



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

MIRLANE GUIMARÃES DE MELO CARDOSO

PACLITAXEL POTENCIA A HIPERNOCICEPÇÃO
INFLAMATÓRIA: EVIDÊNCIAS DA PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS
E DO RECEPTOR TOLL TIPO 4 (TLR-4)

FORTALEZA

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MIRLANE GUIMARÃES DE MELO CARDOSO

**PACLITAXEL POTENCIA A HIPERNOCICEPÇÃO
INFLAMATÓRIA: EVIDÊNCIAS DA PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS
E DO RECEPTOR TOLL TIPO 4 (TLR-4)**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Mariana Lima Vale.

FORTALEZA

2009

C264p Cardoso, Mirlane Guimarães de Melo
Paclitaxel potencia a hipernocicepção inflamatória: evidências da participação de citocinas e do receptor toll tipo 4 (TLR-4) / Mirlane Guimarães de Melo Cardoso. – Fortaleza, 2009.
148 f. : Il.
Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2009
1. Dor 2. Quimioterapia 3. Paclitaxel 4. Citocinas 5. Receptor 4 Toll-Like I. Ribeiro, Ronaldo de Albuquerque (orient.) II. Título

CDD: 616.0472

MIRLANE GUIMARÃES DE MELO CARDOSO

**PACLITAXEL POTENCIA A HIPERNOCICEPÇÃO
INFLAMATÓRIA: EVIDÊNCIAS DA PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS
E DO RECEPTOR TOLL TIPO 4 (TLR-4)**

Tese apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção de Grau de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em 07 de janeiro de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof^ª. Dra. Mariana Lima Vale (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- FMRP/USP

Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Costa
Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas
Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof^ª. Dra. Adriana Rolim Campos Barros
Universidade de Fortaleza- UNIFOR

Ao Stênio, co-autor dos momentos mais importante da minha vida.
Aos meus filhos Bárbara, Caio e Victória que trazem tanta luz e gosto para minha
vida, um amor especial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela companhia nesta caminhada.

Meus agradecimentos são dirigidos de maneira especial ao Prof. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro pela orientação precisa na formulação deste trabalho e pela compreensão e acolhimento em seu laboratório. Por isso, obrigado de coração.

À Prof^ª. Mariana Lima Vale pela co-orientação, com toda certeza, sem a sua participação, este trabalho não teria nem a forma nem a consistência que apresenta.

À Prof^ª. Gerly Anne e Prof. Marcellus Henrique pela disponibilidade e apoio.

Ao corpo docente do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, sempre brilhantes, como profissionais e como pessoas.

Ao Prof. Fernando Queiroz Cunha da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP pela gentileza na execução inicial das dosagens de citocinas.

Aos colegas do LAFICA, por trilharem, lado a lado, o mesmo caminho de luta e, principalmente, de vitória. A companhia de vocês foi um diferencial que me motivou.

Aos técnicos Maria Silvandira e José Ivan pela preciosa colaboração e amizade.

Aos colegas professores do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Amazonas, e muito especialmente ao Prof. Frederico Arruda, merecedor de todo o meu apreço, pela pessoa que é.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Aura Rhanes Yida pela ajuda com as questões burocráticas.

Ao André Farias estudante de iniciação científica que, na condição de auxiliar da pesquisa, tanto contribuiu.

A minha grande família- Orestes, Marina, Marly, Orestes Filho, Mirlei e Orlens- por serem meus maiores amigos e por estarem sempre perto de mim, no coração.

Finalmente, aos membros da banca examinadora por terem, neste processo, assumido a difícil tarefa de avaliar.

A FAPEAM pelo apoio financeiro.

A todos o meu profundo agradecimento.

Confúcio, um filósofo chinês que viveu no século VI a.C.

“Sobre os mestres e professores”.

Pensar corretamente. Este é o segredo.

O senhor faz isso?

Aos quinze anos comecei a aprender. Aos trinta, passei a ter certeza do que desejava. Aos quarenta, as dúvidas voltaram. Aos cinquenta, descobri que o céu tem um projeto para mim e para cada homem na face da Terra. Aos sessenta, compreendi este projeto e encontrei a tranqüilidade para segui-lo. Agora, aos setenta, posso escutar meu coração, sem que ele me faça sair do caminho.

Então o que o faz diferente dos outros homens que também aceitaram a vontade de Deus?

Eu procuro dividi-las com vocês. E quem consegue discutir uma verdade antiga com uma geração nova deve usar a sua capacidade para ensinar. Esta é a minha única qualidade: ser um bom professor.

“O que é um bom professor”?

“O que examina tudo que ensina. As idéias antigas não podem escravizar o homem, porque elas se adaptam e ganham novas formas, então, tomemos a riqueza filosófica do passado, sem esquecer os desafios que o mundo presente nos propõe”

“O que é um bom aluno”?

“Aquele que escuta o que eu digo, mas adapta os meus ensinamentos à sua vida e nunca os segue ao pé da letra. Aquele que não procura um emprego, mas um trabalho que o dignifica. Aquele que não busca ser notado, e sim fazer algo notável”

RESUMO

Paclitaxel potencia a hipernociceção inflamatória: evidências da participação de citocinas e do receptor Toll tipo 4 (TLR-4). Autora Mirlane Guimarães de Melo Cardoso. Doutorado em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará. Defesa: 7 de janeiro de 2009. Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro. Co-orientadora: Prof^a. Dra. Mariana Lima Vale.

Introdução. Paclitaxel (PCX) foi o 1º antineoplásico efetivo no tratamento de cânceres refratários a quimioterapia convencional. Clinicamente, induz artralguas e mialgias de caráter incapacitante que comprometem a qualidade de vida e limitam o tempo de tratamento antitumoral, acometendo até 57% dos doentes. Apesar destas repercussões clínicas nada foi descrito até o momento, visando elucidar o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias, na gênese da atividade hipernociceptiva do PCX, já que a droga compartilha com o LPS uma via de sinalização desencadeada por receptores Toll (TLR-4 e TLR-2) para geração de genes que codificam TNF- α . Dados da literatura sugerem que ocorra um “cross-talk” entre esses dois membros da família Toll e, que agonistas diferentes de TLR-2 e TLR-4 são capazes de induzir a ativação de NF- κ B, AP1 e MAP kinase e a geração de TNF- α , citocina chave na cascata de liberação de mediadores inflamatórios finais que atuam diretamente no nociceptor. Dados do laboratório registraram que o zymosan (ZY) intrarticular em joelhos de ratos produz uma periartrite característica da hipernociceção no teste de incapacitação articular (IA), e que PCX (8mg/kg) amplificou essa resposta quando se injetou ¼ da dose do ZY. Tal amplificação foi inibida com o pré-tratamento com inibidores de citocina e de prostanóides. **Objetivo.** Investigar a participação do TLR-4 e TNF- α na gênese do efeito potencializador do PCX na artralgia experimental induzida por ZY. **Material e Métodos.** Ratos foram pré-tratados Sc com talidomida (TLD), pentoxifilina, dexametasona, indometacina ou celecoxib e estimulados com subdose de ZY (250 μ g/animal; i-art). Após a 1ª medida do tempo de suspensão de pata (TSP) no teste de IA, os animais receberam PCX (8mg/kg; ip). Numa segunda etapa os ratos receberam durante três dias consecutivos o pré-tratamento com atorvastatina (3, 10, 30mg/kg/dia; VO). Os seguintes parâmetros foram avaliados: modulação da hipernociceção no teste de incapacitação articular, dosagem de citocinas em lavado de joelho de ratos (TNF- α , IL-1 β , IL-6, KC e CINC) e imunohistoquímica para TNF- α , IL-1 β e TLR-4 no tecido sinovial. **Resultados.** Ficou demonstrado que PCX (8mg/kg) potencializa a artralgia experimental induzida por ZY em ratos avaliada pelo aumento significativo do TSP (p<0,001) na 4ªh de artrite em relação ao controle no teste de IA. Tal efeito foi inibido de maneira significativa pelo pré-tratamento com TLD (45mg/kg) e essa inibição foi associada à redução dos níveis de TNF- α produzido pelas células do tecido sinovial no lavado articular e da marcação imunohistoquímica para TNF- α . Da mesma forma a inibição dessa resposta amplificadora do PCX foi ratificado pelo pré-tratamento com atorvastatina nas três doses utilizadas no modelo, também sendo associado à diminuição significativa dos níveis de TNF- α no lavado articular e visível redução na marcação imunohistoquímica para TNF- α , IL-1 β e TLR-4, nas três doses utilizadas. **Conclusões.** PCX potencializa a hipernociceção induzida por ZY por um mecanismo indireto sobre células residentes da membrana sinovial que liberam TNF- α provavelmente pela ativação da NF- κ B via TLR-4/MD2, pois esse efeito potencializador foi inibido pela atorvastatina, um provável antagonista de TLR-4. O TNF- α liberado age iniciando a cascata de mediadores envolvidos com a dor inflamatória, o que justifica em parte as artralguas dos pacientes em tratamento com PCX.

Palavras-chave: Paclitaxel, dor, artralguas, citocinas, TNF- α , TLR-4, talidomida, atorvastatina.

ABSTRACT

Paclitaxel enhances the inflammatory hypernociception: evidence of involvement of cytokines and Toll-like receptor 4 (TLR-4). Author Mirlane Guimarães de Melo Cardoso. Pos-Graduation in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology. Faculty of Medicine. Federal University of Ceará-Brazil. Presentation: January 7th, 2009. Advisor: Prof. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, MD, PhD.

Introduction: Paclitaxel (PCX) was the first effective antineoplastic medicine in the treatment of tumors that do not respond to conventional chemotherapy. Clinically, it induces incapacitating arthralgias and myalgias that interfere with the patient quality of life and limit the duration of the treatment. This is observed in up to 57% of the patients using the drug. Despite these clinical manifestations, nothing has been published that could explain the involvement of pro-inflammatory cytokines in the triggering of the hypernociceptive effect of PCX, even though it is known that the drug shares with LPS a signaling pathway started by Toll-like receptors (TLR-2 and TLR-4) that activates genes coding for TNF- α . The literature suggests that there is a crosstalk between these two members of the Toll family and that different agonists of TLR-2 and TLR-4 are able to induce the activation of NF- κ B, AP1 and MAP kinase in the generation of TNF- α , a key cytokines in the cascade liberating the final inflammatory mediators that act directly on the nociceptor. Data obtained in laboratory show that the injection of zymozan into rat knee-joints produces a peri-arthritis characteristic of the hypernociception seen in the knee joint incapacitation test and that PCX (8mg/kg) amplified the response when $\frac{1}{4}$ of the zymozan (ZY) doses was injected. The amplification was inhibited when animals were pre-treated with inhibitors of cytokines and prostanoids.

Objective: To study the role of TNF- α and TLR-4 on the initiation of the potentiating effect of PCX on the experimental arthralgia induced by ZY. **Material and Methods:** Rats were pre-treated Sc with thalidomide, pentoxifiline, dexametazone, indometacin and celecoxib and then stimulated with an intra-articular subdoses of ZY (250 μ g/animal). After the first measurement of the paw elevation time in the knee joint incapacitation test, the animals were treated with PCX (8mg/kg ip). On a second trial, rats were treated for three consecutive days with atorvastatin (3, 10, 30mg/kg/day; VO). The following parameters were evaluated: modulation of the effect on the knee joint incapacitation test (JIT), amount of cytokines in the rat's knee lavage (TNF- α , IL-1 β , IL-6, KC and CINC) and immunohistochemistry for TNF- α , IL-1 β and TLR-4 on synovial tissue. **Results:** It was shown that PCX (8mg/kg) potentiates the experimental arthralgia induced by ZY in the rats as evaluated by the significant increase in paw elevation time ($p < 0.001$) at the 4th h of arthritis in relations to controls. Such effect was significantly inhibited by pre-treatment with thalidomide (45mg/kg) and the inhibition was associated with a decrease in the amount of TNF- α produced by synovial tissue cells and detected in the joint lavage and in the immunohistochemistry for TNF- α . Likewise the inhibition of the amplifying response to PCX was seen with pre-treatment with atorvastatin at the three doses used in the experiment, which was also associated with a lower TNF- α in the joint lavage and perceptible decrease in the immunohistochemistry for TNF- α , IL-1 β and TLR-4. **Conclusions:** PCX potentiates the hypernociception induced by ZY through an indirect effect on synovial membrane resident cells that release TNF- α probably through activation of the NF- κ B pathway by TLR-4/MD2, since the potentiating effect was inhibited by atorvastatin, a TLR-4 antagonist. Released TNF- α act starting the cascade of mediators involved in the inflammatory pain and this partially explains the arthralgia in patients treated with PCX.

Key words: Paclitaxel, Pain, Arthralgia, Cytokines, TNF- α , TLR-4, Thalidomide, Atorvastatin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	adenosina monofosfato
AMPC	adenosina monofosfato cíclico
AP-1	proteína ativadora 1
ATP	adenosina trifosfato
ATV	atorvastatina
Bcl-2	célula B de linfoma 2
BK	bradicinina
BK ₁	receptor de bradicinina tipo B ₁
BK ₂	receptor de bradicinina tipo B ₂
BSA	albumina de soro bovino
C	grupo controle
C5a	quinto componente do sistema complemento ativado
CEL	celecoxibe
Cg	carragenina
COX	cicloxigenase
COX-1	cicloxigenase constitutiva
COX-2	cicloxigenase induzida
CXCL-8	peptídeo ativador de neutrófilos derivados de linfócitos/interleucina 8
DAB	diaminobenzidina
Db-GMPc	dibutiril guanosina monofosfato cíclico
DEXA	dexametasona
ELISA	ensaio imunoenzimático
EPM	erro padrão da média
ERK	cinase regulada por sinais extracelulares

FDA	agência reguladora de alimentos e remédios nos Estados Unidos
GABA	ácido gama-aminobutírico
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	fator estimulados de colônia de granulócitos e macrófagos
GMPC	guanosina monofosfato cíclico
H ₁	receptor da histamina tipo H ₁
H ₂	receptor da histamina tipo H ₂
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
IκB	cinase inibitória do fator de transcrição nuclear kappa B
IASP	International Association for the Study of Pain
IFN	interferon
IFN-α	interferon-alfa
IFN-γ	interferon-gama
IKK	cinase do IκB
IL	interleucina
IL-1	interleucina-1
IL-10	interleucina-10
IL-13	interleucina-13
IL-18	interleucina-18
IL-4	interleucina-4
IL-6	interleucina-6
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INDO	indometacina
IRAKs	cinases associadas ao receptor de interleucina-1
IRF	fator regulador de interferon

JNK	cinase do terminal amínico da proteína c-Jun
KC	quimiocina derivada de queratinócitos
LAM	mycobacterium da America Latina e Mediterrâneo
LBP	proteína que liga ao LPS
LDL	lipoproteína de baixa densidade
L-NAME	L-nitro arginina-metil-ester
LPS	lipopolissacarídeo
LTB ₄	leucotrieno B ₄
LTC ₄	leucotrieno C ₄
MAPK	cinase de proteínas ativadas por agentes mitogênicos
MEK	cinase de ERK
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
MIF	fator inibidor da migração de macrófagos
MKK3	cinase 3 ativadora de proteínas da família MAPK
MKK6	cinase 6 ativadora de proteínas da família MAPK
MNF	fator nociceptivo secretado por macrófagos
MyD88	fator de diferenciação mielóide 88
NEMO	modulador essencial do NF-κB
NF-κB	fator de transcrição nuclear kappa B
NMDA	N-metil D-aspartato
NO	óxido nítrico
NOS	enzima óxido nítrico sintase
NOSc	enzima óxido nítrico sintase constitutiva
NOSi	enzima óxido nítrico sintase induzida
PAF	fator ativador de plaqueta

PAMP	padrões moleculares relacionados a patógeno
PBS	Solução salina tamponada
PCX	paclitaxel
PGE ₂	prostaglandina E ₂
Pkc	proteína cinase C
PM	peso molecular
PTX	pentoxifilina
r	recombinante
Rhu	recombinante humana
RNA	ácido ribonucleico
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
RPM	rotações por minuto
RPMI	meio de cultura RPMI
RRP	receptores de reconhecimento padrão
S	salina
Sc	subcutâneo
SNC	sistema nervoso central
TGF	fator transformador de crescimento
Th2	linfócitos T auxiliar 2
TIR	domínio intracelular homólogo ao do TLR/receptor de IL-1
TIRAP	proteína adaptadora contendo um domínio TIR
TLD	talidomida
TLR	receptores tipo Toll
TLR-2	receptores Toll tipo 2
TLR-3	receptores Toll tipo 3

TLR-4	receptores Toll tipo 4
TLR-7	receptores Toll tipo 7
TLR-9	receptores Toll tipo 9
TNF	fator de necrose tumoral
TRAF6	fator 6 associado ao receptor de fator de necrose tumoral
TRAM	proteína adaptadora contendo domínio TIR relacionada ao TRIF
TRIF	proteína adaptadora contendo domínio TIR e indutora de IFN- β
TSP	tempo de suspensão de pata
UI	Unidade (s) internacional (is)
v/v	volume por volume
ZY	zymosan

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
δ	delta
γ	gama
κ	kappa
μg	micrograma(s)
μl	microlitro(s)
<	menor que
Ca^{+2}	ión de calcio
g	grama(s)
kg	quilograma(s)
l	litro(s)
m^2	metros cuadrados
m^3	metros cúbicos
mg	miligramas(s)
ml	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
nm	nanómetro(s)
Nº	número
°C	graus Celsius

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ILUSTRAÇÃO 1.1-	Estrutura química do paclitaxel.....	23
ILUSTRAÇÃO 1.2-	Mecanismo de ação antitumoral dos taxanos (paclitaxel e docetaxel).....	25
ILUSTRAÇÃO 1.3-	Possíveis ligantes para receptores Toll. TLR-2 e TLR-4.....	29
ILUSTRAÇÃO 1.4-	Relação entre receptores Toll (TLR), suas proteínas adaptadoras, as proteinocinases relacionadas a estas e os efeitos da sinalização.....	32
ILUSTRAÇÃO 1.5-	Inibição do efeito hipernociceptivo do paclitaxel sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan.....	50
ILUSTRAÇÃO 1.6-	Inibição do efeito hipernociceptivo do paclitaxel sobre a artrite experimental induzidas por zymosan.....	51
ILUSTRAÇÃO 2.1-	Desenho esquemático do teste de incapacitação articular induzida com paclitaxel e zymosan em joelho de ratos pré-tratados com talidomida, pentoxifilina, dexametasona, indometacina e celecoxibe.....	65
ILUSTRAÇÃO 2.2-	Desenho esquemático do protocolo para obtenção do lavado articular de joelho de ratos estimulados “in vivo” com paclitaxel e zymosan e pré-tratados com talidomida.....	66
ILUSTRAÇÃO 2.3-	Desenho esquemático do protocolo para obtenção de peças histológicas para realização de imunohistoquímica de tecido sinovial de joelho de ratos pré-tratados com talidomida e estimulados “in vivo” com paclitaxel e zymosan.....	68
ILUSTRAÇÃO 2.4-	Desenho esquemático do teste de contorção abdominal em camundongos estimulados por sobrenadante de cultura de macrófagos murinos (2 horas) estimulados “in vivo” com paclitaxel e zymosan.....	69
ILUSTRAÇÃO 2.5-	Desenho esquemático do protocolo para obtenção do sobrenadante de cultura de células peritoneais de camundongos tratados “in vivo” com paclitaxel e estimulados com zymosan...	70
ILUSTRAÇÃO 2.6-	Desenho esquemático do teste da placa quente em camundongos tratados com paclitaxel em esquema de dose única ou dose cumulativa.....	71

ILUSTRAÇÃO 2.7-	Desenho esquemático do teste da placa quente em ratos tratados com paclitaxel em dose única.....	72
ILUSTRAÇÃO 2.8-	Desenho esquemático do teste de incapacitação articular induzida com paclitaxel e zymosan em ratos pré-tratados com atorvastatina.....	73
ILUSTRAÇÃO 2.9-	Desenho esquemático do protocolo para obtenção de tecido sinovial de joelhos de ratos pré-tratados com atorvastatina e estimulados com paclitaxel e zymosan “in vivo” para realização do ensaio de imunohistoquímica.....	74
ILUSTRAÇÃO 2.10	Desenho esquemático do protocolo para obtenção do lavado articular de ratos pré-tratados com atorvastatina e estimulados “in vivo” com paclitaxel e zymosan.....	75

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	Teste de incapacitação articular (fotografia).....	60
FIGURA 2-	Teste de contorção abdominal (fotografia).....	61
FIGURA 3-	Efeito da administração sistêmica de talidomida, pentoxifilina e dexametasona sobre o pico da incapacitação articular induzida por zymosan em joelhos de ratos tratados com paclitaxel.....	79
FIGURA 4-	Efeito da administração sistêmica de celecoxibe e indometacina sobre o pico da incapacitação articular induzida por zymosan em joelhos de ratos tratados com paclitaxel.....	80
FIGURA 5-	Efeito do pré-tratamento com a talidomida sobre a liberação do fator de necrose tumoral (TNF) e CINC-1 na cavidade articular de joelho de ratos estimulados com zymosan e paclitaxel.....	82
FIGURA 6-	Efeito do pré-tratamento com talidomida sobre a liberação da interleucina-1beta (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6) na cavidade articular de joelho de ratos estimulados com zymosan e paclitaxel.....	83
FIGURA 7-	Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica do fator de necrose tumoral (TNF) no tecido sinovial de joelho de ratos Wistar submetidos à artrite induzida por zymosan e paclitaxel, e pré-tratados com talidomida.....	84
FIGURA 8-	Efeito do paclitaxel na liberação do fator de necrose tumoral (TNF) e KC por macrófagos peritoneais residentes de camundongos estimulados “in vivo” com zymosan e tratados com paclitaxel.....	86
FIGURA 9-	Efeito hipernociceptivo da administração de sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados “in vivo” com zymosan e paclitaxel nas contorções abdominais.....	87
FIGURA 10-	Efeito da paclitaxel sobre o tempo de reação no teste da placa quente em camundongos.....	88
FIGURA 11-	Efeito da paclitaxel sobre o tempo de reação no teste da placa quente em ratos.....	90
FIGURA 12-	Efeito da administração sistêmica da atorvastatina sobre o pico da incapacitação articular (tempo de suspensão de pata) induzida por zymosan em ratos tratados com paclitaxel.....	91

FIGURA 13-	Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica do fator de necrose tumoral (TNF) no tecido sinovial de joelho de ratos Wistar submetidos à artrite induzida por zymosan e paclitaxel e pré-tratados com atorvastatina.....	92
FIGURA 14-	Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica da interleucina-1 β (IL-1 β) no tecido sinovial de joelho de ratos Wistar submetidos à artrite induzida por zymosan e paclitaxel e pré-tratados com atorvastatina.....	94
FIGURA 15-	Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica do receptor Toll-4 (TLR-4) no tecido sinovial de joelho de ratos Wistar submetidos à artrite induzida por zymosan e paclitaxel e pré-tratados com atorvastatina.....	95
FIGURA 16-	Efeito do pré-tratamento com atorvastatina sobre a liberação do fator de necrose tumoral (TNF) na cavidade articular de joelho de ratos estimulados com zymosan e paclitaxel.....	97
FIGURA 17-	Efeito do pré-tratamento com atorvastatina sobre a liberação de interleucina 1 β (IL-1 β) na cavidade articular de joelho de ratos estimulados com zymosan e paclitaxel.....	98

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	22
1.1 Paclitaxel	23
1.1.1 Histórico.....	23
1.1.2 Mecanismo de ação antitumoral.....	25
1.1.3 Mecanismo de ação complementar.....	26
1.1.3.1 Indução de genes pró-inflamatórios e proteínas.....	26
1.1.4 Imunofarmacologia relacionada ao paclitaxel.....	27
1.1.4.1 Receptores do tipo Toll (TLR).....	28
1.1.4.2 Regulação da expressão de TLR-4.....	30
1.1.4.3 Via de sinalização paclitaxel/LPS símile.....	30
1.1.5 Farmacocinética e efeitos tóxicos do paclitaxel.....	34
1.1.5.1 Mialgias e artralguas associadas ao paclitaxel.....	35
1.2 Dor	36
1.2.1 Base neural da dor.....	37
1.2.2 Dor inflamatória.....	38
1.2.2.1 Mediadores inflamatórios.....	39
1.2.2.2 Cascata de citocinas inflamatórias.....	41
1.2.3 Papel das células residentes na dor inflamatória.....	42
1.2.4 Papel do óxido nítrico na dor inflamatória.....	43
1.3 Drogas moduladoras da produção de citocinas	44
1.3.1 Estatinas e seus efeitos antiinflamatórios.....	45
1.3.1.1 Atorvastatina.....	46
1.4 Justificativas	47
1.5 Objetivos	52
1.5.1 Objetivo geral.....	52
1.5.2 Objetivos específicos.....	52
MATERIAIS E MÉTODOS	53
2.1 Animais de experimentação	54
2.1.1 Ratos.....	54
2.1.2 Camundongos.....	54
2.2 Aparelhos e instrumentos laboratoriais	54

2.3	Drogas, soluções, citocinas e antisoros.....	55
2.3.1	Drogas.....	55
2.3.2	Soluções.....	56
2.3.3	Tampões, soluções e reagentes para ensaio de imunohistoquímica.....	57
2.3.4	Meio de Cultura.....	57
2.3.5	Citocinas e Antisoros.....	58
2.4	Testes nociceptivos.....	58
2.4.1	Teste de incapacitação articular.....	58
2.4.2	Teste de contorção abdominal.....	59
2.4.3	Teste da placa quente.....	59
2.5	Métodos utilizados na obtenção de fluidos e tecidos para análise.....	62
2.5.1	Coleta de lavado articular de joelho de ratos.....	62
2.5.2	Obtenção de sobrenadante de cultura de macrófago.....	62
2.6	Dosagem e imunohistoquímica para detecção de citocinas.....	62
2.6.1	Dosagem de citocina de lavado articular de joelho de rato e de cultura de macrófago de camundongos.....	62
2.6.2	Imunohistoquímica em tecido sinovial de joelho de rato para detecção de TNF- α , IL-1 e TLR-4.....	63
2.7	Protocolo experimental.....	64
2.7.1	Efeito do pré-tratamento com talidomida (TLD), pentoxifilina (PTX) e dexametasona (DEXA) sobre o pico da incapacitação articular induzida por paclitaxel e zymosan em joelho de rato.....	64
2.7.2	Efeito do pré-tratamento com celecoxibe (CEL) e indometacina (INDO) sobre o pico da incapacitação articular (tempo de suspensão da pata) induzida por paclitaxel e zymosan em joelho de rato.....	64
2.7.3	Efeito do paclitaxel sobre os níveis de citocinas (TNF, IL-1, IL-6 e CINC-1) presentes no lavado articular do joelho de ratos submetidos á artrite experimental por zymosan.....	66
2.7.4	Efeito do paclitaxel sobre a detecção de TNF por imunohistoquímica em tecido sinovial de joelho de ratos estimulados “in vivo” com zymosan.....	67
2.7.5	Efeito do pré-tratamento com talidomida sobre a detecção de TNF por imunohistoquímica em tecido sinovial de joelho de ratos estimulados “in vivo” com paclitaxel e zymosan.....	67
2.7.6	Efeito da administração de sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados “in vivo” com zymosan e paclitaxel nas contorções abdominais.....	69

2.7.7	Efeito do paclitaxel sobre a liberação de citocinas (TNF e KC) por macrófagos peritoneais de camundongos estimulados “in vivo” com zymosan submetidos ao teste de contorções abdominais.....	70
2.7.8	Efeito sistêmico do paclitaxel em dose única ou cumulativa no teste da placa quente em camundongos.....	71
2.7.9	Efeito sistêmico do paclitaxel em dose única no teste da placa quente em ratos.....	72
2.7.10	Efeito do pré-tratamento com atorvastatina sobre o pico da incapacitação articular (tempo de suspensão da pata) induzida por paclitaxel e zymosan em ratos.....	73
2.7.11	Efeito do pré-tratamento com atorvastatina sobre a detecção de TNF, IL-1 e TLR-4 por imunohistoquímica em tecido sinovial de joelho de ratos estimulados “in vivo” com paclitaxel e zymosan.....	74
2.7.12	Efeito do pré-tratamento com atorvastatina sobre os níveis de citocinas (TNF e IL-1) presentes no lavado articular do joelho de ratos estimulados “in vivo” com paclitaxel e zymosan.....	75
2.8	Análise estatística.....	76
	RESULTADOS.....	77
3.1	Inibição do efeito potencializador do paclitaxel na artralgia experimental induzida por zymosan em ratos, pela talidomida, pentoxifilina e dexametasona no teste de incapacitação articular.....	78
3.2	Inibição do efeito potencializador do paclitaxel na artralgia experimental induzida por zymosan em ratos pela indometacina e celecoxibe no teste de incapacitação articular.....	78
3.3	Efeito do pré-tratamento com talidomida sobre a liberação de citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF e CINC-1) para cavidade articular de joelho de ratos tratados com paclitaxel e submetidos à artrite experimental por zymosan.....	81
3.4	Efeito do pré-tratamento com talidomida sobre a produção do fator de necrose tumoral (TNF) por células da membrana sinovial de joelhos de ratos tratados com paclitaxel e submetidos à artrite experimental por zymosan, demonstrado por reação imunohistoquímica.....	81
3.5	Efeito do paclitaxel sobre a liberação de citocinas (TNF e KC) por macrófagos residentes peritoneais de camundongos estimulados “in vivo” com zymosan submetidos ao teste de contorções abdominais.....	85
3.6	Efeito da administração de sobrenadante de cultura de macrófagos murinos estimulados “in vivo” com zymosan e paclitaxel no modelo das contorções abdominais.....	85

3.7	Efeito sistêmico do paclitaxel em dose única ou cumulativa sobre o tempo de reação no teste da placa quente em camundongos.....	85
3.8	Efeito sistêmico do paclitaxel em dose única sobre o tempo de reação no teste da placa quente em ratos.....	89
3.9	Inibição do efeito potencializador do paclitaxel na artrite experimental induzida por zymosan em ratos, pela atorvastatina no modelo de incapacitação articular em ratos.	89
3.10	Efeito do pré-tratamento com atorvastatina (ATV) na produção do fator de necrose tumoral por células da membrana sinovial de joelhos de ratos tratados com paclitaxel e submetidos à artrite experimental induzida por zymosan, demonstrado por reação de imunohistoquímica.....	89
3.11	Efeito do pré-tratamento com atorvastatina (ATV) na produção de interleucina 1 β (IL-1 β) por células da membrana sinovial de joelhos de ratos tratados com paclitaxel e submetidos à artrite experimental por zymosan, demonstrado por reação de imunohistoquímica.....	93
3.12	Efeito do pré-tratamento com atorvastatina (ATV) na expressão de receptores Toll tipo 4 (TLR-4) na membrana sinovial de joelhos de ratos tratados com paclitaxel e submetidos à artrite experimental por zymosan, demonstrado por reação de imunohistoquímica.....	93
3.13	Efeito do pré-tratamento com atorvastatina sobre a liberação de citocinas (TNF) para cavidade articular de joelho de ratos tratados com paclitaxel e submetidos à artrite experimental por zymosan.....	96
3.14	Efeito do pré-tratamento com atorvastatina sobre a liberação de citocinas (IL-1) para cavidade articular de joelho de ratos tratados com paclitaxel e submetidos à artrite experimental por zymosan.....	96
4	DISCUSSÃO	99
5	CONCLUSÕES	119
6	REFERÊNCIAS	121

Introdução

1.1 PACLITAXEL

1.1.1 Histórico

O PCX (PCX) foi descoberto em 1962, pelo botânico Arthur Barclay, da casca de um raro teixo do pacífico, chamado *Taxus brevifolia*, ao trabalhar para o “US Department of Agriculture”, em concordância com o “National Cancer Institute”, na verificação da atividade anticancerígena do extrato de plantas.

