8. However, CINC-1 may be considered the correspondent for IL-8 in rats. Actually, CINC-1 and IL-8 display great similarities, including coupling to the same receptor. Recently, our group demonstrated that CINC-1 is directly associated with the development of inflammatory hyperalgesia in rats (Cunha *et al.*, 2008). Considering that CINC-1 participates in inflammatory pain in rats, we asked whether TD modulates CINC-1 levels in arthritis. However, the intra-articular levels of CINC-1 were not altered by TD administration, thus arguing against a role for CINC-1 to explain the anti-inflammatory effects of TD in Zy arthritis. As discussed above, there is little evidence for the anti-inflammatory effect of PDE-5 inhibitors. Some *in vitro* experiments have suggested that TD can reduce the upregulation of TNF- α and IL-1 β (Tsai *et al.*, 2006), which are pivotal cytokines in inflammatory arthritis, and the same effect was not demonstrated for sildenafil or vardenafil. Our data are the first *in vivo* demonstration that PDE-5 inhibitors modulate cytokine release in experimental

arthritis. The intracellular mechanisms involved in this phenomenon should be further explored.

The synovium is a richly irrigated tissue. Therefore, endothelial cells are natural candidates as the main source for PDE-5 in the joints. However, PDE-5 has never been shown to be expressed in the synovial endothelium. On the other hand, it was demonstrated that chondrocytes specifically express the mRNA for PDE-5 and the activity of PDE in these cells is increased following stimulation with IL-1 (Geng *et al.*, 1998). More recently, using SW982 cells, a human synovial cell line, it was identified that cGMP hydrolysis by PDE was specifically due to the PDE-5 isoform (Kim *et al.*, 2008). Hence, considering the acute nature of the joint hypernociception in Zy arthritis we speculate that synoviocytes, in addition to endothelial cells in the synovium, are probably involved in PDE-5 activity in the joints.

In summary, we have shown that TD has *in vivo* therapeutic anti-inflammatory effects by promoting antinociception and reducing the leukocyte influx into the synovial cavity in Zy arthritis. Moreover, TD was effective when given *per os*, thus indicating a therapeutic potential in humans. The analgesic effect is probably secondary to the activation of cGMP in the nociceptive neuron and does not appear to depend on the release of endogenous opioids. In addition to the specific direct effect via cGMP modulation, we propose that the antinociceptive effect of TD is also linked to a decreased release of TNF associated to the reduction of neutrophil migration into the joints. Usually, the target patient to receive PDE-5 inhibitors to treat erectile dysfunction is also affected by osteoarthritis. The possibility of joint pain relief provided by these compounds offered as a bonus could possibly increase patient adherence to the therapy.

Conflicts of Interest: None

Acknowledgements: This work was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). Giuliana Bertozzi for assistance with the ELISA procedures.

References

- Amarante LH, Duarte ID (2002). The kappa-opioid agonist (+/-)-bremazocine elicits peripheral antinociception by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol* **454**:19-23.
- Asomoza-Espinosa R, Alonso-López,R, Mixcoatl-Zecuatl T, Aguirre-Bañuelos P, Torres-López JE, Granados-Soto V (2001). Sildenafil increases diclofenac antinociception in the formalin test. *Eur J Pharmacol* **418**: 195–200.
- Beavo JA (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* **75**: 725–745.
- Bezerra MM, Brain SD, Greenacre S, Jerônimo SM, de Melo LB, Keeble J, et al (2004). Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. *Br J Pharmacol* **141**: 172-82.
- Blount MA, Beasley A, Zoraghi R, Sekhar KR, Bessay EP, Francis SH, et al (2004). Binding of tritiated sildenafil, tadalafil, or vardenafil to the phosphodiesterase-5 catalytic site displays potency, specificity, heterogenicity and cGMP stimulation. *Moll Pharmacol* **66**:144-152.
- Castro RR, Cunha FQ, Silva Jr FS, Rocha FAC (2006). A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis - evidence of a role for nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage* **14**:769-776.
- Cunha FQ, Lorenzetti BB, Poole S, Ferreira SH (1991). Interleukyn-8 as a mediator of sympathetic pain. *Br J Pharmacol* **104**:765-767.
- Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH (1992). The pivotal role of tumor necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* **107**:660-664.
- Cunha TM, Verri WA Jr, Schivo IR, Napimoga MH, Parada CA, Poole S, et al (2008). Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J Leukoc Biol* **83**:824-32.
- da S Rocha JC, Peixoto ME, Jancar S, de Q Cunha F, de A Ribeiro R, da Rocha FA (2002). Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol* **136**: 588-96.