Mais tarde em 1971 foi devidamente isolada do extrato da árvore do *yem* e elucidada a sua estrutura química, pelo Dr. Monre Wall do “Research Triangle Institute” e pelo Dr. Mansukh Wani e seus colaboradores (WANI, 1971). Sua estrutura diferia de todos os outros taxanos essencialmente por possuir uma cadeia lateral complexa em C13 ligada ao anel taxano, essencial para a sua ação antitumoral (Ilustração 1.1).

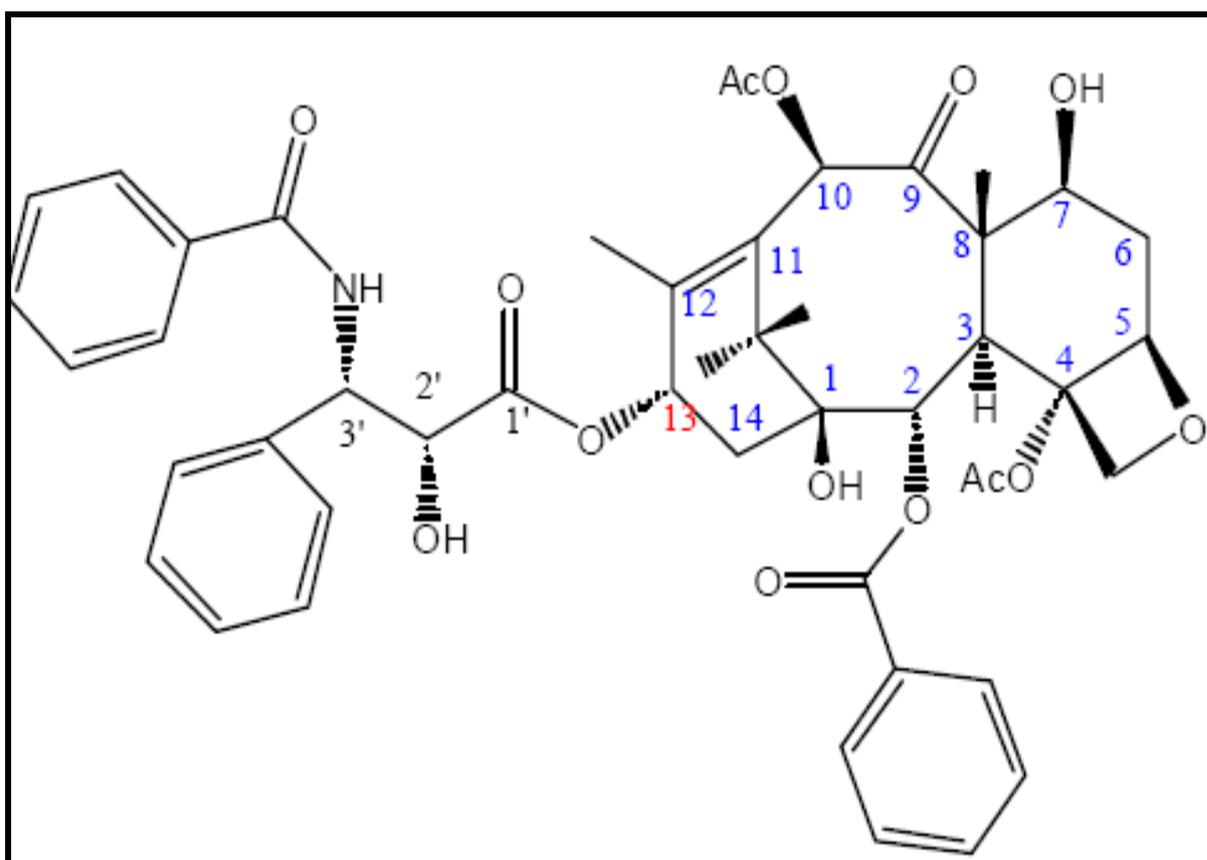


Ilustração 1.1. Estrutura química do paclitaxel

Somente em 1979 foi identificado o mecanismo de ação exclusivo do PCX como droga antitumoral, que diferente dos alcalóides da pervinca e derivados da colchicina, porque induz uma hiperpolarização dos microtúbulos ao invés de inibir a sua formação, e este achado

representou o estímulo necessário, para que se intensificassem os estudos com a droga pelo “National Cancer Institute” (SCHIFF et al., 1979; SCHIFF, 1980; ROWINSKY et al., 1990).

Apesar de se ter evidenciado uma notória atividade anticancerígena, o desenvolvimento do PCX em escala industrial foi bastante atribulado. Seu isolamento com baixo rendimento (0,014%) de uma árvore pouco abundante, tornou-se um grande problema para “Bristol-Myers Squibb Company”, que obteve o direito de exploração, e investigação cooperativa do PCX pelo “National Cancer Institute”. A combinação de duas descobertas solucionou o problema. A primeira levada a cabo por Potier e colaboradores (1988), ao constatar que as folhas do pinheiro inglês *Taxus baccata*, continham quantidades significativas de 10-desacetilbacatina III, e a segunda descoberta anunciada simultaneamente por Holton e Nicolau (1994) foi a descrição de um método de produção semi-sintético do PCX a partir de 10-desacetilbacatina III via N-acil- β -lactamas. Este fato motivou a “Bristol-Myers Squibb Company” a anunciar que não mais obteria a droga a partir de *Taxus brevifolia* (HOLTON et al., 1994; NICOLAU et al., 1994).

Outro problema encontrado estava relacionado com a fraca solubilidade do PCX em água. O mesmo foi resolvido, com a formulação da droga com etanol e óleo de rícino polietoxilado “Cremophor EL” (1:1). Esta solução evidenciou efeitos positivos e negativos em longo prazo. Os elevados níveis de “Cremophor EL” requeridos para a administração do PCX revelaram efeitos secundários indesejados como reações de hipersensibilidade. No entanto, também revelaram que as suas propriedades surfactantes atuavam inversamente à resposta de resistência contra a droga, durante o tratamento (KINGSTON, 2001).

Após estudos clínicos de fase I, II e III, a droga foi aprovada pelo “Food and Drug Administration” (FDA) dos Estados Unidos para o tratamento de câncer ovariano refratário, sendo introduzido no mercado em janeiro de 1993, com perspectivas de uma atividade promissora contra cânceres mama, pulmão, esôfago e cabeça e pescoço (ROWINSKY et al., 1993a; ROWINSKY & DONEWOHER, 1993a, 1995). Um ano depois a segunda droga deste grupo, 1,6 mais efetivo que o PCX, passou a ser comercializada com o nome docetaxel/taxotere[®] obtido pela Rhone-Poulenc Rorer (ROWINSKY, 1997).

Atualmente o PCX tornou-se a droga antineoplásica mais comercializada mundialmente, presente em mais de 60 países, tendo a “Bristol-Myers Squibb Company” faturado mais de nove bilhões de dólares com suas vendas entre 1994 a 1999, e suas vendas representam 1/3 de todo mercado farmacêutico de drogas quimioterápicas (KINGSTON, 2000; TOOGOOD, 2002).

1.1.2 Mecanismo de ação antitumoral

PCX contrariamente a outras drogas antimicrotúbulos que induzem a despolimerização dos microtúbulos, estabiliza os mesmos prevenindo a despolimerização, resultando na inibição da dinâmica normal de reorganização da rede de microtúbulos, essencial para as funções celulares e consequente parada da mitose seguida de morte celular (MANFREDI et al., 1982; WILSON et al., 1985; RAO et al., 1994) (Ilustração 1.2).

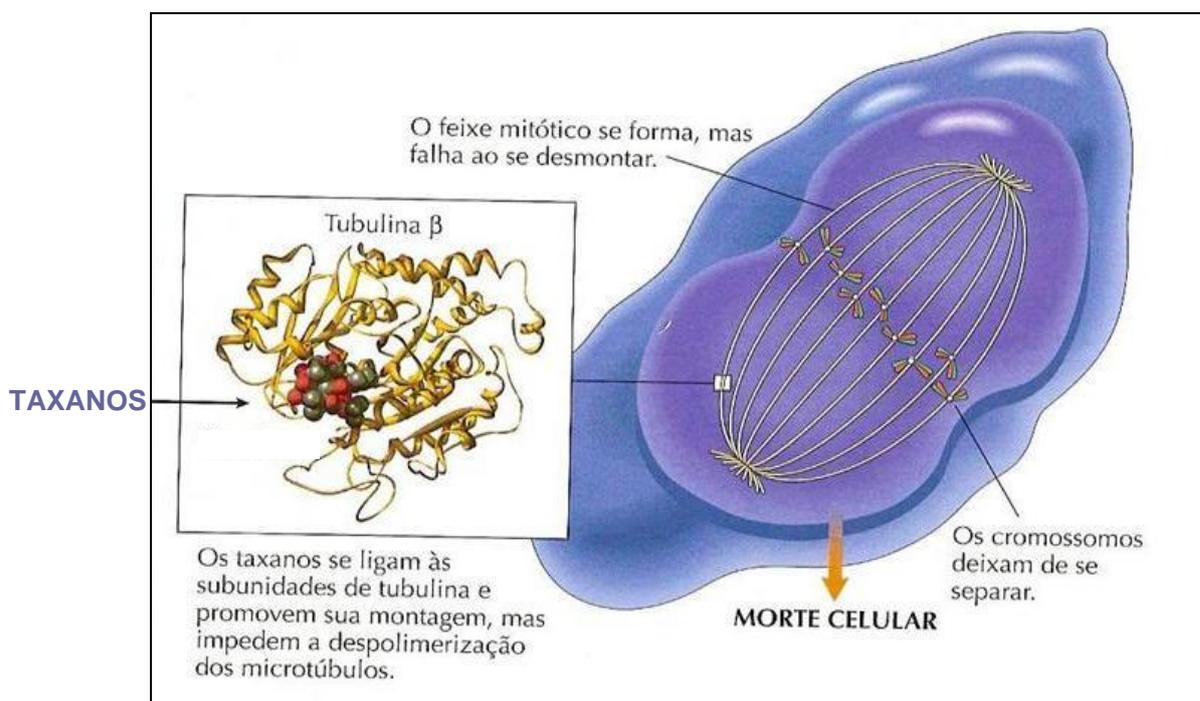


Ilustração 1.2. Mecanismo de ação antitumoral dos taxanos. Adaptado do Atlas de Farmacologia. Netter. Ed. 2006.

Os microtúbulos são constituídos por proteínas heterodiméricas compostas de duas subunidades: α e β -tubulina, presentes em todas as células eucarióticas, absolutamente necessárias ao processo de divisão celular, sendo usados pelas células para formar uma estrutura estática chamada de citoesqueleto, o qual dá forma à célula e determina a posição das organelas. As propriedades dinâmicas dos microtúbulos são usadas para transmitir sinais celulares, reorganizar organelas, proporcionar mobilidade às células, intervir no processo de secreção celular e na comunicação neuronal. Em presença do PCX, ocorre uma estabilização dos núcleos α e β tubulina pela intercalação deste fármaco a partir da sua ligação com o N-31 aminoácido terminal da subunidade β -tubulina dos microtúbulos resultando, assim, na formação de microtúbulos extremamente estáveis e disfuncionais o que compromete a

metáfase, impedindo a fase G2-M da anáfase, bloqueando a divisão celular e comprometendo funções celulares vitais (CARVALHO, 2003).

Apesar dessas alterações morfológicas bastante visíveis, o mecanismo de morte celular não é completamente conhecido. A morte celular vai depender das concentrações da droga e do tempo de exposição das células. Adicionalmente, foi descoberto que o PCX pode causar a morte celular de forma independente do processo de mitose. Pode ligar-se à proteína Bcl-2, reguladora da apoptose e induzir a sua fosforilação, e através de um processo complexo provocar a morte celular por apoptose. No entanto a tendência do PCX para se ligar a esta proteína é menor do que para se ligar a tubulina (SUBRATA et al., 1996).

1.1.3 Mecanismo complementar do PCX

Além da sua ação antimicrotúbulo o PCX, diferente dos outros taxanes induz a expressão do gene do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e de outros genes pró-inflamatórios.

1.1.3.1 Indução de genes pró-inflamatórios e proteínas

Independente dos seus efeitos sobre microtúbulos, PCX, pode induzir genes que codificam: TNF- α (DING et al., 1990; BODGAN et al., 1992; MANTHEY et al., 1992, 1993; BURKHART et al., 1994; HWANG e DING, 1995; KIRIKAE et al., 1996, 1998, 2000), interleucinas como a IL-1 β , IL-8, atualmente denominada CXCL-8, e IL-6 (BODGAN et al., 1992; MANTHEY et al., 1992; LEE et al., 1996; WHITE et al., 1998; WATSON et al., 1998; COLLINS et al., 2000); e enzimas como a óxido nítrico sintase (MANTHEY et al., 1992; KIRIKAE et al., 1996, 1998, 2000) e cicloxigenase-2 (MOOS et al., 1998; SUBBARAMAIAH et al., 2000) o que gera a produção de mediadores inflamatórios e álgicos.

Historicamente, Bodgan e Ding (1992), demonstraram através do método de “Northern blot”, que PCX (1 a 10 μ M) induziu a expressão do RNAm de TNF- α , de forma semelhante aos lipopolissacarídeos (LPS). A indução do RNAm de TNF- α com 10 μ M de PCX foi detectada com 45 minutos da estimulação, atingiu o pico com 90 minutos e ficou evidente por 8 horas após a estimulação. As baixas concentrações também induziram a expressão de RNAm de IL-1 α e β . Desta forma, comprovou-se “in vitro” que o PCX

estimula macrófagos de forma análoga ao LPS na produção de TNF- α e IL-1 (BOGDAN & DING, 1992).

Por outro lado, alguns autores estabeleceram que PCX e docetaxel induzem IL-1 β e COX-2 em monócitos humanos (WHITE et al., 1998; MOOS et al., 1999); CXCL-8 em tumores humanos (WATSON et al., 1998) e CXCL-8, ou COX-2 em linhagem de células tumorais humanas (WHITE et al., 1998). Estes resultados contrariam a observação de que a indução do gene pelo PCX ocorreria somente em macrófagos de camundongos.

PCX também pode induzir genes que codificam fatores de transcrição (MOOS et al., 1998), fato este antecipado por Hwang e Ding (1995) em um trabalho sobre o efeito do PCX em ativar o fator de transcrição NF- κ B em macrófagos murinos; fatores estimuladores de colônia e peptídeos hipotensivos (ZAKS-ZILBERMAN et al., 2001).

O contraste da potência e eficácia entre PCX e docetaxel como indutores de genes pró-inflamatórios em macrófagos murinos indicou que a estabilização de microtúbulos “per si” era insuficiente para causar indução de gene ou mimetização da sinalização de LPS pelo PCX em macrófagos murinos. Isto sugere que o mecanismo pelo qual o PCX induz a estabilização de microtúbulos não é o mesmo da indução de genes pró-inflamatórios.

Nesta década vários grupos de pesquisadores vêm estudando o envolvimento dos receptores tipo Toll (TLR) na via de sinalização que é ativada de forma semelhante pelo PCX e LPS em camundongos para geração de genes pró-inflamatórios (KAWAZAKI et al., 2000, 2001; BYRD-LEIFER et al., 2001).

1.1.4 Imunofarmacologia relacionada ao PCX

A indução de genes é relevante para a imunofarmacologia do PCX em pelo menos dois contextos: primeiro, o estudo das vias de sinalização do LPS e o segundo, os efeitos adversos observados durante a administração de taxanes para pacientes oncológicos.

O evento inicial que desencadeia a resposta imune inata frente à patógenos invasor está diretamente relacionado ao reconhecimento deste. Para que isso ocorra, os receptores de reconhecimento padrão (RRP) de células do sistema imune inato vão interagir com componentes específicos do patógenos, também conhecidos como padrões moleculares associados à patógenos (PAMP). Os PAMP não sofrem mutações, são estruturas vitais e conservadas nas membranas ou paredes celulares de patógenos. O LPS é um bom exemplo de PAMP, além de ser um dos agonistas bacterianos mais potentes já conhecidos tendo um papel dominante na sobrevivência de bactérias Gram-negativas (KNAPP et al., 2003, 2004).

Neste cenário imunológico há vários processos envolvidos, sendo o inicial relacionado à ativação de células residentes inflamatórias como macrófagos, células dendríticas, queratinócitos, linfócitos T e B e mastócitos que apresentam receptores do tipo Toll. Esses receptores quando reconhecem o seu padrão molecular associado ao PAMP desencadeia o processo de sinalização intracelular o que resultará na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias ou interferon tipo I. Dependendo da célula envolvida, por exemplo, células dendríticas, a ativação do TLR poderá induzir o aumento da expressão de molécula co-estimuladora, aumento da expressão de MHC de classe II (Major histocompatibility complex) e aumento da expressão de receptor de reconhecimento de padrões nos macrófagos envolvidos com a fagocitose. Dando continuidade ao cenário da infecção, ocorrerá a ativação dos sistemas: complemento, cininas, plasmina, e de coagulação o que resultará no aumento de moléculas de adesão no endotélio, aumento de permeabilidade vascular, a liberação de quimiocinas e de citocinas pelas células residentes inflamatórias, como resultado de uma orquestrada resposta inflamatória multimedida e inter-relacionada (HANG & DALE, 2007; KUMAGAI et al., 2008).

1.1.4.1 Receptores do tipo Toll (TLR)

São glicoproteínas transmembrana com domínio extracelular, caracterizado por repetições de leucina (N-terminal) e um domínio intracelular citoplasmático TIR homólogo ao receptor de IL-1 e IL-18 dos mamíferos. Como receptores de sinalização vão reconhecer microorganismos infectantes fazendo parte assim, da imunidade inata. Foram inicialmente descobertos na mosca (*Drosophila melanogaster*) e, no homem existe um sistema de receptores de reconhecimento de PAMP que se assemelha em estrutura e função com o sistema Toll da *Drosophila* denominado receptores semelhantes à Toll. Cada receptor da família Toll reconhece componentes específicos do patógeno (PAMP) (TAUSZIG, 2000; CARRILLO-ESPER, 2003).

Uma investigação realizada no genoma humano resultou em onze TLR, cuja função de nove deles foi definida. Tagushi em 1996 descobriu o primeiro TLR em humanos, denominado TLR-1. Medzhitov e colaboradores identificaram a segunda molécula, em 1997, atualmente denominada de TLR-4 e demonstrou que o mesmo induzia a ativação do NF- κ B e a cascata de síntese de citocinas pró-inflamatórias.

Os TLR-1, 2, 4, 5 e 6 são expressos na superfície de monócitos, neutrófilos, linfócitos T, mastócitos e células dendríticas onde são especializados no reconhecimento de

produtos bacterianos. Já os TLR-3, 7, 8 e 9 são localizados em compartimentos intracelulares no endossoma e são especializados na detecção de patógenos intracelulares como os vírus. Os PAMP que são reconhecidos pelo sistema TLR-2 e TLR-4 são: ácido lipoprotéico, produtos bacterianos, zymosan, micobactérias, espiroquetas. Sendo o TLR-4 essencial para a sinalização do LPS de bactérias Gram-negativas e do PCX (Ilustração 1.3) (AHMAD-NEJAD et al., 2002; GOLDSBY et al., 2003; TRINCHIERI & SHER, 2007).

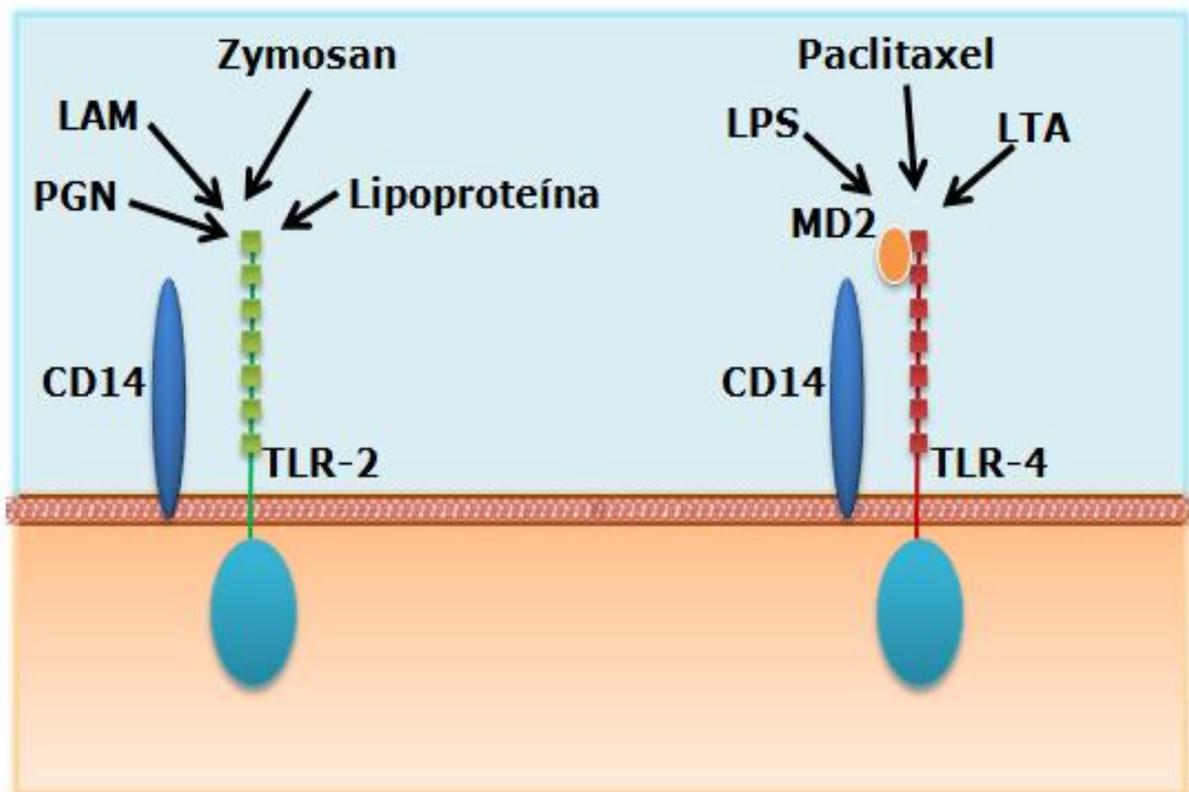


Ilustração 1.3. Possíveis ligantes para TLR. TLR-2 reconhece zymosan, peptidoglicanos (PGN), ácido lipoteicóico (LTA), e lipoproteínas de várias bactérias. TLR-4 reconhece PCX, bactéria Gram-negativa e LTA (Takeuchi et al. *International Immunopharmacology*, 625-635, 2001).

Para fazer a sinalização, eles necessitam de proteínas adaptadoras – MyD88, MAL/TIRAP, TRIF e TRAM – que atuam como homodímeros ou heterodímeros propiciando então a transdução de sinal com conseqüente ativação de proteíno-cinases e fatores de transcrição, resultando na liberação de citocinas inflamatórias e assim promovendo uma resposta pró-inflamatória (TRINCHIERI & SHER, 2007).

1.1.4.2 Regulação da expressão de TLR-4

O TLR-4 é o receptor chave para a maioria dos lipopolissacarídeos bacterianos, embora o TLR-2 também se ligue a algumas variedades dos referidos lipopolissacarídeos. A noção de associação “monogâmica” entre um TLR (Toll-interleukin-1 resistance) em particular e seu receptor microbiano, como no caso do TLR-4 e LPS, é na realidade uma simplificação. O TLR-2, por exemplo, pode ser ativado por componentes da parede de fungos (zymosan) e micobactérias, como relatado anteriormente. Dados da literatura sugerem que ocorra um “cross-talk” entre os TLR especificamente entre TLR-2 e TLR-4.

Agonistas diferentes de TLR-2 e TLR-4 são capazes de induzir a ativação de NF- κ B, AP1 e MAPK e geração de citocinas e NO (JONES et al., 2001; VOGEL et al., 2001).

Essa maior complexidade vem do fato de que os TLR parecem ser capazes de se combinarem para formar um repertório capaz de distinguir intimamente os seus ligantes (UNDERHILL et al., 2000) e há evidência de que o polimorfismo de proteínas dos TLR pode explicar em parte a grande variabilidade de respostas individuais aos estímulos infecciosos (TRINCHIERI & SHER, 2007).

Ainda no que diz respeito à sinalização, a descoberta da MD-2 também contribuiu para fundamentar a importância do TLR-4 nesse processo. A MD-2 é uma proteína que se liga ao TLR-4 no complexo de Golgi e é secretada como molécula solúvel por células que expressam MD-2 (VISINTIN et al., 2001). O seu papel parece ser de posicionar o TLR-4 corretamente na superfície celular (NAGAI et al., 2002).

Foi descrito que, a supressão de MIF, “Macrophage Inhibitory Factor”, nos macrófagos, provoca uma redução da resposta ao LPS e a bactérias Gram-negativas, demonstrada pelo decréscimo da atividade de NF- κ B e da produção de TNF- α . Estes estudos indicam que o MIF regula positivamente a expressão de TLR-4, atuando na família de fatores de transcrição essenciais para a expressão de TLR-4 (CALANDRA & ROGER, 2003).

1.1.4.3 Via de sinalização PCX-LPS símile

PCX e outros taxanes não são quimicamente relacionados ao LPS, assim é improvável que ocupem o mesmo sítio no receptor do LPS. No entanto, desde 1990, Ding e colaboradores demonstraram que PCX mimetiza os efeitos do LPS em macrófagos murinos aumentando a liberação de TNF- α e diminuindo a expressão do receptor desta citocina. Por

causa do comportamento comparável entre os dois em células animais, nas quais foi determinado geneticamente o papel de LPS, estes investigadores concluíram que LPS e PCX compartilhavam uma etapa inicial no processo transdução de sinais para geração de citocinas pró-inflamatórias (DING et al., 1990; BODGAN & DING, 1992).

Manthey e colaboradores (1993) foram os primeiros a reportarem que antagonistas do receptor de LPS inibem a expressão de genes e a fosforilação de tirosina-proteína pelo PCX. Esses pesquisadores também demonstraram que outro taxane potente estabilizador de microtúbulos, o docetaxel, não ativou as vias de sinalização LPS-dependentes ou induziu a produção de TNF- α em macrófagos murinos. A partir de 1993, vários pesquisadores vêm defendendo a hipótese de que o PCX age por meio de um mecanismo receptor-dependente (MANTHEY et al., 1992, 1993, 1994; ZAKS-ZILBERMAN et al., 2001; PERERA et al., 1997, 2001).

A interação celular com LPS envolve uma proteína plasmática ligante, “lipopolysaccharide-binding protein-LBP”, que carrega o LPS ao receptor CD14 na membrana celular que vai formar um complexo com o TLR-4. O CD14 participa claramente na indução da resposta inflamatória, tanto que a administração de anticorpo recombinante anti-CD14 atenua os sintomas clínicos e reduz consideravelmente a produção de citocinas pró inflamatórias em modelos humanos de endotoxemia (VERBON et al., 2001).

E uma vez que o LPS se liga ao complexo TLR4/MD-2, o mecanismo pelo qual o receptor é ativado não está claro. Latz e colaboradores (2002) sugerem que a agregação ao TLR-4, como resultado de ligação ao LPS, é suficiente para ativar a transdução do sinal.

O próximo passo nesse processo de sinalização (Ilustração 1.4) demanda o recrutamento de moléculas de adaptação denominadas TIR. São conhecidas quatro moléculas de adaptação do domínio TIR capazes de mediar a sinalização do TLR-4. Todas compartilham uma seqüência significativa de aminoácidos similares.

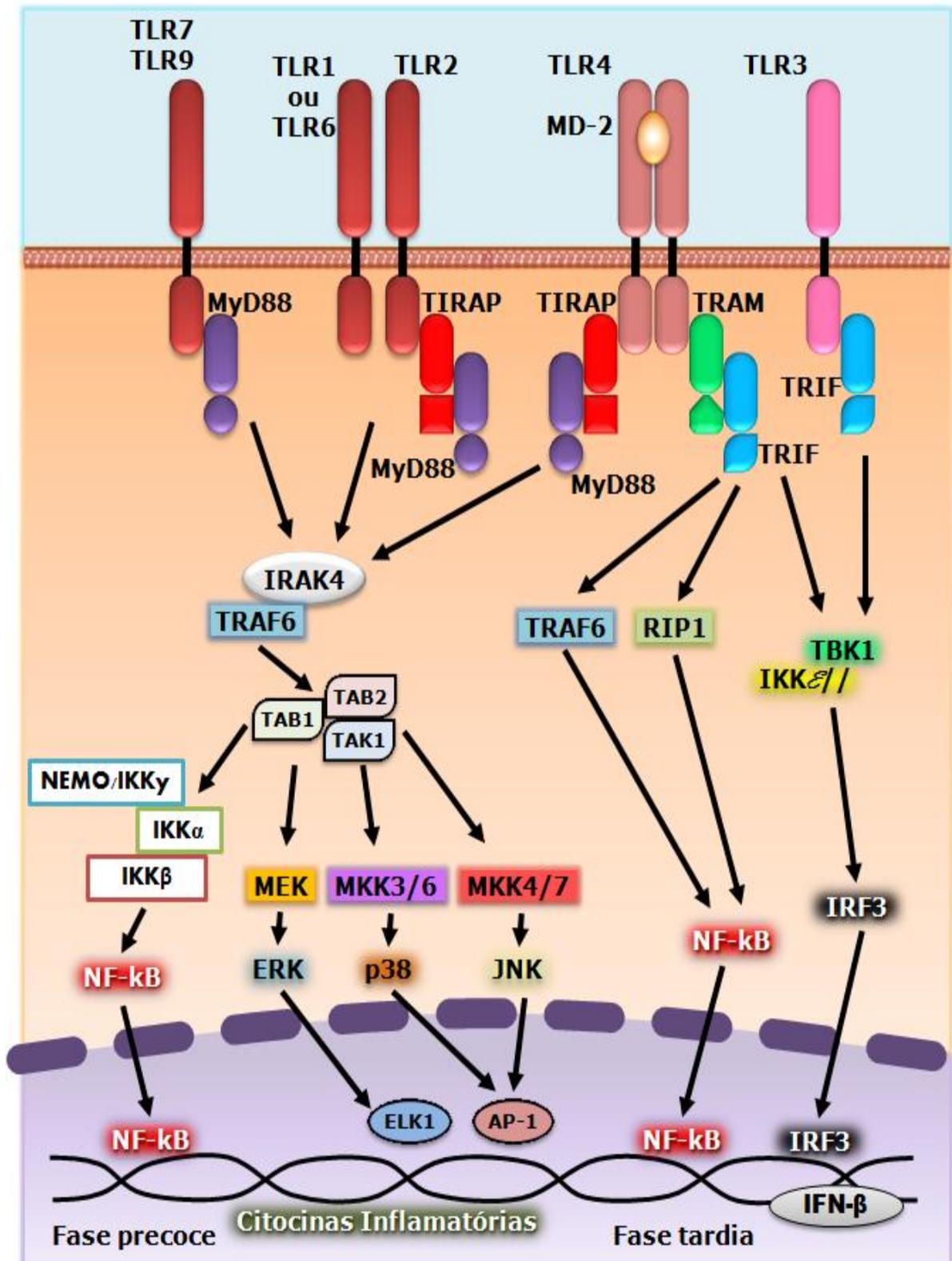


Ilustração 1.4. Relação entre “Toll-like receptors” (TLR), suas proteínas adaptadoras, as proteinocinas relacionadas a estas e os efeitos da sinalização. Retirado e adaptado de MARTINS, P.S., Tese. 144 f., 2005.

São elas: MyD88 (myeloid differentiation factor 88), a TIRAP (TIR adapter protein), a TRIF (domain-containing adapter inducing interferon- β) e a TRAM (TRIF related adapter molecule).

Na ativação do receptor, a MyD88 é recrutada via seu próprio domínio TIR que vai interagir com domínio TIR do TLR em questão, desencadeando a ativação da família de cinases conhecidas como IRAKs (IL-1 receptor-associated kinases) 1, 2 e 4. Estas cinases interagem com MyD88 por meio do domínio de morte comum a ambas as proteínas, promovendo então a ativação da TRAF6 (tumor-necrosis factor-receptor-associated factor 6). Isto vai ativar as cinases situadas na sequência do processo de sinalização, incluindo as I κ B (inhibitor of NF- κ B kinase) resultando na liberação de NF- κ B que se transloca para o núcleo e vai aumentar a expressão gênica de citocinas inflamatórias, determinando por fim, uma resposta inflamatória (TRINCHIERI & SHER, 2007; KAGAN et al., 2008).

Dependendo de qual molécula de adaptação esteja envolvida, o processo de respostas dos TLR pode ser dividido em duas categorias: de resposta precoce dependente de MyD88 e TIRAP, vitais para ativação de NF- κ B pelo TLR-2 e TLR-4, e de resposta tardia que independe de MyD88 e tem envolvimento de TRAM e TRIF, sendo este utilizado pelo TLR-3 na indução da síntese de Interferon do tipo I α e β (SATO et al., 2003).

Mais recentemente o envolvimento de MyD88 e TLR-4 na atividade LPS-símile do PCX também foram investigados por pesquisadores americanos, com macrófagos originados de camundongos C3/H, que tem mutação espontânea no TLR-4, e são hiporesponsivos tanto ao LPS quanto ao PCX ratificando assim, que ambos possuem ação pela mesma via que envolve TLR-4. Para determinar se TLR-4 e a molécula adaptadora MyD88 necessitavam interagir para que o PCX mimetize a ação do LPS, foram analisadas as respostas ao PCX, primeiramente em macrófagos de camundongos tipo selvagem que quando estimulados pelo PCX responderam fortemente através de elevada secreção de TNF- α e NO, enquanto que os macrófagos de camundongos deficiente de TLR-4 (C57BL/10ScNCr) ou MyD88 “knock-out” produziram uma quantidade mínima de TNF- α e NO. PCX induziu ativação da proteína-cinase (MAPK) associada ao microtúbulos. Nem a ativação de NF- κ B induzida pelo PCX nem a degradação de I κ B foram afetadas pela presença de inibidores de fosfatidilinositol 3-cinase. Estes resultados sugerem que PCX e LPS não dependem unicamente da via TLR-4/MyD88 para geração de mediadores inflamatórios, mas também participam da via TLR-4 dependente/MyD88 independente para ativação da cascata MAP cinase e NF- κ B (BYRD-LEIFER et al., 2001; TRINCHIERI & SHER, 2007).

Portanto, TLR-4 são os únicos receptores da família Toll que possuem as duas vias de sinalização de ativação do NF- κ B para indução da expressão de TNF- α : a via MyD88-dependente e a MyD88-independente onde a ativação é por meio da molécula adaptadora TIRAP (AKIRA & TAKEDA, 2004; BARTO & MEDZHITOV, 2004).

1.1.5 Farmacocinética e efeitos tóxicos do PCX

O PCX foi avaliado em uma série de doses, até 300mg/m² e em esquemas de infusão, variando de 3 a 24 horas e demonstrou não ser linear e saturável com aumento desproporcionalmente grande dos valores de concentração máxima, e a área sob a curva com o aumento da dose, acompanhada por uma diminuição aparente, relacionado à dose do “clearance” corpóreo total. Achados de revisão demonstram que o veículo utilizado para administração endovenosa, o “Cremophor EL” contribui para esse perfil farmacocinético não linear da droga (SPARREBOOM et al., 1996). Após administração intravenosa, mostra um declínio bifásico, desaparecendo do compartimento plasmático com meias-vidas de aproximadamente 0, 2 e 20 horas. Em pacientes tratados com doses de 135 e 175mg/m² administrados por infusões de 3 a 24 horas, a meia-vida final média variou de 13,1 a 52,7 horas e o “clearance” corpóreo total variou de 12,2 a 23,8l/hora/m³. Em média, 89% da droga encontram-se ligada às proteínas séricas. Estudo realizado com 65 pacientes com câncer de ovário mostrou que a formulação do veículo causa acúmulo em eritrócitos levando a importante redução da fração livre no compartimento celular, quando comparado com outros veículos (ROWINSKY & DONEHONER, 1995; SPARREBOMM et al., 1996).

PCX sofre intenso metabolismo hepático mediado pelo sistema do Citocromo P450 (isoenzima CYP3A e CYP2C) e menos de 10% de uma dose são excretados intactos na urina. O principal metabólito até agora identificado é o 6-OH PCX, mas múltiplos produtos adicionais são encontrados no plasma e na urina (MONSSARRAT et al., 1990, 1993; CRESTEIL et al., 1994; HARRIS et al., 1994).

O antineoplásico exerce seus efeitos tóxicos principais na medula óssea. Neutropenia geralmente ocorre 8 a 11 dias após administração de uma dose, revertendo ou recuperando-se rapidamente entre o 15° e o 21° dia. Reações de hipersensibilidade ocorrem em pacientes que receberam infusões de PCX de curta duração (1 a 6 horas), mas em grande parte evitadas pelo pré-tratamento com difenidramina, cimetidina e dexametasona. Bradicardia e taquicardia ventricular silenciosa também ocorrem, mas resolvem-se

espontaneamente durante as infusões de 3 a 24 horas. A mucosite é proeminente em esquemas de infusões prolongadas (ROWINSKY et al., 1995).

Clinicamente o PCX induz a uma neurotoxicidade dose dependente e cumulativa de incidência (22-100%) de severidade variáveis, representada por uma neuropatia sensorial periférica, caracterizada por sintomas frequentemente simétricos como formigamento, tremores e parestesia distal, que se iniciam 48 a 72 horas após o tratamento tanto com doses altas (acima de 250mg/m²) como com doses convencionais (135 a 250mg/m²) únicas ou múltiplas. Os sintomas podem desaparecer após a suspensão do uso ou evoluir para uma dor crônica tipicamente neurogênica (ROWINSKY et al., 1993b; CAVALETTI et al., 1995; GORDON et al., 1997; VAN DEN BENT et al., 1997; PACE et al., 1999; HELSING et al., 1999).

1.1.5.1 Mialgias e artralguas associadas ao paclitaxel

Sintomas tipicamente inflamatórios, as mialgias e artralguas induzidas pelo PCX, ocorrem em uma fração significativa nos pacientes, aproximadamente 24 a 48 horas depois da conclusão do tratamento, gerando importante incapacidade funcional e queda na qualidade de vida desses doentes (CONNELLY et al., 1996; ROWINSKY et al., 1995).

Ozols em 1994 publicou uma relevante revisão bibliográfica dos efeitos secundários mais freqüentes registrados nas histórias clínicas de pacientes em uso de PCX e ou carboplatina para câncer avançado de ovário, identificando 36,7% de parestesias, 16% reações de hipersensibilidade, 10,9% mialgias e 6,9% de câimbras.

A eficácia e toxicidade do PCX (200mg/m² em infusão contínua por 3 horas) associado à gencitabina como esquema de primeira linha para pacientes com adenocarcinoma de pulmão metastático foi demonstrada, obtendo-se uma taxa de resposta global de 38,2%. Os pacientes desenvolveram neuropatia periférica em 47% dos casos e artralgia e mialgias em 57% dos casos (DOUILLARD et al., 2001). Em outro estudo, 120 doentes com câncer de ovário metastático, foram tratados com 175mg/m² de PCX, administrados em infusão por 3 horas. Artralgia foi relatada em 32% de todos os doentes (5% grave) e a mialgia foi observada em 47%, sendo 6% de caráter grave (VARSEY, 2002).

Frequentemente, essas mialgias e artralguas induzidas estão mais relacionadas com PCX do que o docetaxel em dose única. Raramente esses sintomas ocorrem em esquemas de dose cumulativa e infusão contínua. Antiinflamatórios não hormonais são as drogas mais frequentemente usadas, embora se desconheça o porquê de alguns pacientes se tornarem não

responsivo a essa classe de medicamentos. Corticosteróides, glutamina, e principalmente anti-histamínico podem ser usados na prevenção e/ou tratamento das mialgias e artralguas (GARRISON et al., 2003)

A ocorrência destes eventos álgicos causa uma limitação ao tratamento quimioterápico antitumoral, não havendo na literatura explicações comprovadas sobre a causa do surgimento dessas algias tipicamente inflamatórias, ao contrário da neuropatia que já está bem estabelecida e documentada (KAPLAN et al., 1993; ROWINSKY et al., 1993; CHAUDHRY et al., 1994; HILKENS & VAN DEN BENT, 1997; PACE et al., HELSING et al., 1999; AUTHIER et al., 2000; FLATTERJA & BENNET, 2006; XIAO et al., 2007).

1.2. DOR

Uma das importantes funções do sistema nervoso é fornecer informações sobre lesões corporais em potencial, que se manifestam por meio da dor. A dor é conceituada pela “International Association for Study Pain” (IASP) como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos que sugerem tal dano” (MERSKEY & BOGDUK, 1994). A percepção corporal desta dor é denominada nocicepção, termo fisiológico usado para descrever o processo neural de codificação e processamento de estímulos nocivos (LOESER & TREEDE, 2008).

A sensação dolorosa é uma experiência subjetiva e multidimensional que envolve aspectos sensitivos, hedônicos e culturais evocando reações físicas e emocionais que podem ser atenuadas, acentuadas ou perpetuadas por variáveis sócio-culturais, orgânicas e psíquicas dos indivíduos e por condições ambientais que se apresentam. Quanto aos mecanismos neurofisiológicos a dor pode ser classificada em dor nociceptiva quando as vias nociceptivas se encontram preservadas, sendo ativadas pelos nociceptores de tecidos cutâneos (dor somática) ou profundos (dor visceral). Já a dor neuropática, é aquela em que as vias nociceptivas apresentam alterações na estrutura e ou função, resultante de lesão seletiva do trato neo-espinotalâmico (dor central) ou resultante de lesões no sistema nervoso periférico (dor periférica). Temos ainda a dor psicogênica, quando nenhum mecanismo nociceptivo ou neuropático pode ser identificado e há sintomas psicológicos suficientes para o estabelecimento de critérios psiquiátricos (TURK & RUDY, 1992; LOESER & TREEDE, 2008).

Segundo a OMS, o doente com câncer apresenta uma média de dez sintomas simultâneos. A dor, mesmo não sendo o sintoma mais frequente, é o que significativamente afeta a qualidade de vida dos doentes, principalmente na terminalidade (CARDOSO, 2008).

A dor oncológica ocorre em 29 a 57% dos pacientes, sendo frequentemente classificada como mista (nociceptiva e neuropática), portanto mais incapacitante do que as registradas em outras condições patológicas (HIRAGA, 1991; LARUE, 1995; BONICA, 2001c). Em 65-78% dos casos podem ser decorrentes de fatores relacionados ao tumor primário e suas metástases e em 19-25% estão relacionados a terapias anticâncer, como: mucosites, mialgias, artralgias, neuropatias, radiodermites (FOLEY et al., 1982; DAUT & CREELAND, 1982; TWYXCROSS, 1982; PIMENTA, 1995). No Brasil, dados do INCA-Ministério da Saúde (2001) registraram percentuais concordantes com este estudo.

Além de gerar sofrimento físico e emocional significativo, a dor tornou-se ônus para serviços médicos e para as companhias de seguro de saúde. Nos EUA, aproximadamente 89 bilhões de dólares são gastos anualmente para o tratamento compensações trabalhistas e litígios envolvendo doentes com dor crônica (RASPE et al., 1994).

1.2.1 Base neural da dor

Considerando a dor como um sistema complexo, didaticamente ele pode ser dividido nos seguintes componentes: nociceptores, tratos nociceptivos ascendentes, centros mais elevados do Sistema Nervoso Central (SNC) e sistemas analgésicos descendentes.

O termo nociceptor é empregado para descrever terminações livres de fibras aferentes primárias que respondem a estímulos dolorosos, potencialmente nocivos de uma ampla variedade de tecidos, sendo encontradas tanto em estruturas somáticas como viscerais, inclusive articulações e pele de humanos e em várias espécies de animais como rato, gato, cão e macaco (GRIGG et al., 1986; MEYER & CAMPBELL, 1989; MCMAHON & KOLTZENBURG, 1990).

A sensibilidade da terminação periférica não é fixa, e sua ativação, seja por estimulação periférica repetida ou por modificação do meio químico, aumenta a excitabilidade da terminação e diminui o limiar de iniciação de um potencial de ação no neurônio sensorial primário. Este fenômeno é denominado hiperalgesia (LINDBLON, 1986) e reflete as modificações na cinética dos canais iônicos bem como, o aumento da excitabilidade da membrana da terminação nervosa por mediadores químicos como prostaglandinas

(FERREIRA et al., 1978) e por mediadores simpaticomiméticos (NAKAMURA & FERREIRA, 1987; LEVINE, 1992).

As fibras aferentes nociceptivas primárias, normalmente fibras A-delta (A- δ) e C, transmitem sinais químicos, mecânicos e térmicos através do trato de Lissauer, fazendo sinapse com neurônios do corno dorsal da medula espinhal. As diferenças nas velocidades de condução dessas fibras explicam a típica experiência subjetiva da dor associada a estímulo nocivo: a dor inicial, rápida, bem localizada em caráter de picada é conduzida por fibras A- δ , que é seguida por uma dor difusa em caráter de queimação que é conduzida por fibras C (BONICA, 2001a).

Numerosos neurotransmissores e mediadores bioquímicos excitatórios (glutamato, substância P, fatores de crescimento) e inibitórios (opioides, ácido gama-aminobutírico/GABA e glicina) são liberados no corno dorsal provenientes de três fontes principais: fibra aferente primária, interneurônios e sistema de fibras descendente. As células do corno dorsal possuem receptores específicos para essas substâncias. Portanto, essa sinapse no corno dorsal seria o ponto no qual as informações nociceptivas são conduzidas através do trato espinotalâmico e espino-hipotalâmico aos centros superiores ou são inibidas por ativação do sistema analgésico descendentes. Este sistema modulatório parece ter três constituintes principais interrelacionados funcionalmente: O sistema opióide, noradrenérgico e serotoninérgico (BONICA, 2001b).

Os centros mais elevados do SNC estão envolvidos na discriminação da dor, incluindo componente afetivo da dor, componentes relacionados à memória e controle motor relacionado à resposta imediata aversiva manifesta aos estímulos dolorosos (BALLANTYNE et al., 2004).

1.2.2 Dor inflamatória

A inflamação ocorre como uma resposta do tecido a injúria celular e caracteriza-se por um fenômeno complexo, dinâmico e multimediado, podendo se manifestar a partir de qualquer agente lesivo seja físico, biológico ou químico. Este processo envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares, que incluem extravasamento de fluidos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise tecidual e de reparo (BECKER, 1983; PIPER, 1983).

Durante o processo inflamatório, várias etapas parecem estar associadas à ação de substâncias endógenas que modificam fisiológica e bioquimicamente a estrutura do local

afetado. Essas substâncias químicas, geralmente chamadas de mediadores, são inicialmente liberadas no local da injúria por uma reação de alarme, onde macrófagos residentes parecem ter um papel crucial (FERREIRA, 1980).

Dependendo da natureza do mediador este poderá sensibilizar o nociceptor, ativá-lo ou então ambas as coisas. Esses mediadores inflamatórios recrutam células migrantes como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, eosinófilos e linfócitos que possuem um papel amplificador no desenvolvimento da resposta inflamatória. A ação de mediadores e citocinas em receptores específicos sinalizam a resposta tecidual, os mecanismos de defesa, e produzem os sintomas da inflamação do qual a dor tem seu papel particular (FERREIRA, 1993).

1.2.2.1 Mediadores inflamatórios

Várias pesquisas destacam a existência de duas classes de mediadores hiperalgésicos (ou hipernociceptivos): os mediadores intermediários e os mediadores finais, estes últimos, atuam diretamente nos receptores de membrana dos neurônios periféricos nociceptivos, induzindo assim, os mecanismos moleculares responsáveis pela sua sensibilização. Entre os mais importantes estão os eicosanóides (prostaglandina e prostaciclina), aminas simpáticas, os leucotrienos, o PAF, a histamina e a serotonina. Entretanto, os mediadores hipernociceptivos finais não são liberados diretamente a partir do reconhecimento do estímulo inflamatório, mas sim, após a estimulação prévia dos denominados mediadores hiperalgésicos intermediários. Entre eles, os mais importantes são as citocinas/quimiocinas, de origem celular e a bradicinina e os fatores do complemento C3a e C5a, de origem plasmática (VERRI et al., 2006).

Quando liberados, os mediadores hiperalgésicos finais induzem a fenômenos moleculares que preparam o nociceptor para responder aos estímulos ativadores. Estes fenômenos começam com a ativação de uma Proteína G na membrana do nociceptor, a qual desencadeia uma ou duas cascatas enzimáticas paralelas, a da fosfocinase A/AMP cíclico e a fosfocinase C/diacilglicerol (FERREIRA & NAKAMURA, 1979).

A ativação destes sistemas conduz a um aumento de Ca^{+2} citosólico por meio do seu recrutamento das reservas ou por aumento da sua condutância, fosforilação ou modulação de seus canais pelo glutamato atuando em receptores NMDA. A ativação dos canais de glutamato situados nas terminações pré-sinápticas na medula é responsável pela duração prolongada da hiperperalgesia. Concomitantemente ao aumento do Ca^{+2} citosólico, ocorre o fechamento de canais de Na^{+} ATP dependentes, dificultando sua saída. Nestas condições há

facilitação da ativação do nociceptor e da condução pelo incremento do número de canais de Na^+ e abaixamento do limiar neuronal (Ca^{+2}), gerando assim o aparecimento de minipotenciais de ação espontâneos nas terminações pré-sinápticas, que levam a liberação contínua de glutamato. O glutamato, atuando em receptores NMDA, causa a denominada hipersensibilização retrógrada. Este fenômeno é responsável pela manutenção da hiperalgesia, pois o receptor NMDA, quando ativado, facilita a entrada de Ca^{+2} , mantendo a diminuição do limiar de ativação do nociceptor (FERREIRA & NAKAMURA, 1979).

Há evidências de que o aumento de níveis intracelulares de AMPc e de Ca^{+2} está associado à regulação positiva dos nociceptores e que a administração de prostaglandinas e aminas simpatomiméticas (dopa e noradrenalina), conhecidos estimuladores da síntese neuronal de AMPc, também são capazes de induzir hiperalgesia, que pode ser prevenida experimentalmente com pré-tratamento com antagonista de Ca^{+2} (FERREIRA & NAKAMURA, 1979; TAIWO et al., 1989; FOLLENFANT, 1990). Conseqüentemente mediadores capazes de estimular a síntese de prostaglandinas ou de aminas simpatomiméticas, como as citocinas IL-1, TNF- α e CXCL-8, são também chamados de hiperalgésicos.

Experimentalmente, foi demonstrado que TNF- α , IL-1 β e CXCL-8, quando injetadas juntas, induzem contorções abdominais em camundongos, enquanto que o pré-tratamento com anti-soros específicos bloqueia a atividade nociceptiva desses dois estímulos no modelo de contorções abdominais em camundongos (RIBEIRO et al., 2000a). Portanto, mediadores que estimulam a síntese dessas citocinas hiperalgésicas como é o caso da bradicinina, também podem ser enquadrados como hiperalgésico (STERANKA et al., 1988).

Particularmente, a bradicinina parece possuir um duplo papel na modulação da dor inflamatória. Dependendo da magnitude do estímulo ela pode não só iniciar a cascata de mediadores, mas também contribuir para a manutenção dessa cascata e da injúria através do seu receptor RBK_1 e também a bradicinina podem ativar diretamente o nociceptor via RBK_2 (DRAY & PERKINS, 1993).

A ativação da via metabólica arginina/NO/GMPc/ K^+ parece contrapor a hipersensibilização inflamatória em algumas famílias de nociceptores. Substâncias que abrem os canais de K^+ bloqueiam a hiperalgesia. A ativação deste sistema promoveria a abertura destes canais de potássio ATP-dependentes, permitindo a saída deste íon que contrabalançaria o limiar aumentado pelo acúmulo de Ca^{+2} citosólico. Esse sistema regulador negativo do nociceptor sensibilizado, está relacionado com o aumento de GMPc ou de substâncias que

estimulam a guanilato ciclase neuronal como o carbacol ou geradores de óxido nítrico (MOORE et al., 1991; DUARTE et al., 1992).

Todos esses achados sugerem que eventos bioquímicos finais responsáveis pela regulação funcional, positiva ou negativa, dos nociceptores na dor inflamatória parecem ser dependentes de um balanço nas concentrações de AMPc/GMPc, no nociceptor. A importância desse sistema regulador também foi demonstrada na dor inflamatória articular, utilizando o modelo experimental de incapacitação articular induzida por zymosan (ROCHA, 1999).