Francischi JN, Yokoro CM, Poole S, Tafuri WL, Cunha FQ, Teixeira MM (2000). Anti-inflammatory and analgesic effects of the phosphodiesterase 4 inhibitor rolipram in a rat model of arthritis. *Eur J Pharmacol* **399**:243–249.

Fuhrmann M, Jahn HU, Seybold J, Neurohr C, Barnes PJ, Hippenstiel S, et al (1999). Identification and function of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**:292-302.

Geng Y, Zhou L, Thompson WJ, Lotz M (1998). Cyclic GMP and cGMP-binding phosphodiesterase are required for interleukin-1-induced nitric oxide synthesis in human articular chondrocytes. *J Biol Chem* **273**: 27484–27491.

Groeneweg G, Huygen FJ, Niehof SP, Wesseldijk F, Busmann JB, Schasfoort FC, et al (2008). Effect of tadalafil on blood flow, pain, and function in chronic cold Complex Regional Pain Syndrome: a randomized controlled trial. *BMC Musculoskeletal Disord* **9**:143.

Haddad JJ, Land SC, Tarnow-Nordi WO, Zembala M, Kowalczyk D, Lauterbach R (2002). Immunopharmacological potential of selective phosphodiesterase inhibition. I. Differential regulation of lipopolysaccharide-mediated proinflammatory cytokine (interleukin-6 and tumor necrosis factor- α) biosynthesis in alveolar epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **300**: 559-566.

Jain NK, Patil CS, Singh A, Kulkarni SK (2001). Sildenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide–cyclic GMP pathway. *Brain Res* **909**: 170–178.

Jain NK, Patil CS, Singh A, Kulkarni SK (2003). Sildenafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, enhances the antinociceptive effect of morphine. *Pharmacology* **67**: 150–156.

Kim KO, Park SY, Han CW, Chung HK, Ryu DH, Han JS (2008). Effect of sildenafil citrate on interleukin-1 β -induced nitric oxide synthesis and iNOS expression in SW982 cells. *Exp Mol Med* **40**:286-293.

Lawand NB, Willis WD, Westlund KN (1997). Blockade of joint inflammation and secondary hyperalgesia by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. *Neuroreport* **8**: 895-9.

Lohmander LS, Ostberg A, Englund M, Roos H (2004). High prevalence of knee osteoarthritis, pain, and functional limitations in female soccer players twelve years after anterior cruciate ligament injury. *Arthritis Rheum* **50**:3145-3152.

- morphine antinociception in the formalin test. *Eur J Pharmacol* **400**: 81–87.
- Perry MJ, Higgs GA (1998). Chemotherapeutic potential of phosphodiesterases inhibitors. *Curr Opin Chem Biol* **2**: 472–81.
- Rennard SI, Schachter N, Streck M, Rickard K, Amit O (2006). Cilomilast for COPD: results of a 6-month, placebo-controlled study of a potent, selective inhibitor of phosphodiesterase 4. *Chest* **129**:56-66.
- Rocha FAC, Aragão AGM, Oliveira RC, Pompeu MML, Vale MR, Ribeiro RA (1999). Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflamm Res* **48**: 485-490.
- Shabsigh R (2004). Therapy of ED: PDE-5 inhibitors. *Endocrine* **23**: 135-141.
- Sousa AM, Prado WA (2001). The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res* **897**: 9-19.
- Tsai BM, Turrentine MW, Sheridan BC, Wang M, Fiore AC, Brown JW, et al (2006). Differential effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary artery cytokine expression. *Ann Thorac Surg* **81**:272-278.