1.2.2.2 Cascata de citocinas inflamatórias

Citocinas são glicopeptídeos produzidas por estímulos indutores que possuem propriedades pleiotrópicas e regulatórias locais, regionais e sistêmicas. Uma citocina tende a ter múltiplas células alvo e funções, no entanto, diferentes citocinas podem ter ações similares. Podem induzir a própria produção e a de outras citocinas, pois modulam a expressão de seus receptores (HENDERSON & POOLE, 1994).

Quanto à dor inflamatória periférica, a primeira evidência da participação de uma citocina foi realizada em 1988 por Ferreira e colaboradores, em que mostraram a indução de hiperalgesia mecânica em ratos pela IL-1 β de maneira dependente da produção de prostanóides durante a inflamação.

Estudos posteriores demonstraram, ainda, que o efeito das citocinas ou quimiocinas poderia depender da liberação prévia de outras citocinas, conforme o estímulo da resposta inflamatória e a espécie investigada criando um panorama de sinalização celular específico para cada patologia e modelo experimental, mas com elementos comuns às respostas imunes inatas. Atualmente sabe-se que, após a indução de uma inflamação por endotoxina, o TNF- α é a primeira citocina a ser liberada, de modo que é considerada a citocina chave do processo inflamatório (CUNHA et al., 1992). Após sua liberação, o TNF- α induz a secreção de IL-1 β pelas células presentes e, conseqüentemente, de prostaglandinas, mediadores finais da hiperalgesia. Além disto, o TNF- α também estimula outra via biológica dependente de liberação de quimiocinas CINC-1/CXCL1 (em ratos) ou IL-8/CXCL-8 (em humanos), as quais são responsáveis pela ativação do componente simpático da hiperalgesia inflamatória ao promover a liberação de aminas simpáticas (CUNHA et al., 1991).

Estes achados relacionados à hierarquização têmporo-funcional da participação de mediadores intermediários e finais na dor inflamatória foram avaliados pelo nosso laboratório

utilizando outros estímulos e outros modelos experimentais como o de contorções abdominais e o de incapacitação articular em joelho de rato (RIBEIRO et al., 2000a; RIBEIRO et al., 2000b; VALE et al., 2003).

Contrariamente, algumas citocinas podem ter um efeito antiinflamatório como é o caso IL-4, IL-10 e IL-13. Estas citocinas participam de um mecanismo modulatório da resposta inflamatória, inibindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios. Dados do nosso grupo demonstram um papel antinociceptivo destas citocinas na dor inflamatória experimental (VALE et al., 2003).

1.2.3 Papel de células residentes na dor inflamatória

A importância da presença de células residentes, como macrófagos e mastócitos é crucial no local da injúria para a sinalização da resposta inflamatória e conseqüentemente dos eventos associados com a dor inflamatória, que já foi amplamente descrita por vários autores. Alguns achados nesse sentido demonstram que a intensidade de neutrófilos que migram para a cavidade peritoneal de animais estimulados com carragenina, zymosan e LPS (estímulos exógenos) ou com IL-1 e TNF- α (estímulos endógenos) é proporcional ao número de macrófagos residentes presente nessa cavidade (DE SOUZA & FERREIRA, 1985; CUNHA & FERREIRA, 1986; FACCIOLLI et al., 1990).

Os macrófagos, células residentes secretoras nos tecidos, são hábeis em reconhecer por meio dos receptores tipo Toll, o não próprio e com isso promover a sinalização do processo inflamatório, pela liberação de mediadores como prostaglandinas ou pela liberação de citocinas (FERREIRA, 1980). Seus produtos, ao todo, mais de cem descritos, incluem enzimas, inibidores enzimáticos, proteínas do sistema complemento, proteínas regulatórias tipo IL-1, CXCL-8, IL-6, TGF- β , além dos derivados do ácido araquidônico (TAKAEMURA & WERB, 1984; NATHAN, 1987; ADAMS & HAMILTON, 1989). A maioria dessas moléculas é importante na reação inflamatória, sendo que, a secreção de muitas delas depende do estado metabólico do macrófago o que por sua vez depende da interação do mesmo com seu micro ambiente (NATHAN, 1987).

O nosso laboratório tem demonstrado, nos últimos anos, a importância de macrófagos residentes na nocicepção induzida por estímulos como ácido acético e zymosan no modelo de contorções abdominais. Alguns resultados demonstram que a depleção de células residentes da cavidade peritoneal, por lavagem prévia, diminui significativamente a atividade nociceptiva do ácido acético e do zymosan, mas não a do iloprost (análogo estável

da PGI₂). Por outro lado quando se aumentou a população de macrófagos, através do pré-tratamento dos animais com tioglicolato, observou-se também o aumento no número de contorções induzidas por esses estímulos (THOMAZZI, 1996; RIBEIRO et al., 2000a).

Os mastócitos são uma parte constitutiva do eixo neuroimune e já foi mostrado, pela microscopia eletrônica, que essas células estão intimamente associadas a fibras nervosas sensitivas contendo neuropeptídeos como substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (STEAD et al., 1989), peptídeos conhecidos por estarem envolvido na fisiopatologia da dor (MAYER & GEBHART, 1994) e também por induzir a secreção de mediadores por mastócitos humanos (LOWMAN et al., 1998).

Diante de um estímulo inflamatório, mastócitos que também expressam na sua membrana receptores do tipo Toll, liberam mediadores pré-formados e estocados em grânulos, como: histamina, serotonina, bradicinina e TNF- α na presença do estímulo, que ativam diretamente e indiretamente os aferentes primários sensitivos induzindo a um estado de hiperalgesia em humanos e hipernocicepção em animais (LEVINE et al., 1992). Outros são sintetizados a partir do metabolismo de lipídeos da membrana (prostaglandina, leucotrienos e fator de ativação de plaquetas) que são liberados em poucos minutos e finalmente, são capazes de produzir citocinas dentre elas: IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, CXCL-8 e TNF- α . Além disso, são capazes de liberar óxido nítrico (MANNAIONI et al., 1991; BISSONNETTE et al., 1991; SALVEMINI et al., 1990; MASINI et al., 1991).

Nesse sentido, dados do nosso laboratório demonstram que mastócitos residentes da cavidade peritoneal parecem importantes no desenvolvimento da resposta dolorosa do ácido acético e zymosan. A depleção de mastócitos peritoneais de camundongos pelo pré-tratamento com o composto 48/80 diminuiu significativamente a atividade nociceptiva do ácido acético e do zymosan no modelo de contorções abdominais (RIBEIRO et al., 2000a).

1.2.4 Papel do óxido nítrico (NO) na dor inflamatória

No que diz respeito ao papel do óxido nítrico (NO) nos processos periféricos da dor ainda há muita controvérsia, uma vez que alguns autores relatam papel pró-nociceptivo (MELLER, 1994), enquanto outros autores descrevem ação antinociceptiva (MASHIMO et al., 1995; SOUZA & PRADO, 2001).

Foi demonstrado que o efeito antinociceptivo de drogas colinérgicas envolve a ativação da via L-argenina: NO/GMPc no modelo de hiperalgesia inflamatória em pata de rato. Neste estudo observou-se o bloqueio da atividade analgésica de acetilcolina por L-

NMMA, inibidor da síntese de NO ou azul de metileno, inibidor da guanilato ciclase solúvel, e potenciação com MY 5445, inibidor da fosfodiesterase do GMPc (DUARTE et al., 1992).

Por outro lado Moore e colaboradores (1991) demonstraram que L-NAME, inibidor da síntese de óxido nítrico, induz antinocicepção nos modelos de contorção abdominal por ácido acético, teste da placa quente, e teste da formalina. Outros autores obtiveram efeitos similares onde L-NAME provocou analgesia no modelo de nocicepção induzida por capsaicina (SAKURADA et al., 1996).

Por fim também está descrito que a administração de L-NAME e L-NMMA resultou em reversão da hiperalgisia induzida por bradicinina em pata de ratos (NAKAMURA et al., 1996).

Dados do nosso laboratório apontam para um efeito hiperalgésico do NO no modelo de incapacitação articular induzida por zymosan (ROCHA et al., 1999). Estes dados apontam para a participação do NO na mediação dos fenômenos da dor inflamatória. No entanto as controvérsias sobre o efeito analgésico ou indutor de NO ainda carecem de investigação. Dependendo do modelo experimental e a intensidade do estímulo o óxido nítrico pode ser analgésico ou pode induzir a dor.

1.3. DROGAS MODULADORAS DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS HIPERALGÉSICAS

Como já foi dito, vem se tornando cada vez mais evidente a participação de citocinas na modulação da dor inflamatória tanto aguda quanto crônica. Foi visto que nesse processo multimediado há a participação de citocinas modulando positivamente ou negativamente o processo doloroso. Muitos estudos agora estão voltados para o controle da dor sob a ótica das citocinas e vem se pesquisando drogas que inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias como os inibidores de fosfodiesterases, talidomida e análogos, clorpromazina, corticóides, bioefetores dentre outros.

Atualmente um grupo de drogas chamadas em seu conjunto de estatinas, utilizadas na prevenção de doenças coronarianas por inibirem o processo inflamatório nos vasos, vem sendo testada também em diferentes modelos de doenças inflamatórias, como por exemplo, modelos de artrite reumatóide (AR).

1.3.1 Estatinas e seus efeitos antiinflamatórios

Os inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG CoA Redutase), também chamados estatinas ou vastatinas, constituem uma notável classe de medicamentos redutores de colesterol e têm sido associados com redução da incidência de morte, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (SHEPHERD et al., 1995; DOWNS et al., 1998; SIMES et al., 2002; TOPOL, 2004).

As estatinas são substâncias originárias de culturas de fungos, sendo a primeira substância dessa família isolada em 1976, de uma cultura de *Penicillium citrinum* sendo chamada compactina. Atualmente as principais estatinas utilizadas na prática clínica são as: sinvastatina, atorvastatina, lovastatina e rosuvastatina. Existem várias diferenças entre elas em sua potência redutora de colesterol, meia vida plasmática, interação com outros fármacos, ocorrência de efeitos colaterais e na capacidade de redução de eventos cardiovasculares (FONSECA, 2005).

Sua ação é proveniente da inibição da HMG-CoA redutase que catalisa a conversão da HMG-CoA em ácido mevalônico, etapa limitante na biossíntese do colesterol. Esta inibição reduz a secreção de lipoproteínas contendo apolipoproteína B (apo-B) e aumenta a síntese do receptor de LDL diminuindo os seus níveis plasmáticos.

Vários estudos (VALGHAN et al., 1996; ROSENSON, 1999; KOH, 2000) demonstram que as estatinas podem reduzir o risco cardiovascular por outros mecanismos, além dos efeitos na redução do colesterol, pois estes fármacos possuem efeitos pleiotrópicos, dentre tais, imunomodulatórias (McCAREY et al., 2005; BARSANTE et al., 2005), aumento da expressão da sintase de óxido nítrico endotelial (MASSY et al., 1996; WAGNER et al., 2000) e ação antiinflamatória, demonstrada pela redução da Proteína C-Reativa (PCR), de moléculas de adesão e pela inibição da proliferação de células do músculo liso na placa aterosclerótica. Além disso, foi observado que elas diminuem a síntese de metaloproteinases e de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, TNF- α e a IL-1 β , na parede dos vasos, bem como inibem a expressão da COX-2 estimulada por citocinas (FERRO et al., 2000).

O tratamento com os inibidores de HMG-CoA redutase causa uma redução dos valores de PCR (de 30 a 89%), correlacionada com uma menor taxa de eventos cardiovasculares (ROZENDO et al., 2007).

1.3.1.1 Atorvastatina (ATV)

Atualmente, as estatinas sintéticas são as drogas mais prescritas no mundo, sendo que 200 milhões de pessoas apresentam critério para tratamento e somente 25 milhões usam estatinas, estando à atorvastatina ocupando o primeiro lugar nas prescrições (YOUSSEF et al., 2002; TOPOL, 2004).

Embora as estatinas sejam utilizadas primariamente para redução dos níveis de colesterol, vários estudos clínicos têm apontado que, mesmo sem diminuir os níveis deste, as estatinas reduzem os riscos de aterosclerose. Em vista disso, foi sugerido que seu efeito benéfico seria dependente de uma ação sobre fatores não-lipídicos (VALGHAN et al., 1996; ROSENSON, 1999; KOH, 2000).

Vários trabalhos vêm demonstrando que variantes genéticas de TLR-4 estão correlacionadas a uma imunidade inata deficiente e progressão de aterosclerose coronariana (AMEZIANE et al., 2003; KOLEK et al., 2004). Boekholdt e colaboradores (2003) demonstraram adicionalmente, que a variante TLR-4 Asp299Gly modificou a eficácia das estatinas na prevenção dos eventos cardiovasculares e que tais variantes apresentaram efeitos benéficos superiores ao tratamento com estatinas.

Methe e colaboradores (2005) demonstraram a influência direta da atorvastatina na expressão e sinalização de TLR-4. A atorvastatina reduziu de maneira dose-dependente a expressão “in vitro” e “in vivo” em monócitos humanos de TLR-4/CD14, causando um “downregulation” na ativação de IRAK-1 cinase e conseqüente redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias. A mesma influência da atorvastatina foi demonstrada em monócitos humanos estimulados por LPS, ratificando assim a importância da via compartilhada do LPS e paclitaxel na indução de genes pró-inflamatórios. A pré-incubação com ácido mevalônico reverteu completamente o efeito inibitório mediado pela atorvastatina. Com base nessas evidências a efetividade desta classe de drogas passou a ser testada também em diferentes modelos experimentais de doenças inflamatórias, como por exemplo, modelos de artrite reumatóide. Foi verificado um efeito benéfico nos modelos de artrite induzida por Adjuvante Completo de Freud em ratos e induzida por colágeno em camundongos (AKTAS et al., 2003; LEUNG et al., 2003; BARSANTE et al., 2005).

Na perspectiva clínica, McCarey e colaboradores (2004) publicaram o primeiro estudo clínico do efeito da atorvastatina, realizado em 116 pacientes artríticos. Os pacientes tratados com atorvastatina apresentavam uma diminuição nos marcadores inflamatórios bem como diminuição na inflamação articular. Outro fato extremamente importante e digno de

nota é o efeito que a atorvastatina teve sobre os fatores de risco vasculares, os quais se apresentam aumentados em pacientes acometidos por doenças inflamatórias crônicas. Portanto, atualmente considera-se que as estatinas apresentam um efeito benéfico bifásico no tratamento da Artrite Reumatóide, atuando tanto sobre os parâmetros inflamatórios quanto modificando os riscos de ocorrência de eventos vasculares.

Recentemente, um grupo de pesquisadores passou a estudar o efeito anti-hipernociceptivo da atorvastatina em modelos experimentais der dor. Os pesquisadores avaliaram o efeito da atorvastatina na hipernocicepção mecânica inflamatória induzida por LPS e albumina bovina metilada intraplantar e demonstram que o efeito antinociceptivo da ATV deve-se a inibição da produção de IL-1 β e PGE2, bem como a ativação da via L-arginina/cNOS/NO, atuando assim, tanto na prevenção quanto antagonizando diretamente a sensibilização do nociceptor. Para avaliar o mecanismo pelo qual ATV induz anti-hipernocicepção, foi avaliada o efeito desta sobre a hipernocicepção induzida pela cascata de mediadores inflamatórios liberados pelo LPS. A ATV inibiu significativamente a hipernocicepção mecânica induzida por bradicinina, TNF- α , IL-1 β , KC e PGE2. O pré-tratamento com L-NAME ou L-NMMA, mas não 1400W, inibidor seletivo do óxido nítrico sintase induzível, ou animais deficientes para iNOS, reverteram o efeito anti-hipernociceptivo da ATV em camundongos estimulados com PGE2 ou LPS. Adicionalmente ATV reduziu a liberação de IL-1 β e PGE2 (50% e 85%, respectivamente) no tecido subcutâneo plantar dos animais injetados com LPS. Os autores também demonstraram que o efeito anti-hipernociceptivo da ATV é independente da redução da síntese colesterol ou de intermediários isoprenóides (SANTODOMINGO-GAZÓN et al., 2006).

1.4. JUSTIFICATIVAS

Historicamente, o PCX foi considerado o mais promissor antineoplásico pela sua elevada taxa de resposta terapêutica contra uma variedade de cânceres refratários a quimioterapia convencional. Mas como todo antineoplásico, possui atividade biológica antiproliferativa, que envolve baixa seletividade e alta citotoxicidade, resultando em síndromes álgicas. Estudo multicêntrico revelou que 92,5% dos doentes com dor oncológica tinham uma ou mais dores associadas, sendo 20,8% (CARACENI et al., 1999) em decorrência do tratamento antineoplásico e seus eventos adversos. Recentemente, um estudo registrou o aumento desta incidência para 48%, revelando uma grande desconexão entre a ciência e a prática clínica relacionada ao tratamento da dor oncológica (JANJAN & CLEELAND, 2008).

A artralgia e mialgias descritas por pacientes em uso de PCX têm sido denominada na literatura como “síndrome de dor aguda associada ao PCX”, sendo provavelmente resultante da sensibilização dos nociceptores (LOPRINZI et al., 2007). Estes sintomas iniciam-se, em média, um a dois dias após o término da administração e duram quatro a seis dias em cada ciclo do tratamento. A dor é localizada no dorso, costelas, coxas, joelhos e pés, sendo descrita, como uma dor profunda em peso, pulsante, pontada, muitas vezes de caráter incapacitante que comprometem a qualidade de vida e limitam o tempo de tratamento antitumoral, chegando a acometer até 57% dos pacientes oncológicos em tratamento com este antineoplásico (CONNELLY et al., 1996; ROWINSKY & DONEHOWER, 1995; DOUILLARD et al., 2001; VARSEY, 2002).

Antiinflamatórios não hormonais, corticosteróides, glutamina, anticonvulsivantes e anti-histamínicos podem ser usados na tentativa de prevenção e/ou tratamento das mialgias e artralgias. Entretanto, os pacientes na sua maioria respondem parcialmente ou se tornam não responsivos a essas classes de medicamentos, principalmente quando usados como terapia analgésica única (GARRISON et al., 2003).

Apesar do impacto destas manifestações clínicas que constituem um fator importante de sofrimento relacionado à doença, mesmo quando comparado a expectativa de morte para estes doentes, nada foi descrito até o momento, visando elucidar o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias, na gênese da atividade hipernociceptiva do PCX. É sabido, que a droga compartilha com o LPS uma via de sinalização intracelular na geração de genes que codificam TNF- α , interleucinas, NOSi e COX-2 (KAWAZAKI et al., 2000, 2001; BYRD-LEIFER et al., 2001). Esta sinalização é desencadeada quando TLR-4 e TLR-2 reconhecem o LPS ou PCX e zymosan respectivamente, como seu PAMP. Dados da literatura sugerem que ocorra um “cross-talk” entre esses dois membros da família Toll e, que agonistas diferentes de TLR-2 e TLR-4 são capazes de induzir a ativação de NF- κ B, AP1 e MAPK e a geração de citocinas pró-inflamatórias com o TNF- α (JONES et al., 2001; VOGEL et al., 2001; BO ZHONG et al., 2006), que atualmente, é considerada a citocina chave para liberação de mediadores inflamatórios finais que atuam diretamente no nociceptor.

É válido ressaltar que tal estudo é inédito, e faz-se necessário para auxiliar na identificação dos fatores de risco e na determinação de terapias preventivas. Durante nosso mestrado esse efeito amplificador do PCX foi avaliado por meio de modulação farmacológica com inibidores da síntese de TNF- α , inibidores da COX, bloqueador simpático e um

corticosteróide nos modelos de contorção abdominal e incapacitação articular, tendo como estímulo padrão o zymosan (Ilustrações 1.5 e 1.6).

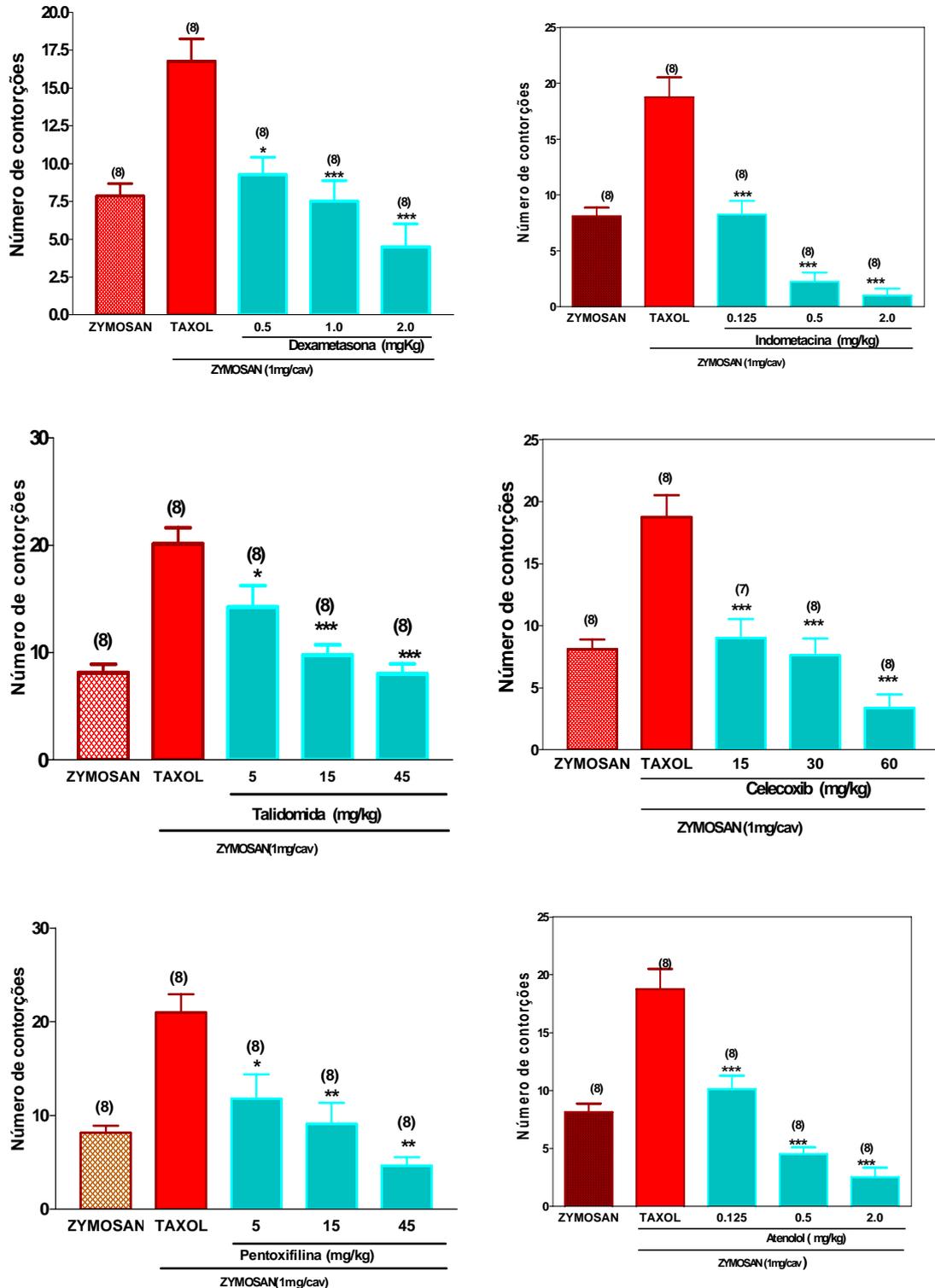


Ilustração 1.5. Inibição do efeito hipernociceptivo do paclitaxel sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan de forma significativa e dose-dependente pelo pré-tratamento dos animais com dexametasona, talidomida, pentoxifilina, indometacina, celecoxib e atenolol. Figura retirada de Cardoso, MGM. Dissertação de Mestrado. 112p (2003)

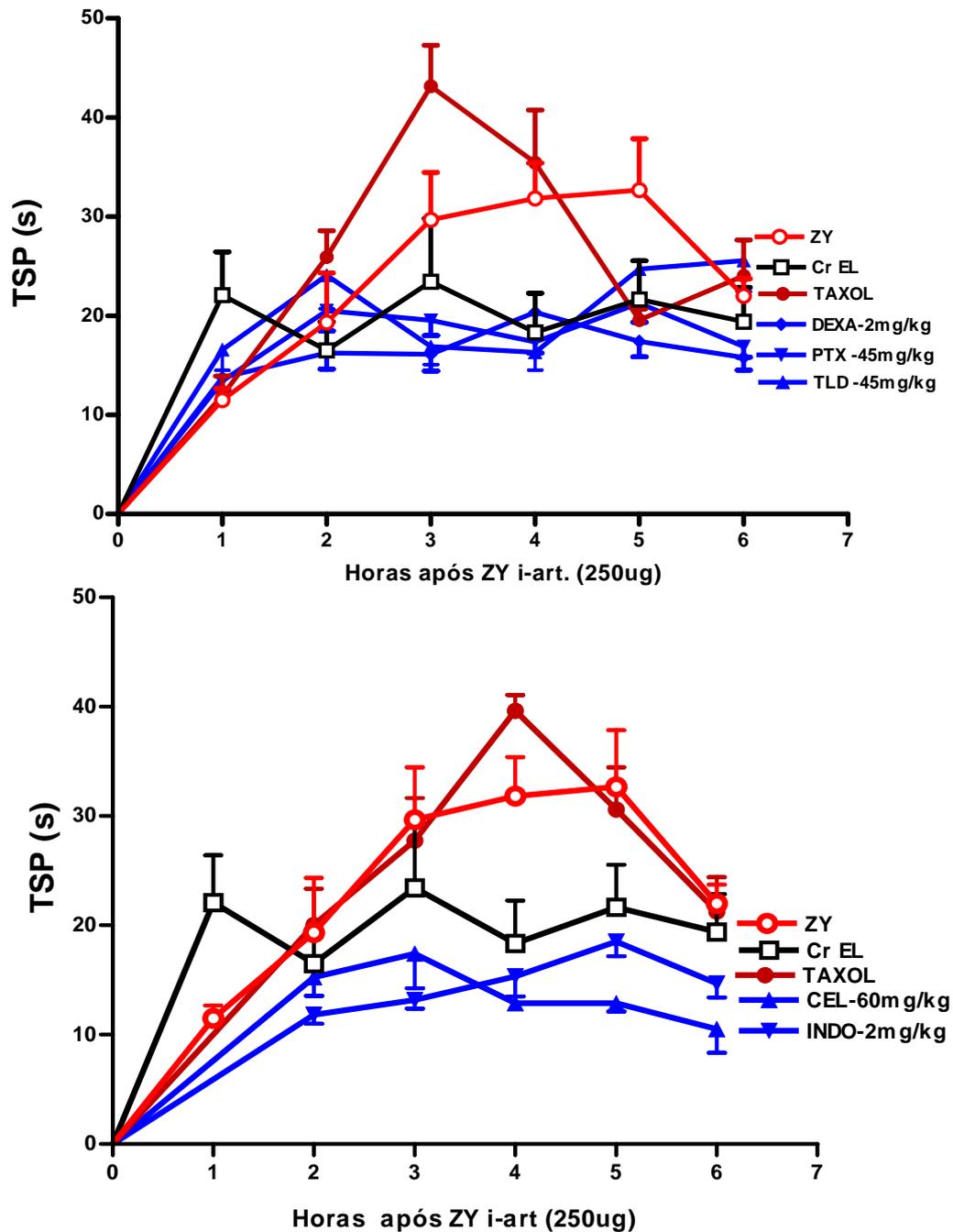


Ilustração 1.6. Inibição do efeito hipernociceptivo do paclitaxel sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan de forma significativa pelo pré-tratamento dos animais com dexametasona, talidomida e pentoxifilina. Figura retirada de Cardoso, MGM. Dissertação de Mestrado. 112p (2003).

Nossos resultados iniciais sugeriram que o PCX deveria estar causando uma amplificação da hipernocicepção por: (A) induzir a síntese de citocinas hiperalgésicas, provavelmente o TNF- α , visto que TLD, PTX e DEXA inibiram de forma significativa o efeito; (B) induzir a geração de prostanóides visto que INDO, CEL e DEXA também inibiram, (C) por estar induzindo a geração de aminas simpatomimética, visto que ATL também exerceu efeito inibitório sobre a atividade de PCX (CARDOSO, 2003).

1.5. OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi investigar a participação do fator de necrose tumoral (TNF- α) e dos receptores Toll tipo 4 (TLR-4) e na gênese do efeito potencializador do PCX na artralgia experimental induzida por zymosan avaliado por meio do teste de incapacitação articular.

1.5.2 Objetivos específicos

- Avaliar o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias no efeito potencializador do PCX por meio da dosagem de citocinas, da detecção por imunohistoquímica e do pré-tratamento com inibidores da sua síntese e liberação.

- Avaliar o papel de células residentes na produção dos mediadores inflamatórios envolvidos no efeito potencializador do PCX sobre a atividade hipernociceptiva induzida por zymosan.

- Avaliar a participação dos receptores Toll tipo 4 (TLR-4) na gênese do efeito potencializador do PCX sobre a incapacitação articular induzida por zymosan em ratos.

- Avaliar o efeito modulador da atorvastatina e seu provável mecanismo sobre a resposta potencializadora do PCX na incapacitação articular induzida por zymosan em ratos.

Materiais e Métodos

2.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Os experimentos realizados seguiram o Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório estipulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), que segue as normas da “National Research Council, USA, Portuguese Edition” (1996).

2.1.1 Ratos

Foram utilizados ratos Wistar (*Ratus norvegicus*), machos, pesando entre 170 e 200g, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici – Universidade Federal do Ceará e Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia dessa mesma universidade e do Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram mantidos em caixas de plástico com livre acesso a ração e água e foram mantidos nas mesmas condições ambientais durante os experimentos. Após o término dos experimentos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical ou na câmara de éter.

2.1.2 Camundongos

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos, pesando entre 25 e 30g, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici – Universidade Federal do Ceará e Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia dessa mesma universidade e do Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram mantidos em caixas de plástico com livre acesso a ração e água e foram mantidos nas mesmas condições ambientais durante os experimentos. Após o término dos experimentos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical ou na câmara de éter.

2.2 APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS

Durante o decorrer dos experimentos foram utilizados diversos aparelhos e instrumentos nomeados a seguir:

- Aparelho para medir a incapacitação articular.
- Aparelho utilizado no teste da placa quente.

- Aparelho de ultracentrifugação (Amicon Corporation)
- Autoclave (FABE)
- Balança para pesagem de animais, mod. ID-1500 (FILIZOLA)
- Balança analítica mod. AL200 e Ohaus, mod. AS260D (MARTE)
- Béqueres (SIMAX)
- Bastão de vidro.
- Câmara de Neubauer 0,100/0,0025mm².
- Capela de fluxo laminar, vertical (Mod. VLFS-12, Veco do Brasil Ind. Com. Equip. Ltda., Campinas, SP, Brasil).
- Centrifuga Eppendorf (Mod. 5804R).
- Cronômetro.
- Estufa de CO₂ para cultura (Nuair TS Autoflow).
- Funis de vidro grandes.
- Forno microondas.
- Material cirúrgico (tesouras delicadas, pinça anatômica e dente de rato).
- Membranas de ultrafiltração diaflo RYM-10 (Amicon Corporation).
- Microscópio óptico binocular (NIKON).
- Microscópio invertido (NIKON).
- Micropipetas automáticas (GILSON).
- Micrótomo.
- Ponteiras para pipetas automáticas de 20, 200µl e 1ml (SIGMA).
- Seringas descartáveis de 1, 3, 5, 10ml.
- Sonicador (Sonics & Materials Inc. Danbury, Connecticut, USA).
- Tubos Eppendorf de 1,5ml (GIBCO).
- Tubos de ensaio de vidro (PIREX).
- Tubos plásticos de 15ml (FALCON).
- Lâminas para microscopia “probe on plus” (FISCHER).

2.3 DROGAS, SOLUÇÕES, CITOCINAS E ANTICORPOS

2.3.1 Drogas

- Acetado de Dexametasona – Decadron (Merck, Sharp and Dohme-MSD, USA), frasco ampola de 2,5ml/10mg – diluída em salina.

- Álcool a 70%.
- Álcool absoluto.
- Atorvastatina cálcica (Lipitor[®]: comprimido 10mg, Pfizer, Brasil).
- Celecoxibe (Celebra[®]: cápsulas de 100mg, Searle, São Paulo, Brasil).
- Entelan.
- Éter Etilico (Synth).
- Heparina (Laboratório Cristália, Brasil).
- Hidrato de Cloral (Reagen, Brasil).
- Indometacina (Merck, Sharp and Dohme-MSD, USA) – dissolvida em solução de bicarbonato de sódio a 5%.
- Paclitaxel (Taxol[®]) da “Bristol-Myers-Squibb”, Paris, França (Frasco com 30mg/5ml).
- Pentoxifilina (Trental[®]: ampolas de 100mg/5ml, Hoechst, São Paulo, Brasil).
- Peróxido de hidrogênio (Smith).
- Reagentes do kit ABC para imunohistoquímica (Santa Cruz Biotechnology).
- Talidomida (comprimido de 100mg, CEME, Brasil).
- Veículo: Cremophor EL da Sigma, L’Isle-d’Abeau, France. Etanol absoluto da Merck, Darmstadt, Germany.
- Xilol (Reagen)
- Zymosan (obtido de *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma Chemical Co., St Louis, USA), dissolvido em salina.

2.3.2 Soluções

- Solução de bicarbonato de sódio:
Bicarbonato de sódio (Merck, Sharp and Dohme-MSD, USA) utilizado a 5% (p/v) dissolvido em água destilada.
- Solução Salina 0,9% estéril (Endogen).
- Solução de H₂SO₄ a 1M.
- Albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem (Sigma).
- Solução de Turk:

Violeta de genciana (Reagen).....	2ml
Água destilada.....	1000ml
- PBS pH 7,4.
- Peróxido de Hidrogênio 3%.

2.3.3 Tampões, soluções e reagentes utilizados para o ensaio de imunohistoquímica

- Tampão Citrato 0,1M pH 6,0:

Citrato de sódio monohidratado.....	21g
H ₂ O destilada.....	1L

A solução mãe (1M) foi diluída 10 vezes (concentração final 0,1M).

- Solução PBS-BSA 5%:

PBS (pH 7,3).....	10ml
Albumina Bovina.....	0,5mg

- Complexo ABC Kit (Santa Cruz Biotechnology):

Reagente A (avidina DH).....	10µl
Reagente B (peroxidase biotinizada H)	10µl
PBS.....	1,6ml

- Solução peróxido de hidrogênio 3%.

- Solução DAB/peróxido (Dako):

H ₂ O destilada.....	2,5ml
H ₂ O ₂	50µl
Tris HCl pH7,0.....	50µl
DAB	50µl

2.3.4 Meio de cultura

- RPMI simples:

Meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA; lote H0763).....	10,4g
Hepes (Sigma Chemical Co., USA).....	2,38g
Bicarbonato de sódio (Merck, Sharp and Dohme-MSD, USA).....	2,20g
Água deionizada Milli-Q autoclavada.....	1L

- RPMI completo:

Soro fetal bovino.....	10ml
Gentamicina (Gentamicin sulfate solution; Sigma G-1522).....	500µl
Penicilina-Estreptomicina (Sigma P-3539).....	500µl
Meio RPMI simples q.s.p.....	100ml

O meio de cultura foi filtrado em filtro Durapore (0,22µmGV) com membranas estéreis (Millipore) de modo que após preparado o meio estava asséptico e apirogênico.

2.3.5 Citocinas e anticorpos

- Fator de Necrose Tumoral (TNF) 40.000 UI 1mg/ampola (National Institute for Biological Standards and Control/NIBSC, England).
- Interleucina 1 beta (IL-1 β) 100.000 UI 1mg/ampola (National Institute for Biological Standards and Control/NIBSC, England).
- Anticorpo primário policlonal de carneiro anti-TNF- α de rato (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
- Anticorpo primário policlonal de coelho anti-IL-1 β de rato (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
- Anticorpo primário policlonal de carneiro anti-TLR-4 de rato (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
- Anticorpo secundário biotilado anti-IgG de carneiro (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
- Anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)

2.4 TESTES NOCICEPTIVOS

2.4.1 Teste de incapacitação articular

O modelo foi descrito anteriormente por Tonussi e Ferreira (1992), posteriormente modificado (VIANA et al., 1998; ROCHA et al., 1999) e adaptado para o nosso laboratório. Ratos Wistar machos, pesando entre 170 a 200g receberam a injeção intrarticular, no joelho posterior direito, de uma subdose de zymosan (250 μ g/50 μ l) e foram postos para deambular forçadamente em um carrossel de piso metálico (cilindro de alumínio, 30cm de diâmetro x 50cm de largura, coberto por uma tela de alumínio nas mesmas proporções), giratório, com capacidade para 3 animais. A velocidade utilizada foi de 3 RPM. As patas traseiras foram calçadas com sapatilhas metálicas, onde a sapatilha da pata direita é conectada à porta de dados de um microcomputador (Figura 2A). Ao tocar com a sapatilha no piso metálico fecha-se um circuito e ao final de 1 min. o computador registra o tempo de suspensão da pata (TSP), isto é, o tempo que o animal permaneceu com a pata levantada sem encostá-la ao piso (Figura 2B). O TSP é medido antes da injeção do estímulo (tempo zero) e de hora em hora até a 4ª hora. Dessa forma, um aumento do TSP indica nocicepção (incapacitação articular), isto é, a

incapacidade do animal deambular normalmente sobre o carrossel. Vale ressaltar, que antes da realização dos ensaios os animais foram treinados, permitindo-se um período de deambulação e adaptação ao ambiente.

2.4.2 Teste de contorção abdominal induzido por ácido acético ou zymosan

O modelo utilizado foi descrito anteriormente por Collier e colaboradores (1968). Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 25 e 30g. O estímulo utilizado foi o zymosan (1mg/animal; 250µl) que foi injetado por via ip e a intensidade de nocicepção foi quantificada pelo número total de contorções abdominais ocorridas nos primeiros 30 min. após administração do estímulo (Figura 1A). Uma contorção foi identificada como a extensão das patas traseiras acompanhada por contração do abdômen (Figura 1B).

2.4.3 Teste da placa quente

O modelo utilizado foi de Eddy e Leibach (1953) com pequenas modificações. Os animais foram postos em uma placa quente mantida a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ e foram retirados quando observada a reação de saltar ou lambear as patas traseiras. Foram feitas duas triagens separadas por um intervalo de 30 min., onde a primeira familiarizou o animal com o teste e serviu como uma pré-seleção. A segunda serviu como o registro do tempo zero (tempo medido antes da administração das substâncias a serem testadas). Além do tempo zero os animais foram testados com 2 horas e a cada dia até o 4º dia após a administração das drogas. Quarenta segundos foi considerado o tempo máximo de reação para prevenir danos nas patas dos camundongos e cento e dez segundos para reação dos ratos com objetivo de prevenir danos nas patas dos animais.

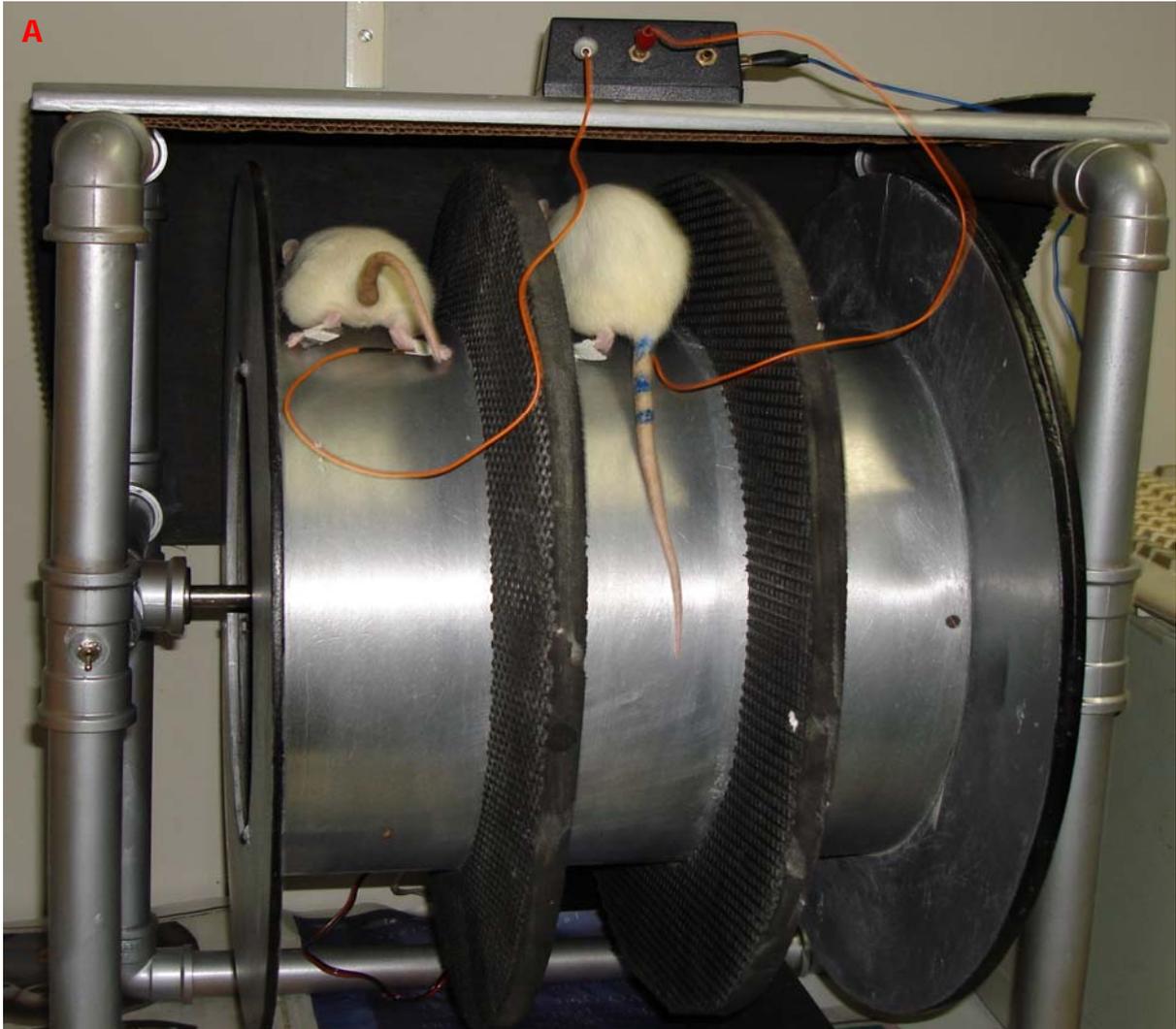


Figura 1. Fotografia representativa do Teste de incapacitação articular (A). Animal incapacitado (B).

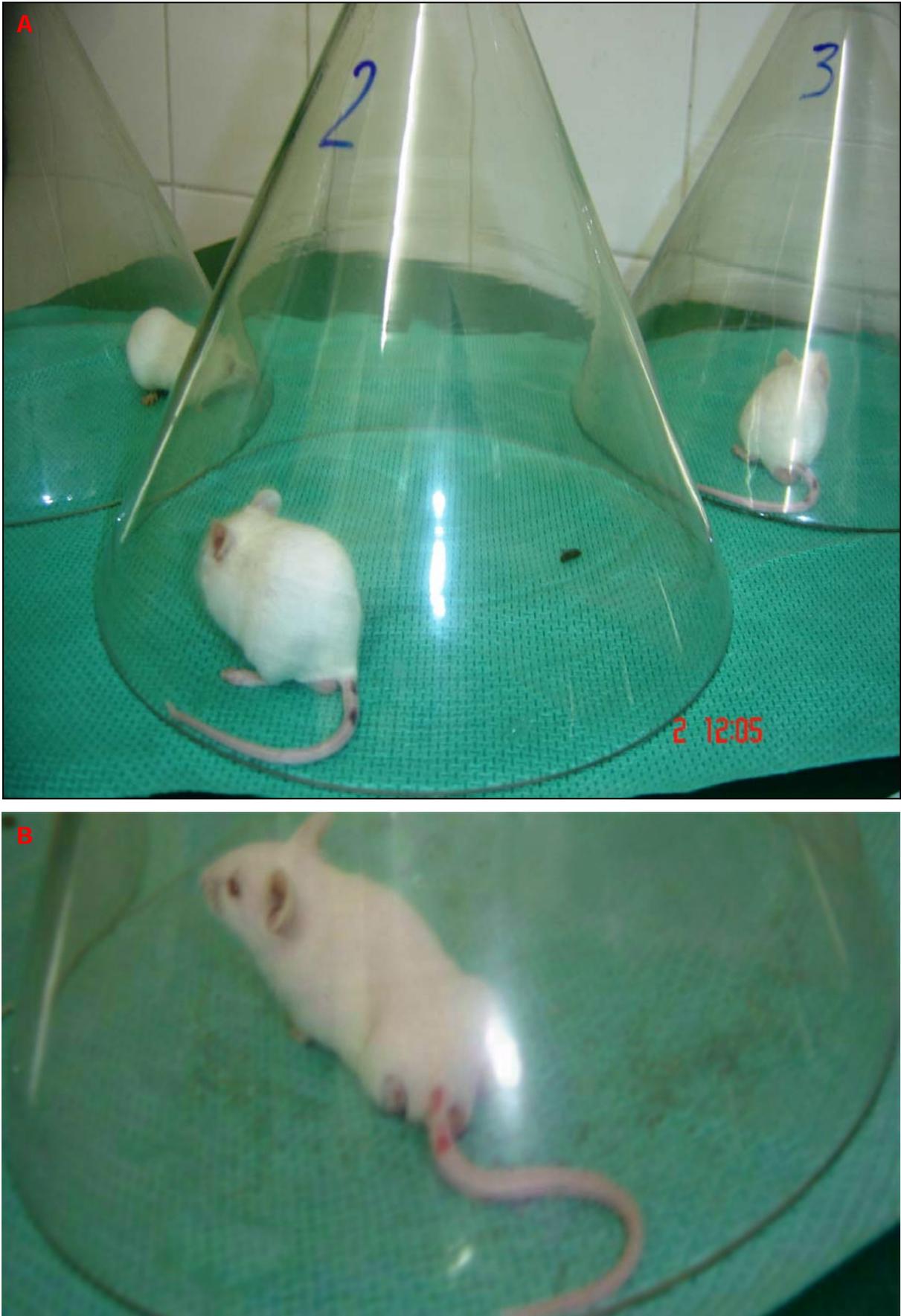


Figura 2. Fotografia representativa do Teste de contorção abdominal (A). Animal no momento de uma contração abdominal (B).

2.5 MÉTODOS UTILIZADOS NA OBTENÇÃO DE FLUIDOS E TECIDOS PARA ANÁLISE

2.5.1 Coleta do lavado articular de joelho de rato

Os animais receberam a injeção intrarticular de zymosan (250µg/50µl/animal) no joelho posterior direito, após 3 horas foram anestesiados com éter e sacrificados por decaptação seguida de exsanguinação. A pele e os ligamentos articulares do joelho injetado foram removidos e procederam-se duas lavagens da cavidade articular pela injeção de 200µl de salina heparinizada (40 UI/ml) através da membrana sinovial recolhendo-se o exsudato articular. As alíquotas foram colocadas em tubos ependorfs e centrifugadas. O sobrenadante foi estocado a -70°C para posterior análise.

2.5.2 Obtenção do sobrenadante de cultura de macrófagos

Os macrófagos foram estimulados “in vivo”. Para isso, em camundongos foram injetados por via ip salina ou zymosan (1mg/animal) e após 15 minutos foram sacrificados em câmara de éter. A cavidade peritoneal foi lavada com 2ml de meio de cultura RPMI completo em ambiente asséptico (Fluxo laminar). Colheu-se o exsudado e este foi colocado em uma placa de cultura (1 poço por animal). Foram encubadas por 12 horas em estufa de CO₂ a 37°C, numa atmosfera de 5%. Após a adesão dos macrófagos os sobrenadantes foram colhidos e estocados a -70°C para posterior análise. Todo o procedimento foi cuidadosamente elaborado de forma apirogênica. Após o período de incubação foi verificada a possibilidade de contaminação por bactérias, sendo esta descartada.

2.6. DOSAGEM E IMUNOHISTOQUÍMICA PARA A DETECÇÃO DE CITOCINAS

2.6.1 Dosagem de citocinas em sobrenadante de lavado articular de joelho de rato e de cultura de macrófagos de camundongos.

O sobrenadante estocado foi descongelado para a quantificação de citocinas como TNF, IL-1β, IL-6, CINC-1 e KC. O material foi dosado pelo protocolo de ELISA descrito a seguir:

- Incubação com 2µg/ml de anticorpo (anticorpo de captura) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8,2) – 100µl/poço (placa de 96 poços) por 16-24h a 4°C.
- Lavagem da placa (3x) com PBS-tween 20, 0,1% v/v.
- Bloqueio com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100µl/poço por 2h à temperatura ambiente. Seguida da lavagem da placa (3x).
- Incubação com a curva padrão das citocinas diluídas em tampão de lavagem e das amostras a serem dosadas (100µl/poço por 16-24h a 4°C). Seguida da lavagem da placa (3x).
- Incubação com anticorpo biotilado diluído a 1:1000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro normal de carneiro por 1h à temperatura ambiente. Seguida da lavagem da placa (3x).
- Incubação com avidina-peroxidase (Dako) diluída 1:5000 em tampão de lavagem, 100µl/poço por 15 min. à temperatura ambiente. Seguida da lavagem da placa (3x).
- Incubação com diidrocloreto de o-fenilenodiamina (OPD) em tampão substrato, 100µl/poço, cobrir a placa e deixar no escuro por 5-20 min. à temperatura ambiente.
- A reação foi parada com 150µl/poço de H₂SO₄ 1M.
- A leitura foi feita em espectrofotômetro a 490nm.
- Os resultados são expressos em µg/ml como a curva padrão.

2.6.2 Imunohistoquímica em tecido sinovial de joelho de rato para a detecção de TNF, IL-1, TLR-4

As peças histológicas foram desparafinizadas e em seguida hidratadas. O ensaio imunohistoquímico foi realizado seguindo o protocolo a seguir:

- Após a hidratação as peças foram imersas em tampão citrato 0,1M (pH 6,0) e aquecidas a ~100°C durante 15 min.
- Resfriamento em temperatura ambiente durante 20 min.
- Lavagem em PBS (5 min.)
- Bloqueio da peroxidase endógena com solução peróxido de hidrogênio 3% durante 15 min.
- Lavagem com PBS.
- Diluição do anticorpo primário em PBS-BSA 5% (vide reagentes e soluções)
- Incubação com anticorpo primário específico anti-TNF, anti-IL-1 ou anti-TLR-4 de rato (Santa Cruz Biotechnology), overnight.
- Lavagem com PBS.
- Diluição do anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho ou carneiro.

- Incubação com anticorpo secundário (30 min.).
- Preparo do complexo ABC (vide reagentes e soluções).
- Lavagem das peças em PBS.
- Incubação com o complexo ABC.
- Lavagem com PBS.
- Incubação com DAB/peróxido (2 min.).
- Lavagem com H₂O destilada.
- Contra-coloração com hematoxilina de Harry's.
- Desidratação e montagem das lâminas.

2.7 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

2.7.1 Efeito do pré-tratamento com talidomida (TLD), pentoxifilina (PTX) e dexametasona (DEXA) sobre o pico da incapacitação articular (tempo de suspensão da pata) induzida por paclitaxel e zymosan em joelho de rato

TLD (45mg/kg), PTX (45mg/kg) ou DEXA (2mg/kg) foram injetadas nos animal por via subcutânea associado à injeção intrarticular de zymosan (250µg/animal; 50µl). Após 1 hora os ratos foram tratados por via ip com salina (controle), Cremophor EL (v/v) ou PCX (8mg/kg). O tempo de suspensão da pata foi medido durante 60 segundos de hora em hora até a 4ª hora após a injeção do ZY (Ilustração 2.1).

2.7.2 Efeito do pré-tratamento com celecoxibe (CEL) e indometacina (INDO) sobre o pico da incapacitação articular (tempo de suspensão da pata) induzida por paclitaxel e zymosan em joelho de rato

INDO (2mg/kg) e CEL (60mg/kg) injetadas nos animal por via subcutânea associado à injeção intrarticular de ZY (250µg/animal; 50µl). Após 1 hora os ratos foram tratados por via ip com salina (controle), Cremophor EL (v/v) ou PCX (8mg/kg) O tempo de suspensão da pata foi medido durante 60 segundos de hora em hora até a 4ª hora após a injeção do estímulo (Ilustração 2.1).

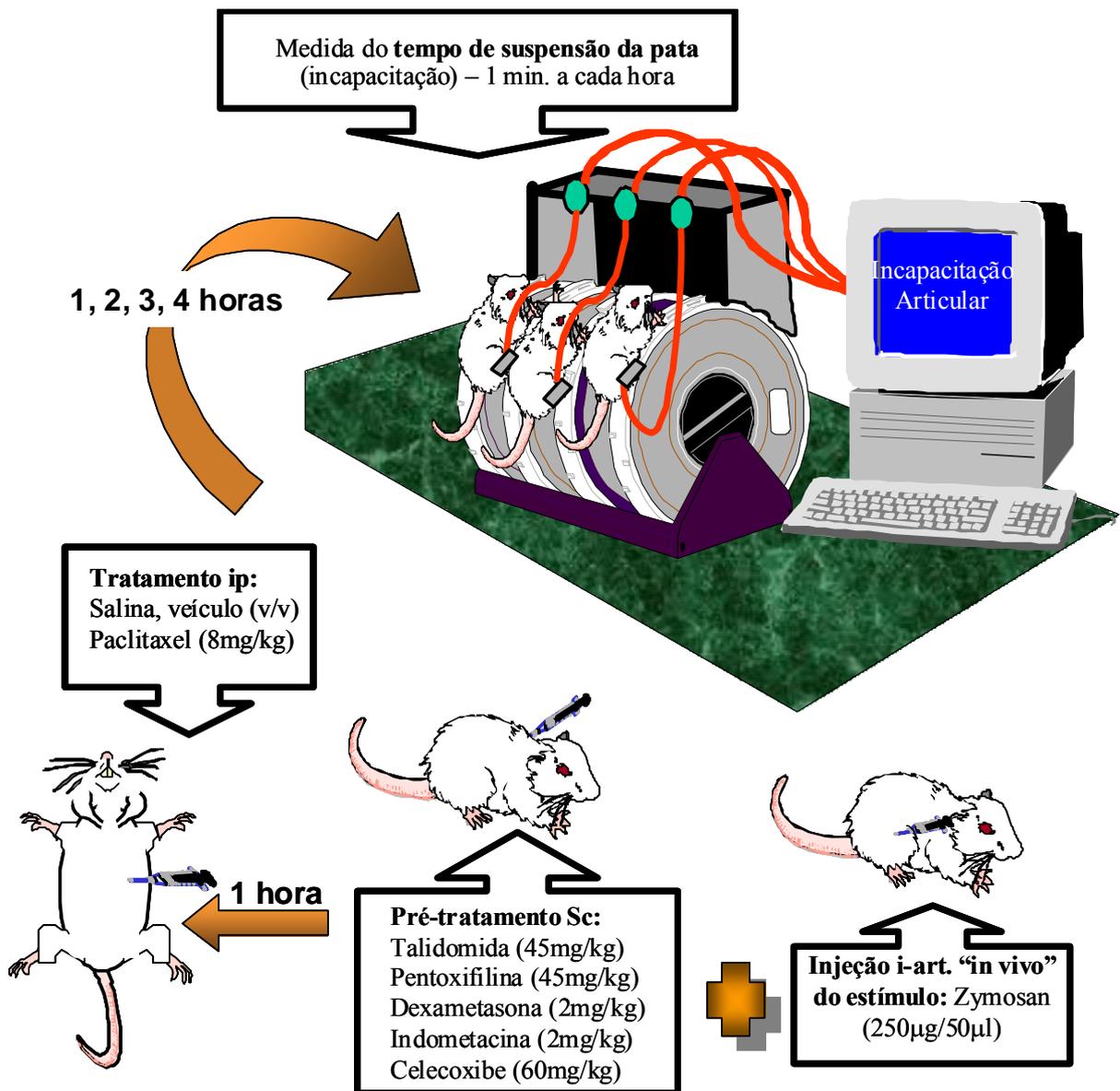


Ilustração 2.1. Desenho esquemático do teste de incapacitação articular induzida por paclitaxel e zymosan em joelhos de ratos pré-tratados com talidomida, pentoxifilina, dexametasona, indometacina e celecoxibe.