Figure 1

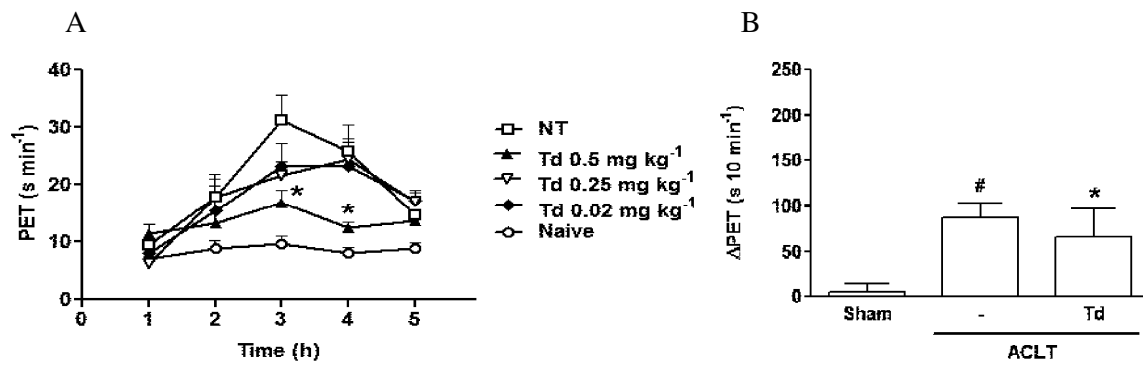


Figure 2

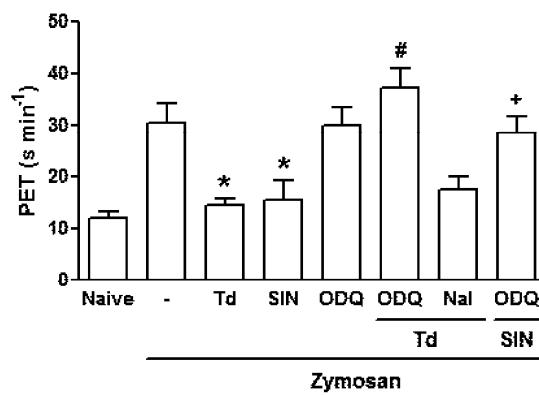


Figure 3

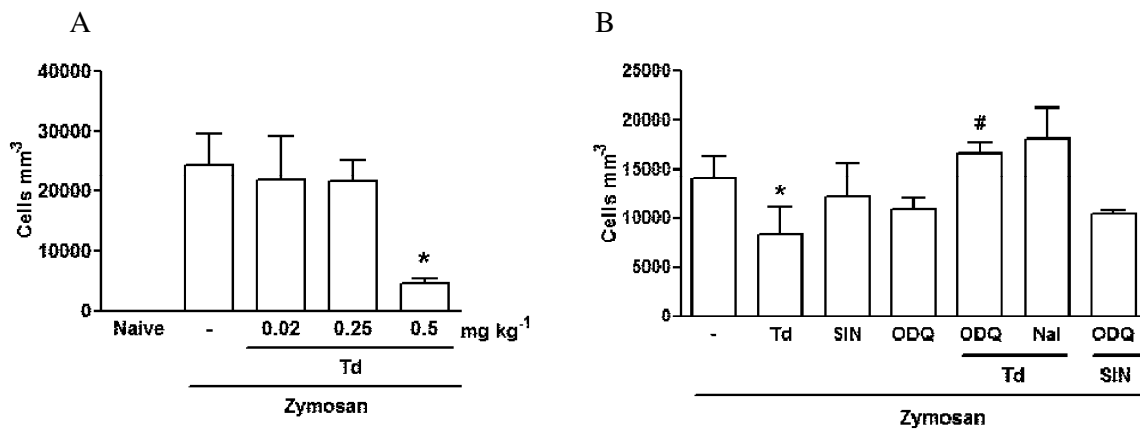


Figure 4

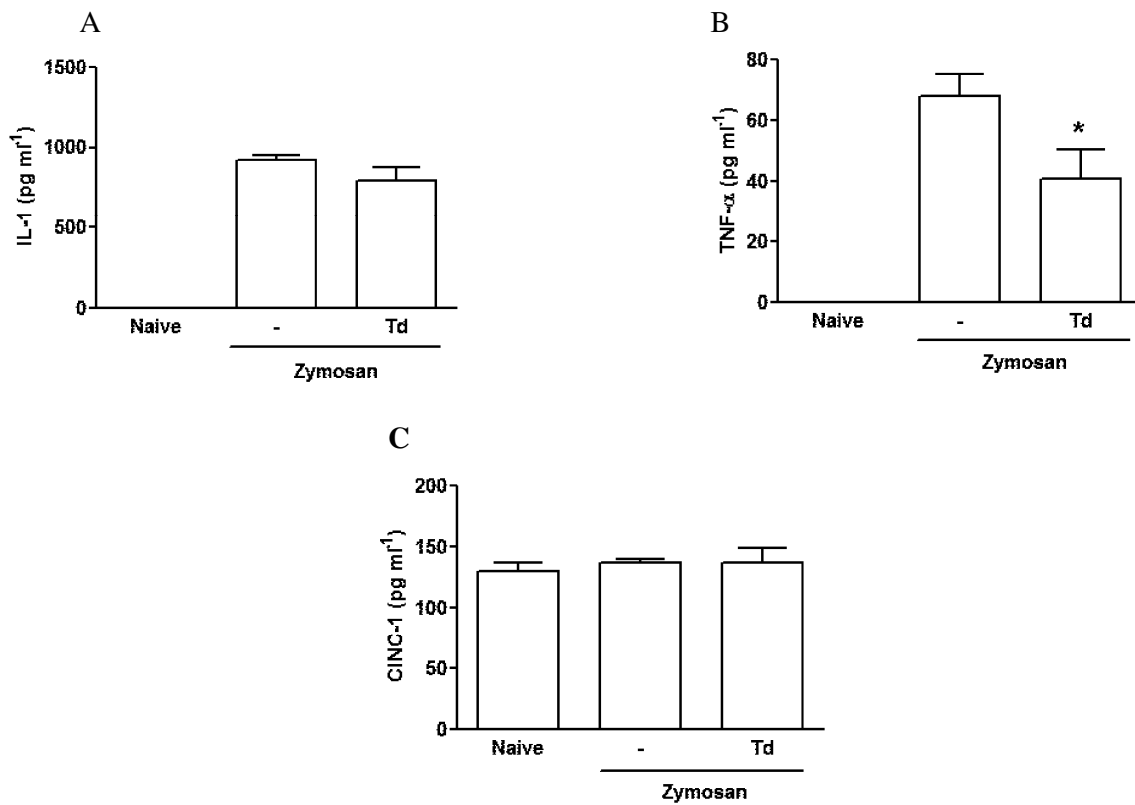


Figure 5

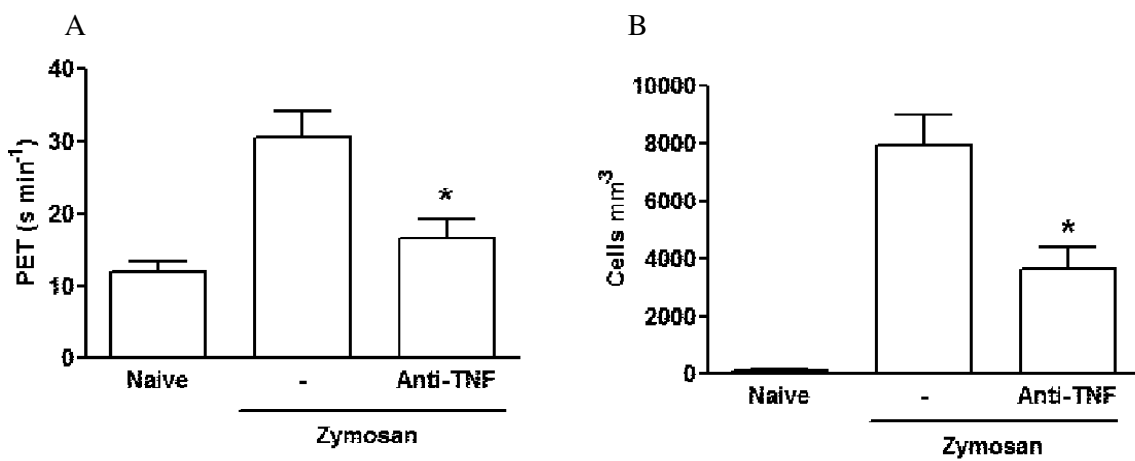


Figure Legends

Figure 1. Antinociceptive effect of tadalafil in zymosan-induced arthritis and experimental osteoarthritis – (a) Joint pain was measured hourly as the increase in the paw elevation time (PET s / 1min) over 5 h after i.art. injection of 1mg zymosan (Zy). Naïve animals received only saline. Groups received tadalafil (TD 0.02 – 0.5 ml.kg⁻¹) or saline (non-treated NT) *per os* 2 h after Zy. Results are expressed as the mean ± SEM of the maximal PET; n=6 animals for each group. *P<0.05 compared to control; #P<0.05 compared to sham. **(b)** Rats were subjected to anterior cruciate ligament transection (ACLT). Joint pain was assessed daily as the increase in the PET, using the articular incapacitation test. A sham group was subjected to the surgical procedure without ACLT and received saline by gavage. Groups received TD (0.5 mg kg⁻¹) or saline (-) *per os* daily, starting on day 4, until day 7 after ACLT; ΔPET (s / 10 min) represents the mean ± S.E.M. of the variation of the increase