2.7.3 Efeito do paclitaxel sobre os níveis de citocinas (TNF, IL-1, IL-6 e CINC-1) presentes no lavado articular do joelho de ratos submetidos á artrite experimental por zymosan

PCX (8mg/kg), salina (controle) ou Cremophor EL (v/v) foram injetados por via intraperitoneal 1 hora depois do zymosan (250 μ g/kg) administrado intrarticular no joelho dos ratos. A lavagem da cavidade articular para a coleta do exsudato foi feita 3 horas após a injeção do zymosan. O exsudato foi centrifugado e o sobrenadante estocado para posterior dosagem de citocinas pelo protocolo descrito anteriormente (Ilustração 2.2).

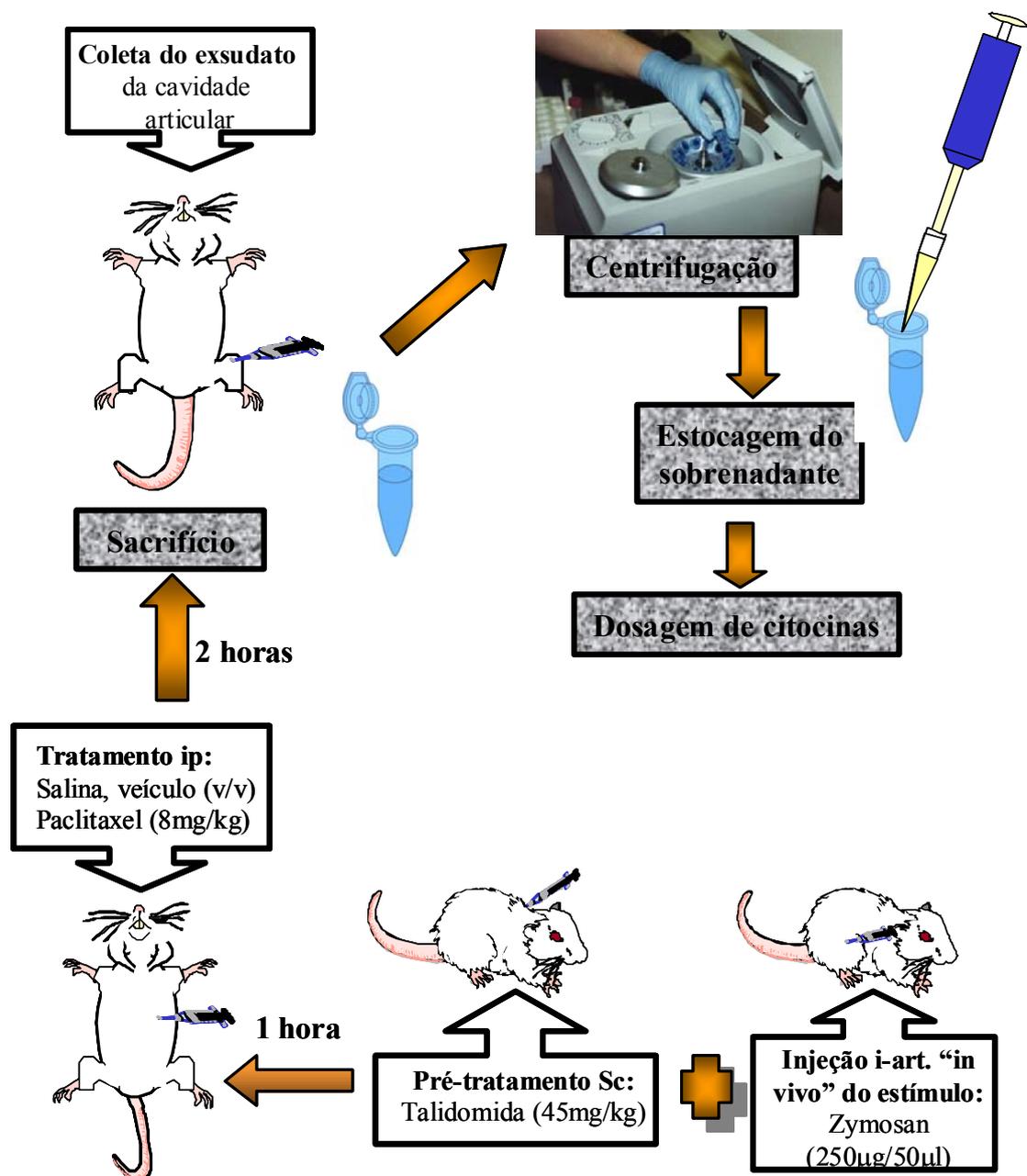


Ilustração 2.2. Desenho esquemático do protocolo para obtenção do lavado articular de joelho de ratos estimulados "in vivo" com paclitaxel e zymosan e pré-tratados com talidomida.

2.7.4 Efeito do paclitaxel sobre a detecção de TNF por imunohistoquímica em tecido sinovial de joelho de ratos estimulados “in vivo” com zymosan

Os animais receberam injeção intrarticular de zymosan (250µg/animal; 50µl). Após 1 hora os ratos foram tratados por via intraperitoneal com PCX (8mg/kg), salina ou Cremophor EL (v/v). Após 3 horas da injeção do estímulo as membranas sinoviais foram removidas para a realização de imunohistoquímica de acordo com o protocolo supracitado (Ilustração 2.3).

2.7.5 Efeito do pré-tratamento com talidomida sobre a detecção de TNF por imunohistoquímica em tecido sinovial de joelho de rato tratados com paclitaxel e estimulados com zymosan

Os animais foram pré-tratados com talidomida (45mg/kg; Sc) por via subcutânea associado à injeção intrarticular de zymosan (250µg/animal; 50µl). Após 1 hora os ratos foram tratados por via ip com salina (controle), Cremophor EL (v/v) ou PCX (8mg/kg). Após 3 horas da injeção do estímulo as membranas sinoviais foram removidas para a realização de imunohistoquímica de acordo com o protocolo supracitado (Ilustração 2.3).

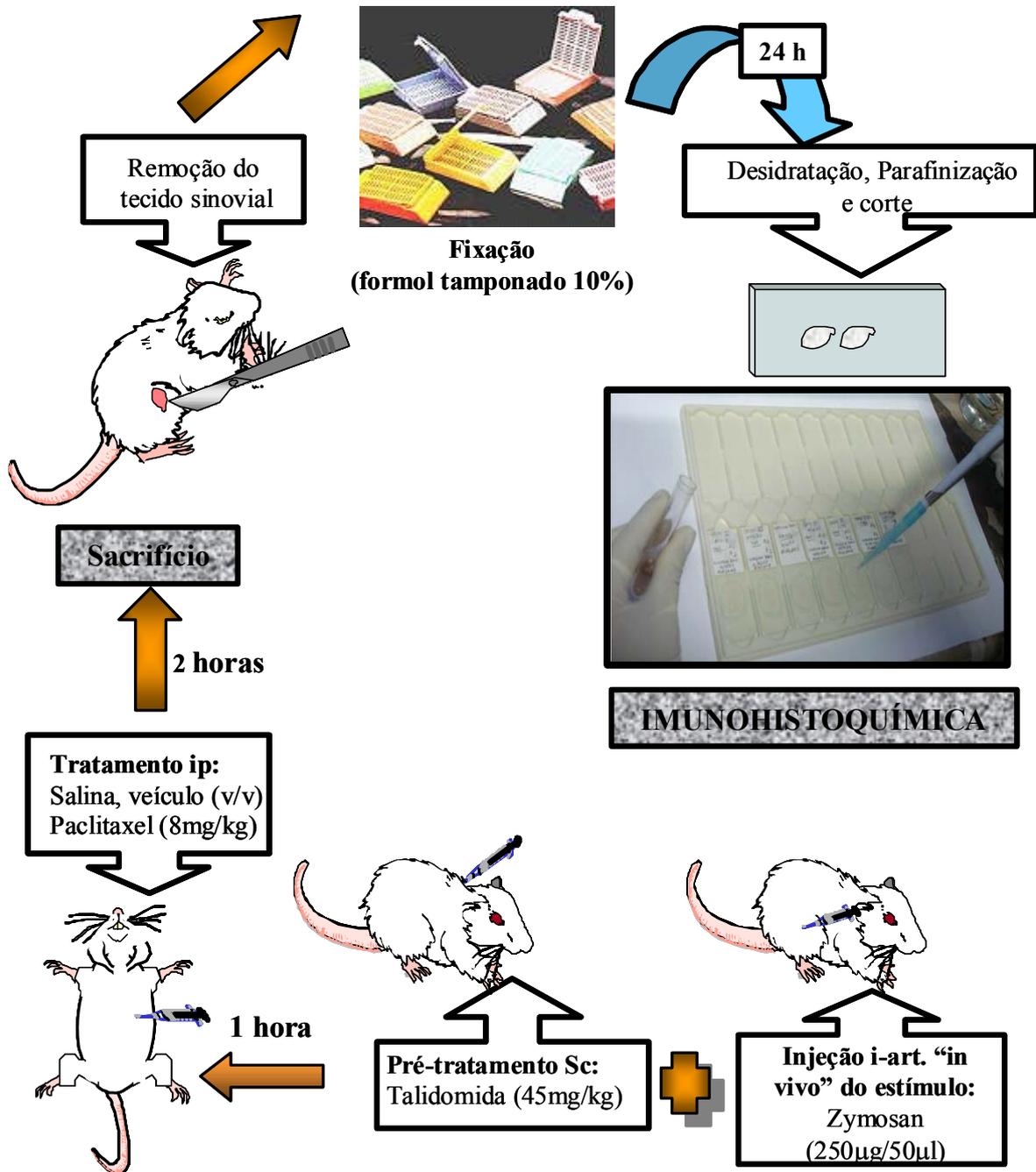


Ilustração 2.3. Desenho esquemático do protocolo para obtenção de peças histológicas para realização do ensaio de imunohistoquímica de membrana sinovial de ratos pré-tratados com talidomida e estimulados "in vivo" com paclitaxel e zymosan.

2.7.6 Efeito da administração de sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados “in vivo” com zymosan e paclitaxel nas contorções abdominais

Sobrenadante de cultura de macrófagos murinos estimulados “in vivo” com zymosan (1mg/cav) e PCX (8mg/kg) após 2 horas de incubação foi administrado um volume de 0,5ml por via intraperitoneal em camundongos Swiss. As contorções abdominais foram computadas durante 30 min. após a administração do mesmo (Ilustração 2.4).

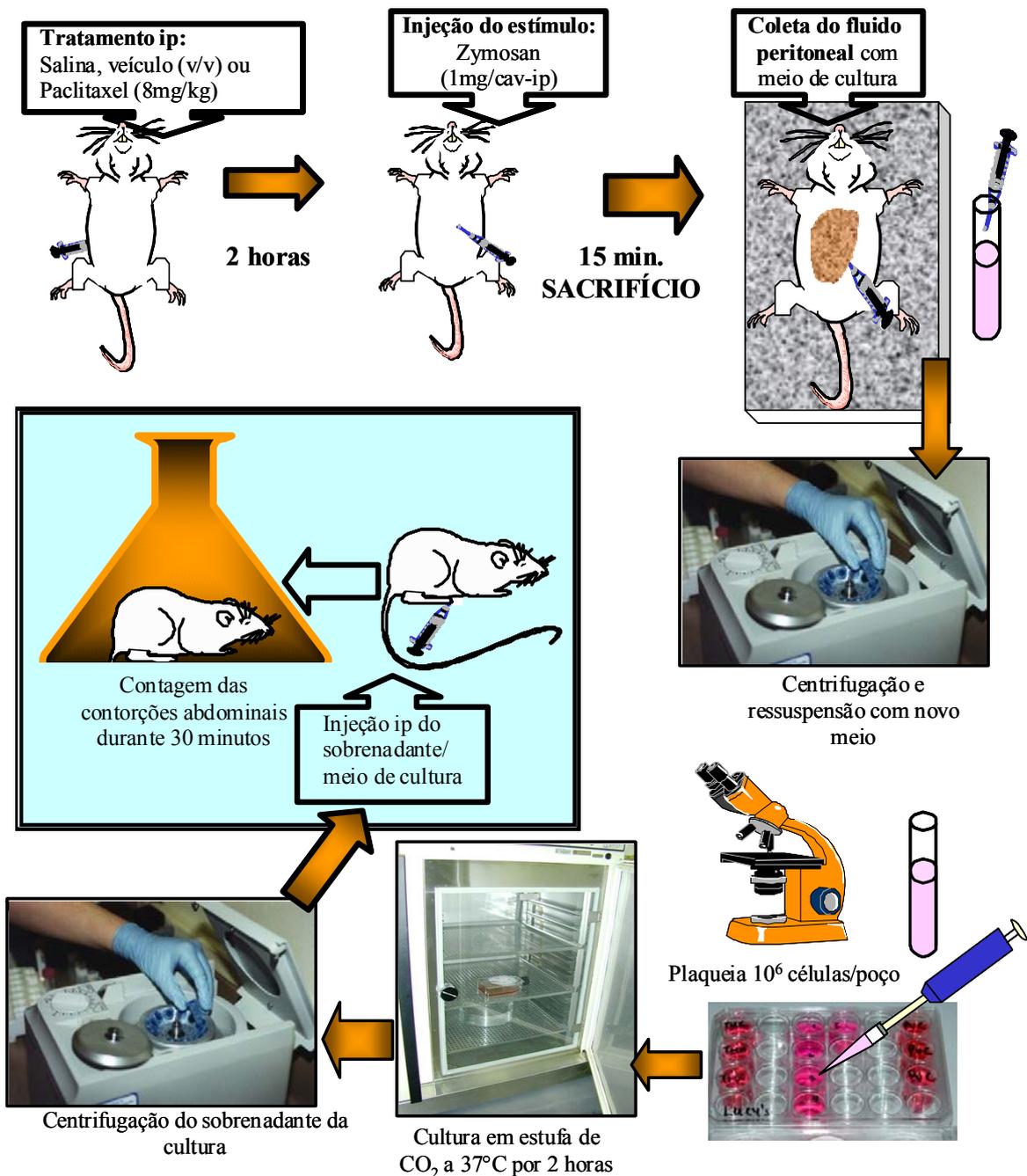
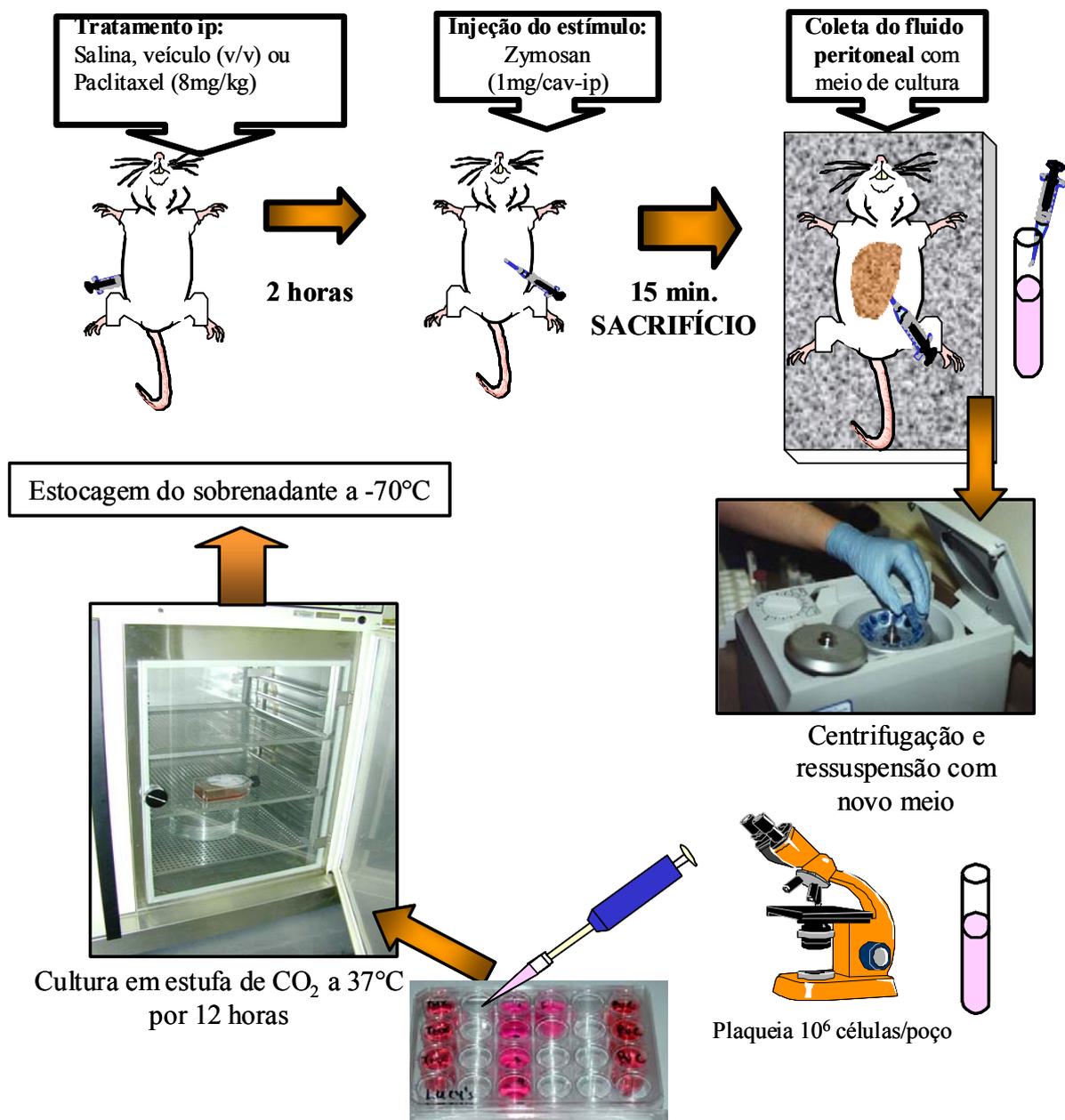


Ilustração 2.4. Desenho esquemático do teste de contorção abdominal em camundongos estimulados por sobrenadante de cultura de macrófagos murinos (2 horas) estimulados “in vivo” com zymosan e paclitaxel.

2.7.7 Efeito do paclitaxel sobre a liberação de citocinas (TNF e KC) por macrófagos peritoneais de camundongos estimulados “in vivo” com zymosan submetidos ao teste de contorções abdominais

Os camundongos foram tratados via intraperitoneal com PCX (8mg/kg) 2 horas antes da injeção ip de zymosan (1mg/animal). Quinze minutos depois, os animais foram sacrificados e o exsudato peritoneal foi colhido e posto em cultura por 12 horas. O sobrenadante foi retirado para a realização da dosagem de citocinas pelo protocolo de ELISA descrito anteriormente (Ilustração 2.5).



2.7.8 Efeito sistêmico do paclitaxel em dose única ou cumulativa no teste da placa quente em camundongos

Após a tomada do tempo zero, PCX em dose única (8mg/kg) ou dose cumulativa de 2mg/kg/dia por 4 dias consecutivos, foram injetadas por via intraperitoneal e 2h, 24h, 48h, 72 e 96h depois foi registrado o tempo de reação (s) na placa quente (45 + 1°C) (Ilustração 2.6).

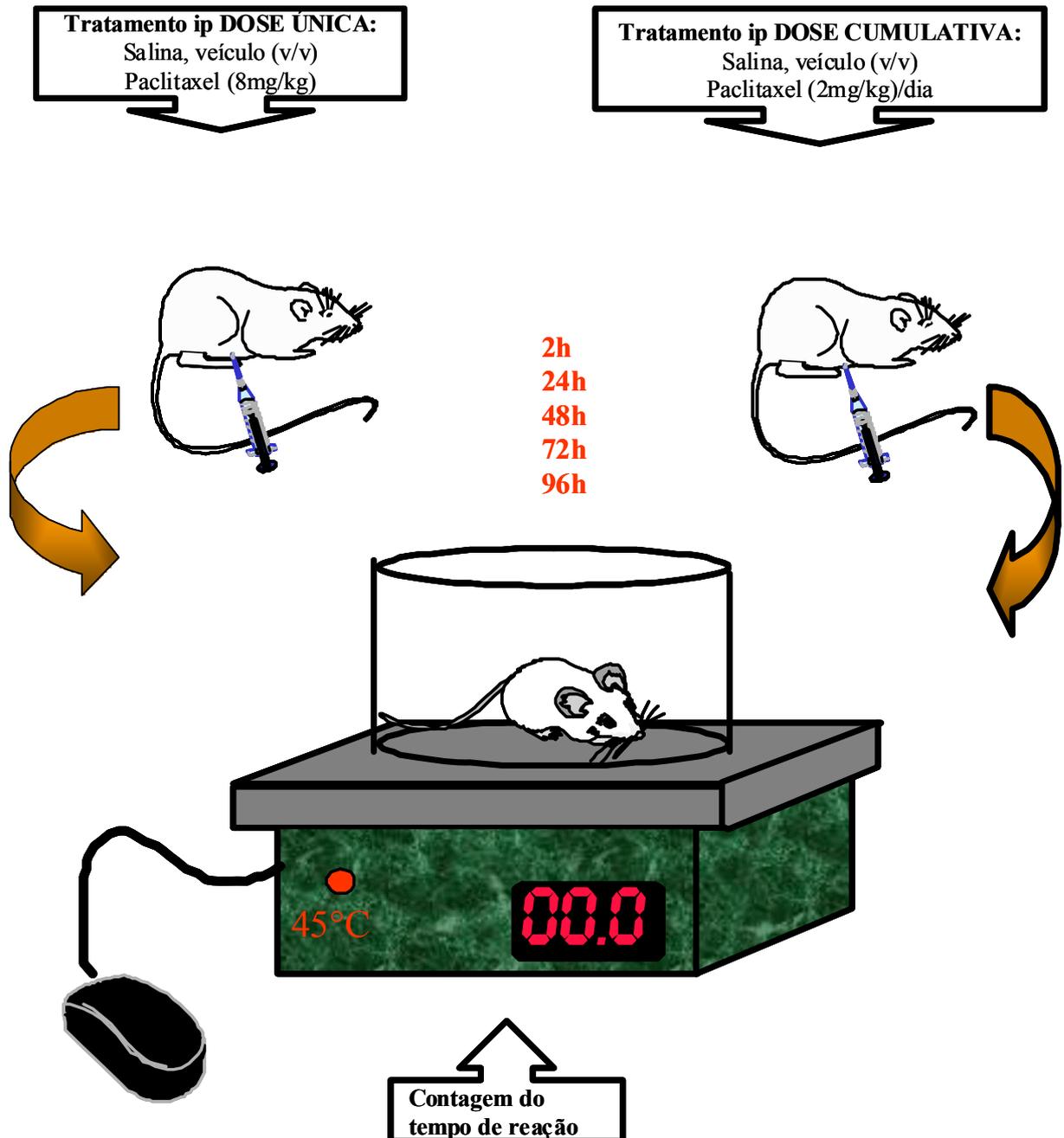


Ilustração 2.6. Desenho esquemático do teste da placa quente em camundongos tratados com paclitaxel.

2.7.9 Efeito sistêmico do paclitaxel em dose única no teste da placa quente em ratos

Após a tomada do tempo zero, PCX (8mg/kg) foram injetadas por via intraperitoneal e 2h, 24h, 48h, 72h e 96h depois foi registrado o tempo de reação (s) na placa quente (45 + 1°C) (Ilustração 2.7).

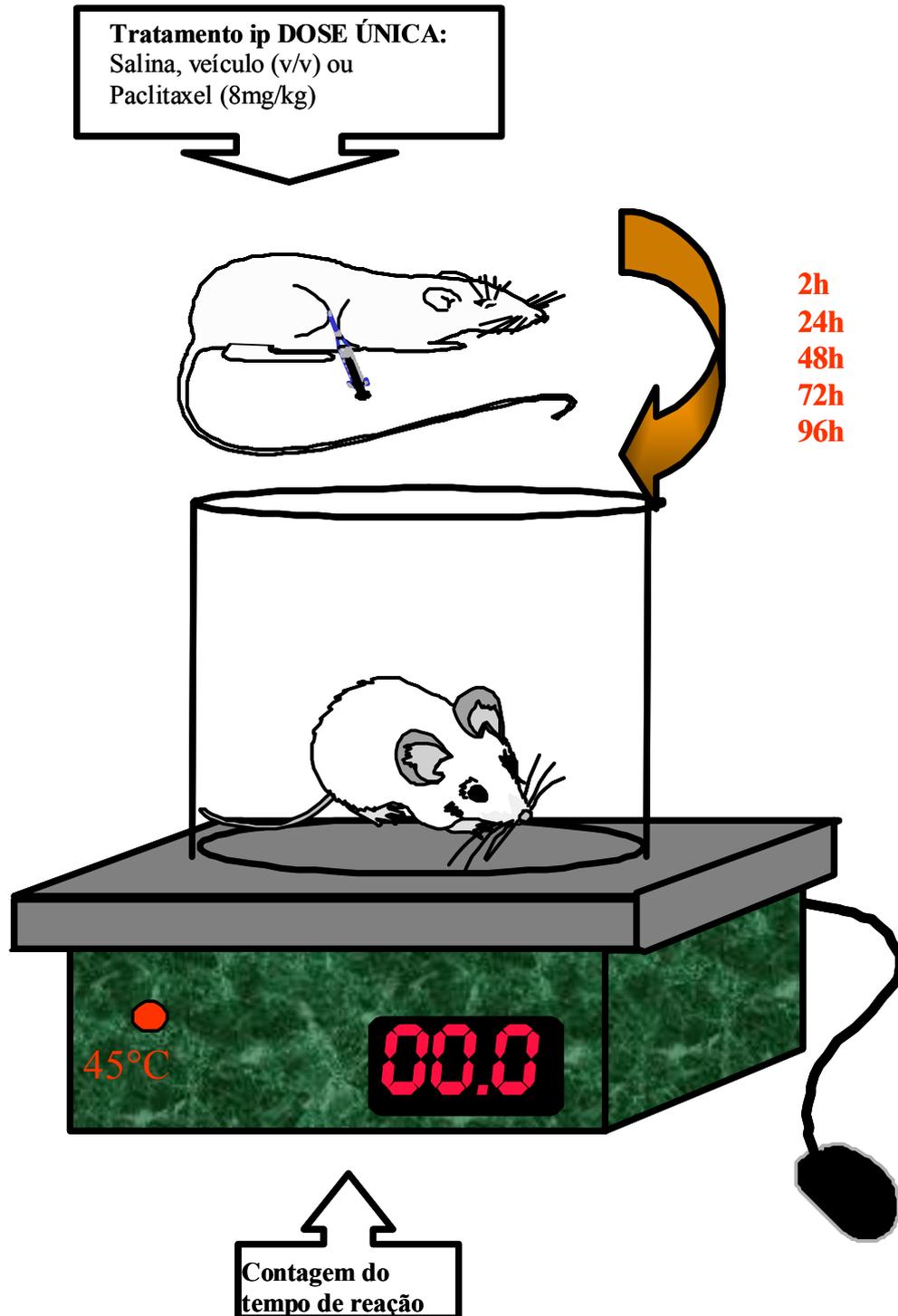


Ilustração 2.7. Desenho esquemático do teste da placa quente em ratos tratados com paclitaxel

2.7.10 Efeito do pré-tratamento com atorvastatina sobre o pico da incapacitação articular (tempo de suspensão da pata) induzida por paclitaxel e zymosan em ratos

Atorvastatina (3, 10, 30mg/kg) foi administrada por via oral por 3 dias consecutivos. No terceiro dia após 2 horas da administração da atorvastatina os animais receberam injeção intrarticular de zymosan (250 μ g/animal; 50 μ l) e 1 hora depois foram tratados por via intraperitoneal com PCX (8mg/kg), salina ou Cremophor EL (v/v). O tempo de suspensão da pata foi medido durante 60 segundos de hora em hora até a 4ª hora após a injeção do estímulo (Ilustração 2.8).

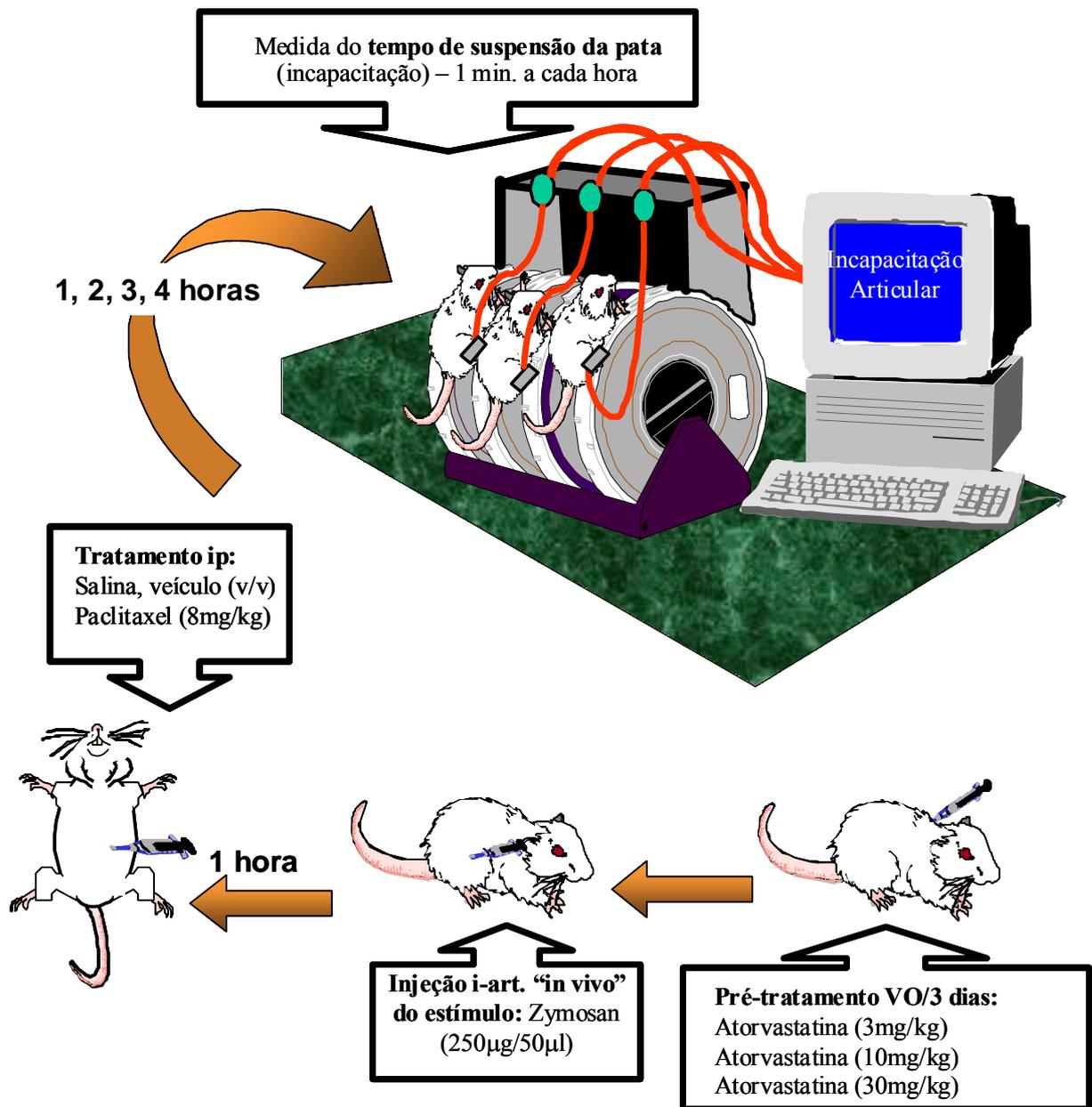


Ilustração 2.8. Desenho esquemático do teste de incapacitação articular em ratos pré-tratados com atorvastatina e estimulados com paclitaxel e zymosan.

2.7.11 Efeito do pré-tratamento com atorvastatina sobre a detecção de TNF, IL-1 e TLR-4 por imunohistoquímica em tecido sinovial de joelho de ratos estimulados “in vivo” com paclitaxel e zymosan

Atorvastatina (3, 10, 30mg/kg) foi administrada por via oral por 3 dias consecutivos. No terceiro dia após 2 horas da administração da atorvastatina os animais receberam injeção intrarticular de zymosan (250µg/animal; 50µl) e 1 hora depois foram tratados por via intraperitoneal com PCX (8mg/kg), salina ou Cremophor EL (v/v). Após 3 horas da injeção do estímulo o tecido sinovial foi removido para a realização de imunohistoquímica de acordo com o protocolo já descrito (Ilustração 2.9).

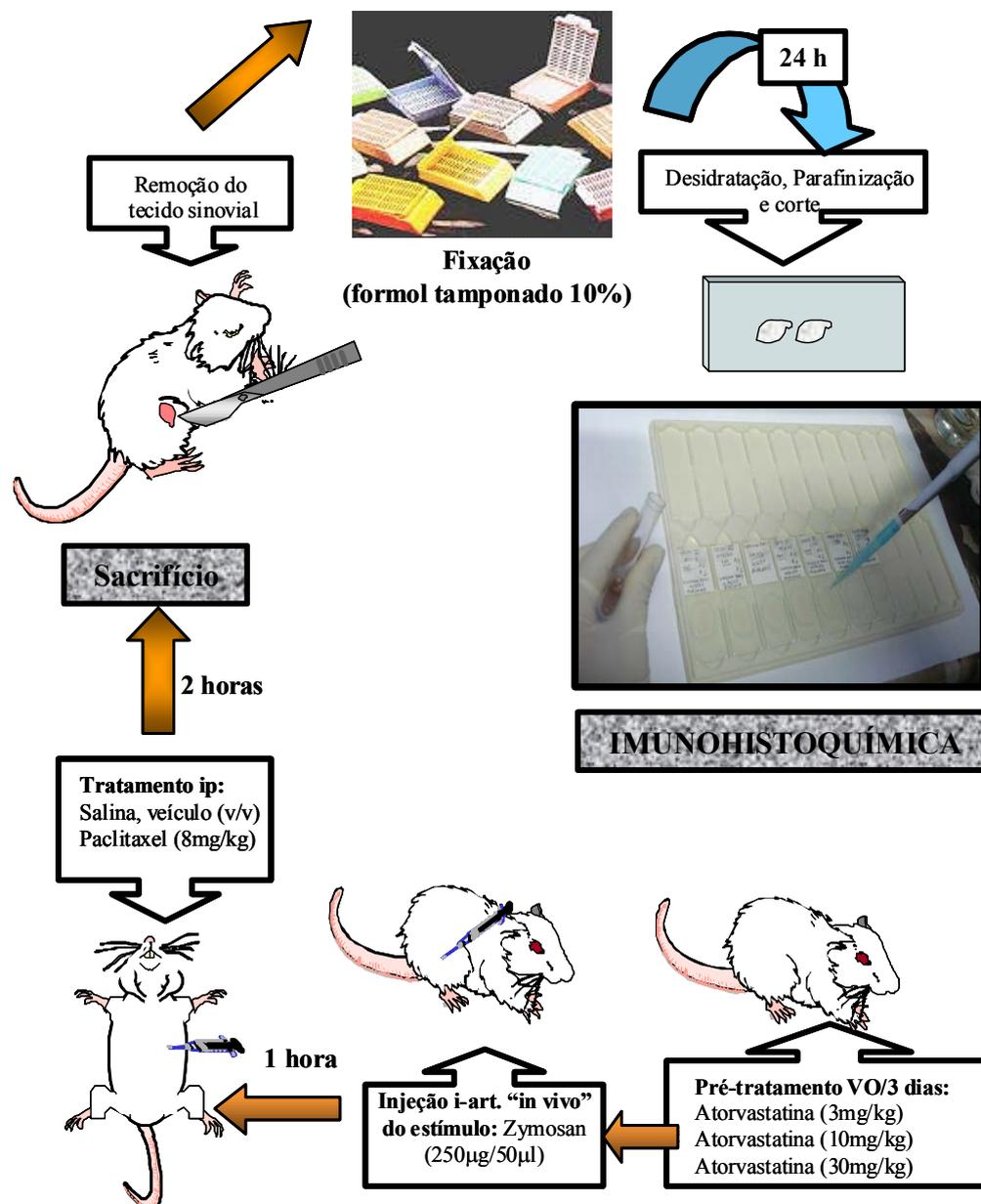


Ilustração 2.9. Desenho esquemático do protocolo para obtenção de membrana sinovial de joelhos de ratos pré-tratados com atorvastatina e estimulados com paclitaxel e zymosan “in vivo” para realização do ensaio de imunohistoquímica.

2.7.12 Efeito do pré-tratamento com atorvastatina sobre os níveis de citocinas (TNF e IL-1) presentes no lavado articular do joelho de ratos estimulados “in vivo” com paclitaxel e zymosan

Atorvastatina (3, 10, 30mg/kg) foi administrada por via oral por 3 dias consecutivos. No terceiro dia após 2 horas da administração da atorvastatina os animais receberam injeção intrarticular de zymosan (250µg/animal; 50µl) e 1 hora depois foram tratados por via intraperitoneal com PCX (8mg/kg), salina ou Cremophor EL (v/v). A lavagem da cavidade articular para a coleta do exsudato foi feita 3 horas após a injeção do estímulo. O exsudato foi centrifugado e o sobrenadante estocado para posterior dosagem de citocina pelo protocolo descrito anteriormente (Ilustração 2.10).

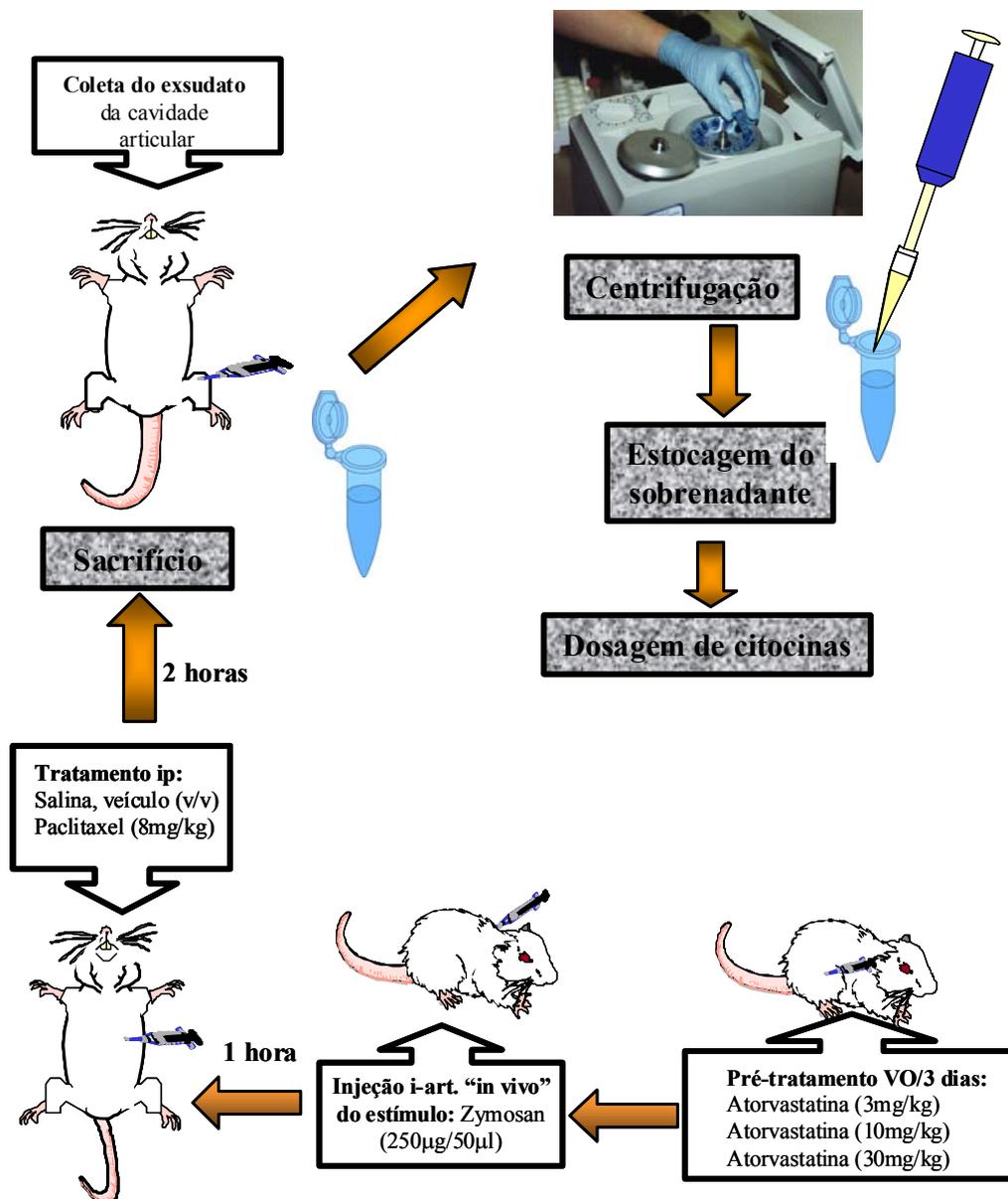


Ilustração 2.10. Desenho esquemático do protocolo para obtenção do lavado articular de joelho de ratos pré-tratados com atorvastatina e estimulados “in vivo” com paclitaxel e zymosan.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPad Prisma. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As médias dos vários procedimentos experimentais foram comparadas utilizando a análise de variância (ANOVA), e a significância entre os grupos estabelecida pelo teste Bonferroni. A significância mínima foi aceita ao nível de $p < 0,05$.

Resultados

3.1 Inibição do efeito potencializador do paclitaxel na artralgia experimental induzida por zymosan em ratos, pela talidomida, pentoxifilina e dexametasona no teste de incapacitação articular

A injeção subcutânea de talidomida (45mg/kg), pentoxifilina (45mg/kg) e dexametasona (2mg/kg), 60 minutos antes da injeção intraperitoneal de paclitaxel (8mg/kg), foi capaz de inibir de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,001$) o efeito potenciador hipernociceptivo do paclitaxel na artralgia experimental induzida por subdose de zymosan através da diminuição de 62,9% (TLD), 57,5% (PTX) e 71,5% (DEXA) do tempo de suspensão da pata na quarta hora, que corresponde ao pico de incapacitação (Figura 3).

3.2 Inibição do efeito potencializador do paclitaxel na artralgia experimental induzida por zymosan em ratos pela indometacina e celecoxibe no teste de incapacitação articular

A injeção subcutânea de indometacina (2mg/kg) e celecoxibe (60mg/kg), 60 minutos antes da injeção intraperitoneal de paclitaxel (8mg/kg), foi capaz de inibir de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,001$) o efeito potenciador hipernociceptivo do paclitaxel na artralgia induzida por subdose de zymosan através da diminuição de 74,9% (INDO) e 57,2% (CEL) do tempo de suspensão da pata na quarta hora, que corresponde ao pico de incapacitação (Figura 4).

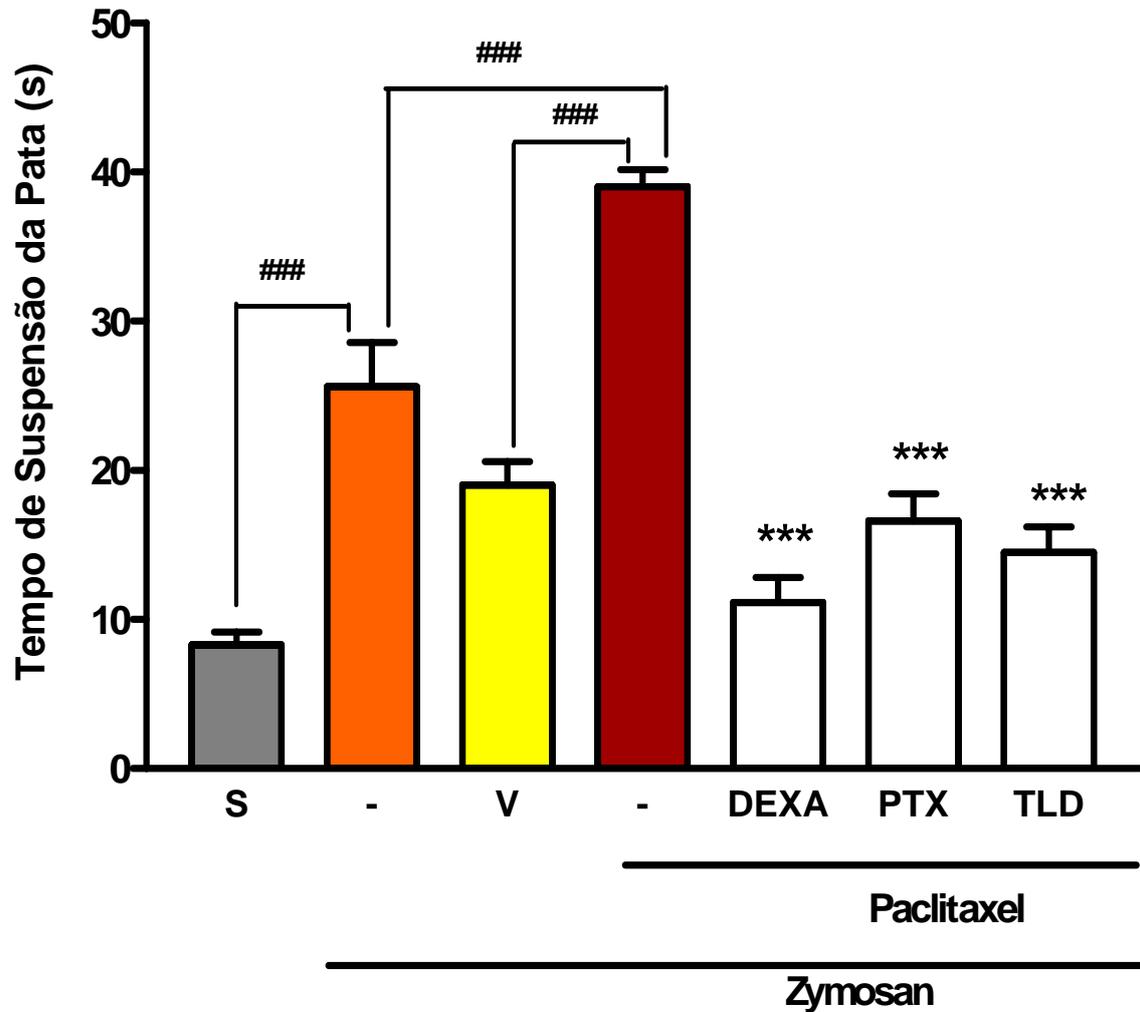


Figura 3. Efeito da administração sistêmica de talidomida (TLD), pentoxifilina (PTX) e dexametasona (DEXA) sobre o pico da incapacitação articular induzida por zymosan (ZY) em joelho de ratos tratados com paclitaxel. Zymosan (250 μ g/animal) foi administrado por via intrarticular concomitante à administração do pré-tratamento com TLD (45mg/kg), PTX (45mg/kg) e DEXA (2mg/kg) por via subcutânea. Após 1 hora os ratos foram tratados por via intraperitoneal com salina (controle;S) veículo (Cremophor EL; V) ou paclitaxel (8mg/kg). A intensidade da incapacitação articular foi medida antes (tempo zero) e a cada hora até a 4ª hora após a administração do estímulo nociceptivo. As colunas representam a média \pm EPM do tempo de suspensão da pata realizada na 3ª hora (pico da incapacitação) nos 6 animais de cada grupo. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação aos respectivos grupos controle (*** p <0,001; ### p <0,001: Bonferroni/ANOVA).

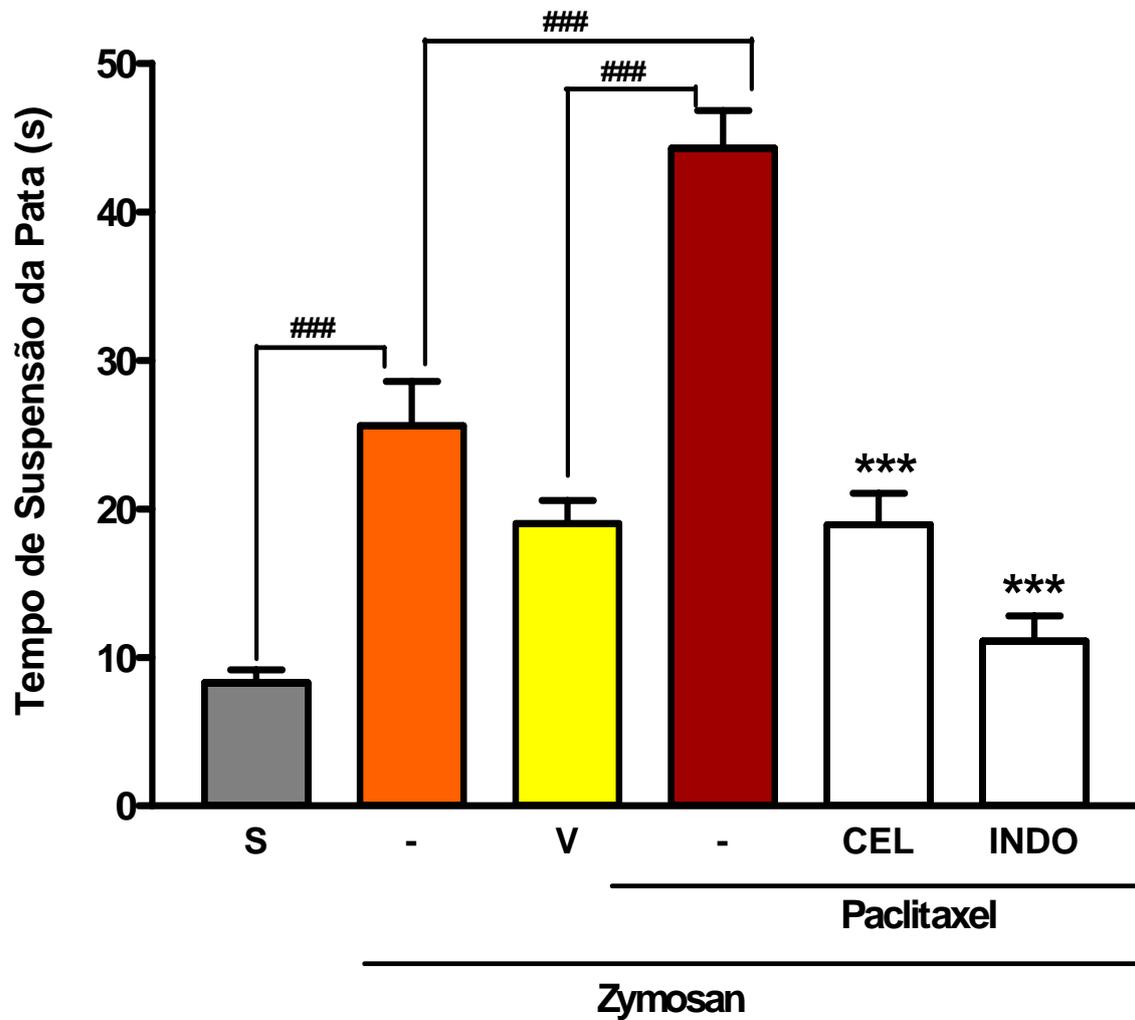


Figura 4. Efeito da administração sistêmica de celecoxibe (CEL) e indometacina (INDO) sobre o pico da incapacitação articular induzida por zymosan (ZY) em Joelho de ratos tratados com paclitaxel. Zymosan (250µg/animal) foi administrado por via intrarticular concomitante à administração do pré-tratamento com CEL (60mg/kg) e INDO (2mg/kg) por via subcutânea. Após 1 hora os ratos foram tratados por via intraperitoneal com salina (controle;S) veículo (Cremophor EL; V) ou paclitaxel (8mg/kg). A intensidade da incapacitação articular foi medida antes (tempo zero) e a cada hora até a 4ª hora após a administração do estímulo nociceptivo. As colunas representam a média ± EPM do tempo de suspensão da pata realizada na 3ª hora (pico da incapacitação) nos 6 animais de cada grupo. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação aos respectivos grupos controle (***) $p < 0,001$; ### $p < 0,001$: Bonferroni/ANOVA).

3.3 Efeito do pré-tratamento com talidomida sobre a liberação de citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF e CINC-1) para cavidade articular de joelho de ratos tratados com paclitaxel e submetidos à artrite experimental por zymosan

Talidomida na dose que induziu o maior efeito antinociceptivo no bloqueio da incapacitação articular (45mg/kg) foi capaz de inibir de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em 60,1% a liberação de TNF (Figura 5, painel A), mas não a liberação de CINC-1 (Figura 5, painel B), IL-1 β e IL-6 (Figura 6, painel A e B) para a cavidade articular de joelhos de ratos tratados com paclitaxel (8mg/kg) 1 hora depois da administração de $\frac{1}{4}$ da dose de zymosan, capaz de induzir usualmente incapacitação articular (250 μ g/animal). A inibição da liberação de TNF por talidomida foi constatada pela dosagem da mesma no sobrenadante do fluido coletado através da lavagem da cavidade articular de joelhos de ratos estimulados com uma subdose de zymosan e paclitaxel. Para tal utilizou-se imunoenaios específicos para as citocinas, como descrito anteriormente.

3.4 Efeito do pré-tratamento com talidomida sobre a produção do fator de necrose tumoral (TNF) por células da membrana sinovial de joelhos de ratos tratados com paclitaxel e submetidos à artrite experimental por zymosan, demonstrado por reação imunohistoquímica

Talidomida (45mg/kg) foi administrada previamente ao zymosan (250 μ g/animal) na dose em que demonstrou antinocicepção máxima no teste da incapacitação articular em pata de ratos tratados com paclitaxel (8mg/kg). Os protocolos de tratamento e indução foram os mesmos utilizados na artrite experimental. Foi observado que paclitaxel induziu a produção de TNF por células residentes da membrana sinovial demonstrado por uma intensa marcação por imunohistoquímica (Figura 7, painel E). O pré-tratamento com talidomida diminuiu visivelmente essa marcação por imunohistoquímica (Figura 7, painel F).