in PET related to baseline value, achieved between days 4 and 7 after ACLT; n = 6 animals / group; *P < 0.05 compared to control. Data analyzed using one-way ANOVA, followed by Tukey's test.

Figure 2. Effect of co-treatment with naloxone or with the cGMP inhibitor ODQ on the anti-nociceptive activity of tadalafil or the NO donor 3-morpholiniosydnonimine (SIN-1) in zymosan arthritis. Joint pain was measured hourly as the increase in the PET (s / 1 min) over 5 h after i.art. injection of 1 mg Zy or saline (-) into the rat knee joint. Naïve animals received only saline. Groups received TD (0.5 mg kg⁻¹ *per os*), saline (-) or SIN-1 (10 µg i.art.) 2 h after Zy; ODQ (4 µg) i.art. was given either isolated 2 h after Zy or prior to TD 0.5 mg.kg⁻¹ or SIN-1. Another group received 1 mg naloxone i.p. prior to TD (0.5 mg kg⁻¹). Results are expressed as the mean ± SEM of the maximal PET; n=6 animals for each group. *P<0.05 compared to control (-).

Figure 3. Effect of tadalafil in the acute cell influx in zymosan arthritis. (a) Dose-response curve of TD administration. Zy (1 mg) or saline (-) were injected i.art. and the cell influx in joint exudates was measured at 6 h. Naïve animals received only saline; **(b)** Groups received TD (0.5 mg kg⁻¹ *per os*), saline (-) or SIN-1 (10 µg i.art.) 2 h after Zy; ODQ (4 µg) i.art. was given either isolated 2h after Zy or prior to TD 0.5 mg.kg⁻¹ or SIN-1. Another group received 1 mg naloxone i.p. prior to TD (0.5 mg kg⁻¹

¹). Results are expressed as the mean \pm S.E.M. of total leukocytes (n=6 animals / group). *P<0.05 compared to control (-).

Figure 4. Effect of tadalafil on cytokines release in zymosan arthritis. Zy (1 mg) or saline (-) were injected i.art. IL-1 (a), TNF (b), and CINC-1 (c) levels were determined in joint exudates at 6 h, using ELISA. Naïve animals received saline i.art. Groups received TD (0.5 mg kg⁻¹) or saline (-) *per os* 2 h after Zy. Results are expressed as means \pm S.E.M of n = 6 animals for each group.*P<0.05 compared to control (-).

Figure 5. Effect of an anti-TNF antiserum on joint pain and cell infiltration in zymosan arthritis. – (a) Joint pain was measured hourly as the increase in the PET (s / 1 min) over 5 h after i.art. injection of 1 mg Zy, saline (-) or an anti-TNF antiserum (50 μ l) into the rat knee joint. Naïve animals received only saline; (b) cell influx was measured in joint exudates at 6 h. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. of total leukocytes (n=6 animals / group). *P<0.05 compared to control (-).