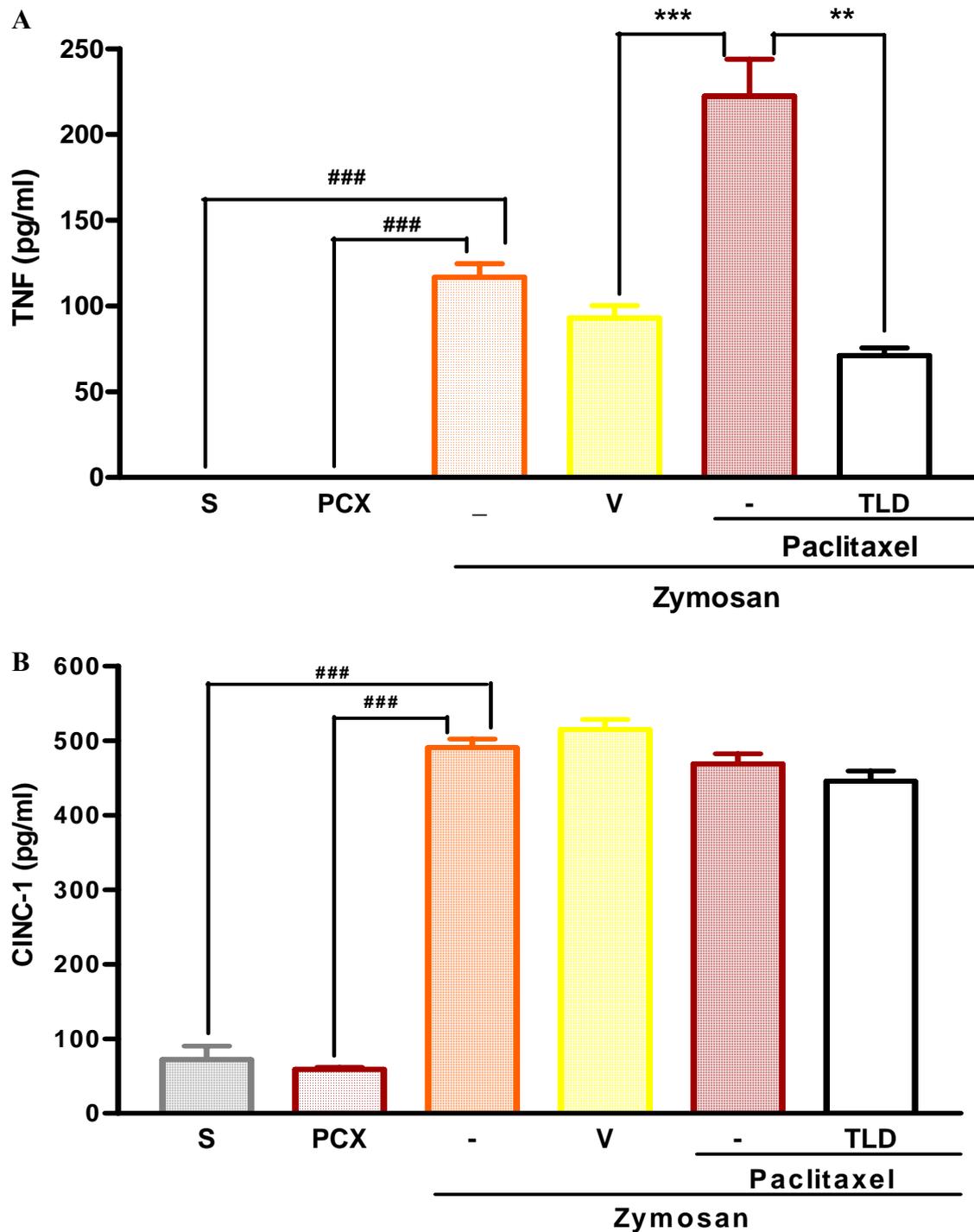


Figura 5. Efeito do pré-tratamento com talidomida sobre a liberação do fator de necrose tumoral (TNF) e CINC-1 na cavidade articular de joelho de ratos estimulados com zymosan (ZY) e paclitaxel (PCX). Zymosan (250 μ g/animal) foi administrado por via intrarticular concomitante à administração do pré-tratamento com TLD (45mg/kg) por via subcutânea. Após 1 hora os ratos foram tratados por via intraperitoneal com salina (controle;S) veículo (Cremophor EL; V) ou paclitaxel (8mg/kg).Três horas após a injeção do ZY a cavidade articular foi lavada e do sobrenadante obtido foram dosados os níveis de TNF (painel A) e CINC-1 (painel B) por espectrofotometria (ELISA). As colunas representam a média \pm EPM da quantidade dosada de TNF e CINC-1 dos cinco animais de cada grupo. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação aos respectivos grupos controle (** $p < 0,001$; ### $p < 0,001$: Bonferroni/ANOVA).

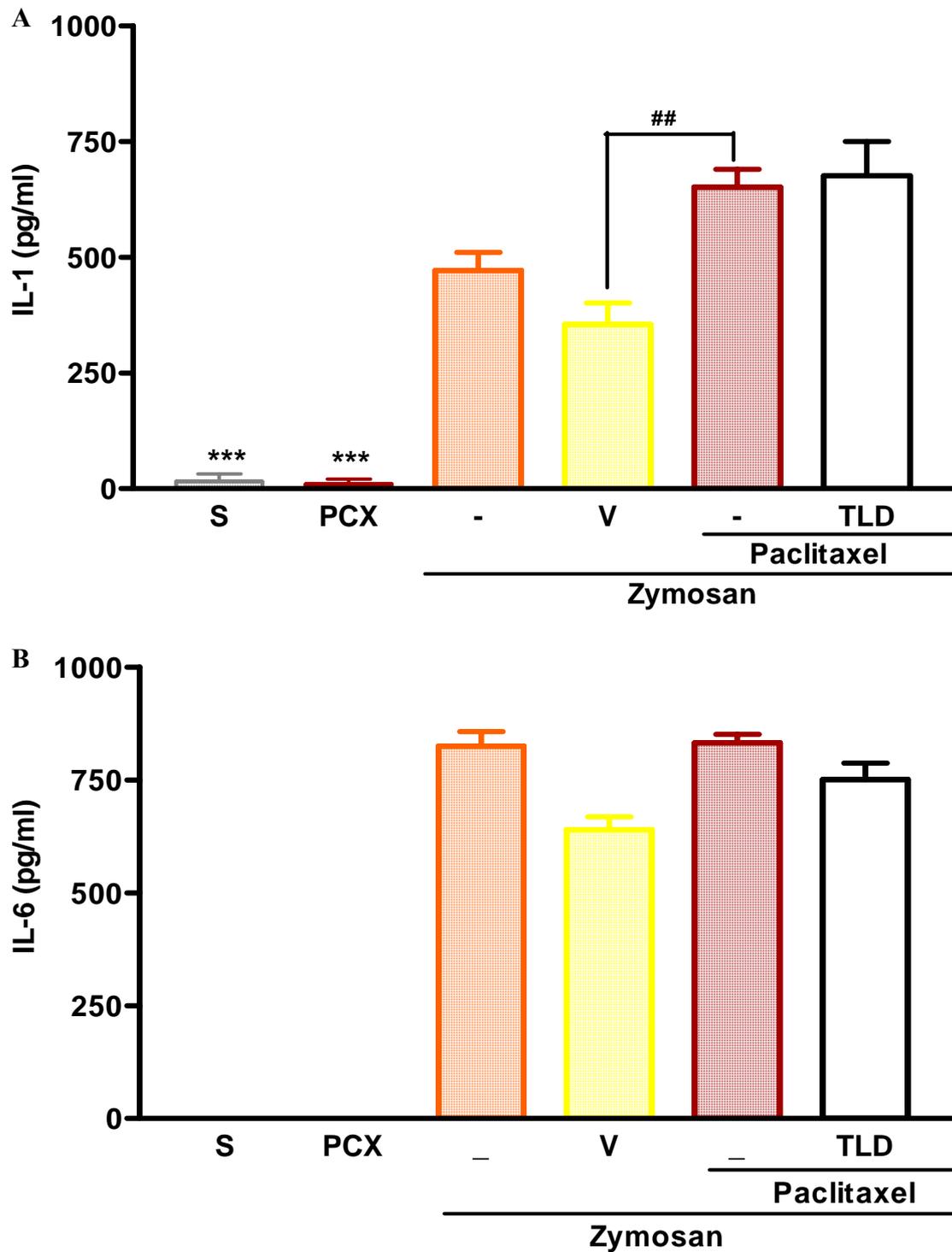


Figura 6. Efeito do pré-tratamento com talidomida sobre a liberação da interleucina-1 beta (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6) na cavidade articular de joelho de ratos estimulados com zymosan (ZY) e paclitaxel (PCX). Zymosan (250 μ g/animal) foi administrado por via intrarticular concomitante à administração do pré-tratamento com TLD (45mg/kg) por via subcutânea. Após 1 hora os ratos foram tratados por via intraperitoneal com salina (controle;S) veículo (Cremophor EL; V) ou paclitaxel (8mg/kg). Três horas após a injeção do ZY a cavidade articular foi lavada e do sobrenadante obtido foram dosados os níveis de IL-1 β (painel A) e IL-6 (painel B) por espectrofotometria (ELISA). As colunas representam a média \pm EPM da quantidade dosada de IL-1 β e IL-6 dos cinco animais de cada grupo (Bonferroni/ANOVA). Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação aos respectivos grupos controle (**p<0,001; ##p<0,01; Bonferroni/ANOVA).

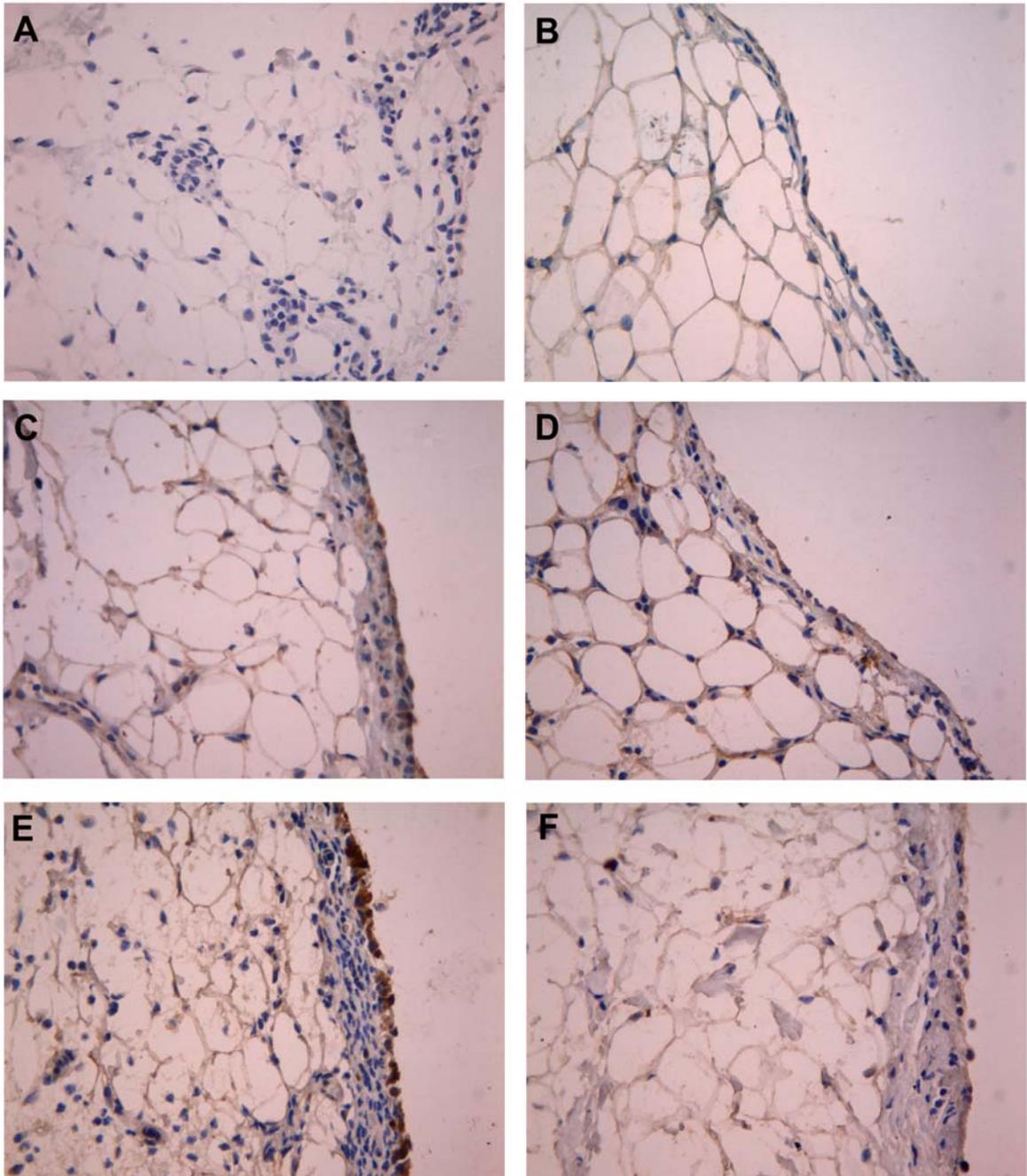


Figura 7. Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica do fator de necrose tumoral (TNF) no tecido sinovial de joelho de ratos submetidos à artrite induzida por zymosan (ZY) e paclitaxel (PCX), e pré-tratados com talidomida (TLD). Os animais foram pré-tratados com salina ou TLD (45mg/kg; Sc). Uma hora depois receberam injeção intrarticular de uma subdose de ZY (250 μ g/animal) e 2 horas depois do pré-tratamento receberam injeção intraperitoneal de PCX (8mg/kg). As sinóvias foram retiradas após 3 horas da injeção de ZY para detecção de TNF por imunohistoquímica (aumento de 400X). Controle negativo, sinóvia submetida à artrite por ZY e PCX na ausência do anticorpo primário anti-TNF (A); Sinóvia de um animal tratado com salina mostrando ausência de marcação para TNF (B); sinóvia de animal estimulada somente com ZY, mostrando discreta marcação para TNF (C); sinóvia de animal estimulada com ZY e veículo com discretíssima marcação para TNF (D); sinóvia de animal estimulada com ZY e PCX, mostrando intensa marcação para TNF (E); sinóvia de animal pré-tratado com TLD, mostrando redução relevante da marcação para TNF (F).

3.5 Efeito do paclitaxel sobre a liberação de citocinas (TNF e KC) por macrófagos residentes peritoneais de camundongos estimulados “in vivo” com zymosan submetidos ao teste de contorções abdominais

Paclitaxel (8mg/kg) administrado por via intraperitoneal duas horas antes da injeção ip de zymosan (1mg/animal) foi capaz de aumentar de maneira estatisticamente significativa em 316,4 % ($p < 0,001$) a liberação de TNF (Figura 8, painel A), mas não a liberação de KC (Figura 8, painel B) por macrófagos peritoneais. O aumento da liberação de TNF foi constatado pela dosagem da mesma no sobrenadante de cultura dos macrófagos obtidos das cavidades previamente tratadas com paclitaxel e estimuladas com zymosan. Para tal utilizaram imunoenaios específicos para as citocinas, como descrito anteriormente.

3.6 Efeito da administração de sobrenadante de cultura de macrófagos murinos estimulados “in vivo” com zymosan e paclitaxel no modelo das contorções abdominais

A injeção intraperitoneal do sobrenadante de cultura de macrófagos murinos estimulados “in vivo” com zymosan (1mg/cav) e paclitaxel (8mg/kg) após duas horas de incubação, foi capaz de induzir de maneira estatisticamente significativa o aumento de 257% ($p < 0,001$) das contorções abdominais quando comparado com o grupo controle (Figura 9).

3.7 Efeito sistêmico do paclitaxel em dose única ou cumulativa sobre o tempo de reação no teste da placa quente em camundongos

Paclitaxel administrado intraperitoneal em dose única (8mg/kg) ou em dose cumulativa de (2mg/kg/dia) por quatro dias consecutivos, a exemplo do observado com veículo ou salina, quando administrado intraperitoneal, não foi capaz de modificar de forma significativa o tempo de reação dos camundongos no teste da placa quente ao longo de noventa e seis horas de avaliação (quatro dias), tanto em esquema de administração em dose única como em doses cumulativas (Figura 10).

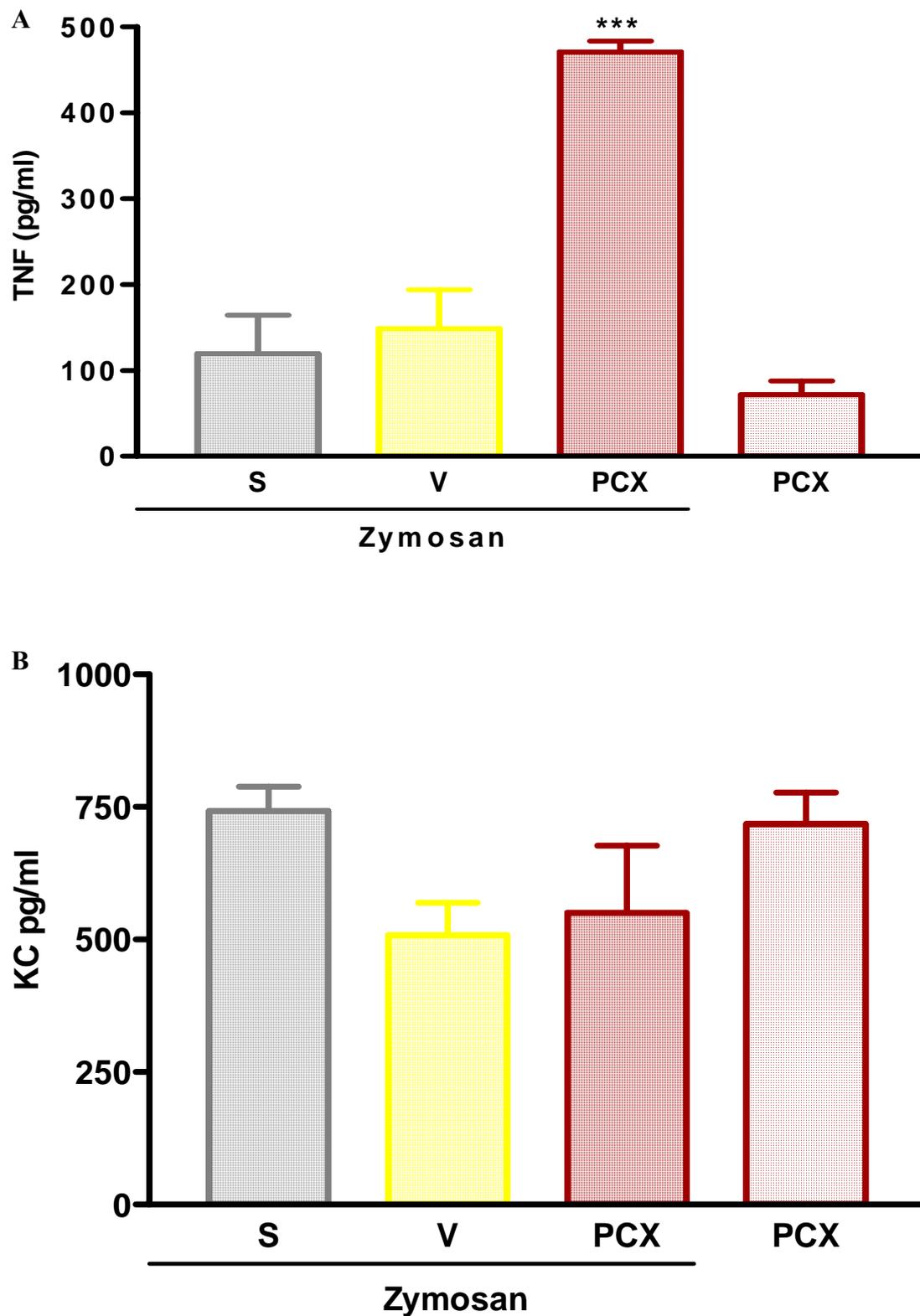


Figura 8. Efeito do paclitaxel (PCX) na liberação do fator de necrose tumoral (TNF) e KC por macrófagos peritoneais residentes de camundongo estimulados “in vivo” com zymosan (ZY) e tratados com paclitaxel (PCX). Zymosan (1mg/cavidade) foi administrado em camundongos Swiss previamente tratados via intraperitoneal com Cremophor EL (veículo- v/v) e PCX (8mg/kg). Quinze minutos após a injeção do estímulo (ZY) as células peritoneais foram coletadas e postas em cultura por 12 horas. O sobrenadante foi coletado e TNF (painel A) e KC (painel B) foram dosados por espectrofotometria (ELISA). As colunas representam a média \pm EPM da quantidade dosada de TNF e KC dos cinco animais de cada grupo. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle (***) $p < 0,001$: Bonferroni/ANOVA).

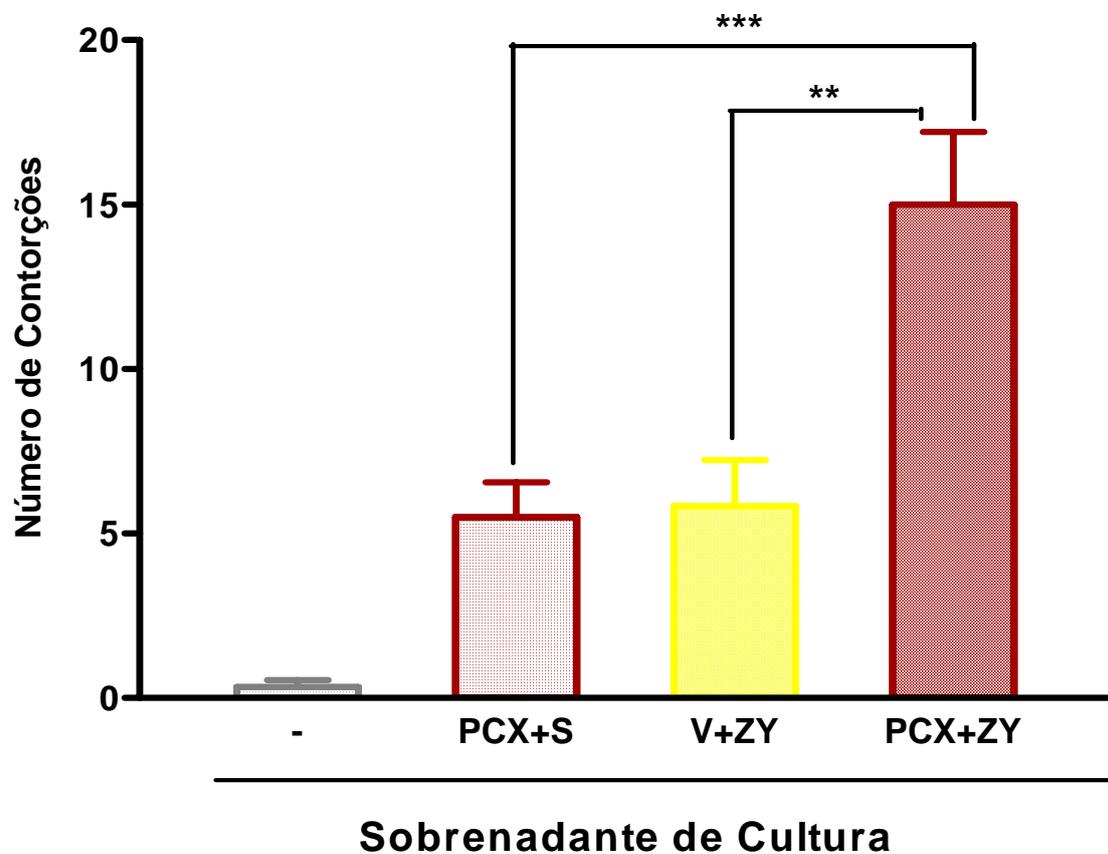


Figura 9. Efeito hipernociceptivo da administração de sobrenadante de cultura de macrófagos murinos estimulados “in vivo” com zymosan (ZY) e paclitaxel (PCX) no modelo de contorções abdominais. O sobrenadante de cultura de macrófagos murinos estimulados “in vivo” com ZY (1mg/cav) + Veículo (V), ZY (1mg/cav) + PCX (8mg/kg), ou salina (S) + PCX (8mg/kg), após 2 horas de incubação foi administrado por via intraperitoneal (0,5ml) em camundongos. As colunas representam a média ± EPM do número de contorções abdominais ocorridos durante 30 minutos após a injeção do sobrenadante nos 6 animais de cada grupo. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo que recebeu o sobrenadante do grupo PCX+ZY (**p<0,01; ***p<0,001; Bonferroni/ANOVA).

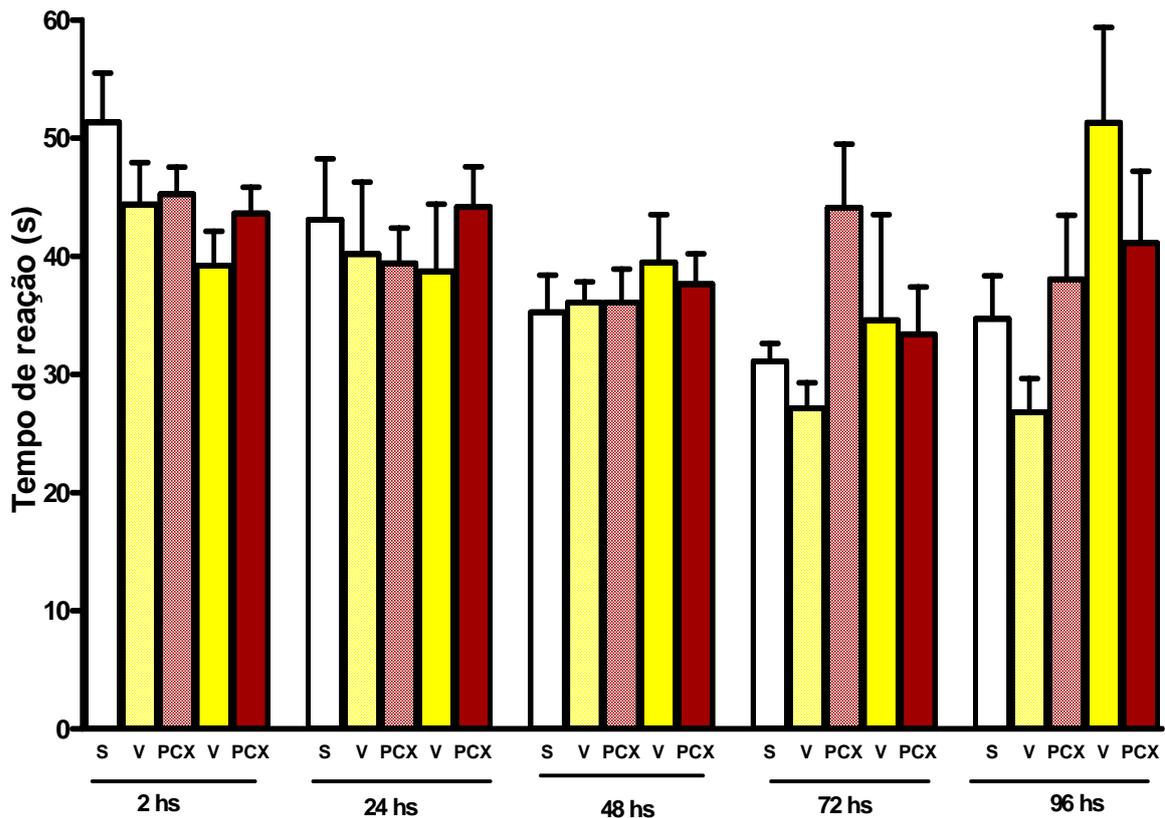


Figura 10. Efeito do paclitaxel (PCX) em dose única (DU) e dose cumulativa (DC) sobre o tempo de reação no teste da placa quente em camundongos. Salina (S), Cremophor-veículo (V) e PCX (8mg/kg- DU) ou PCX durante 4 dias consecutivos (2mg/kg/dia- DC) foram administrados por via intraperitoneal imediatamente após a determinação do tempo zero. O tempo de reação foi determinado com 2, 24, 48, 72 e 96 horas após o tratamento dos camundongos. As colunas cheias (vermelha e amarela) identificam o esquema de administração em dose única e as colunas vazadas (vermelha e amarela) identificam o esquema de administração em dose cumulativa. As colunas representam a média \pm EPM do tempo em segundos dos 6 animais de cada grupo (Bonferroni/ANOVA).

3.8 Efeito sistêmico do paclitaxel em dose única sobre o tempo de reação no teste da placa quente em ratos

Paclitaxel em dose única (8mg/kg), a exemplo do observado com veículo ou salina, quando administrado intraperitoneal, não foi capaz de modificar de forma significativa o tempo de reação dos ratos no teste da placa quente ao longo de 96 horas de avaliação (Figura 11).

3.9 Inibição do efeito potencializador do paclitaxel na artralgia experimental induzida por zymosan em ratos, pela atorvastatina no modelo de incapacitação articular em ratos

A administração de atorvastatina (3, 10, 30mg/kg) por via oral durante três dias consecutivos, foi capaz de inibir de maneira estatisticamente significativa o efeito potenciador hipernociceptivo do paclitaxel na artralgia experimental induzida por subdose de zymosan, através da diminuição de 53,4 % ($p<0,001$), 53,6% ($p<0,001$) e 33,2% ($p<0,01$) do tempo de suspensão da pata no teste de incapacitação articular na quarta hora, que corresponde ao pico de incapacitação. Atorvastatina no terceiro dia foi administrada previamente ao zymosan (250 μ g/animal) e ao paclitaxel (8mg/kg) (Figura 12).

3.10 Efeito do pré-tratamento com atorvastatina (ATV) na produção do fator de necrose tumoral por células da membrana sinovial de joelhos de ratos tratados com paclitaxel e submetidos à artrite experimental induzida por zymosan, demonstrado por reação de imunohistoquímica

Atorvastatina foi administrada nas três doses que demonstraram antinocicepção no teste de incapacitação articular (3, 10, 30mg/kg), por via oral durante três dias consecutivos. No terceiro dia ATV foi administrada previamente ao zymosan (250 μ g/animal) e ao paclitaxel (8mg/kg). Os protocolos de tratamento e indução foram os mesmos utilizados na artrite experimental. Foi observado que paclitaxel induziu a produção de TNF por células residentes da membrana sinovial demonstrado por uma intensa marcação por imunohistoquímica (Figura 13, painel D). O pré-tratamento com ATV diminuiu visivelmente a marcação por imunohistoquímica nas três doses (Figura 13, painel E,F,G).

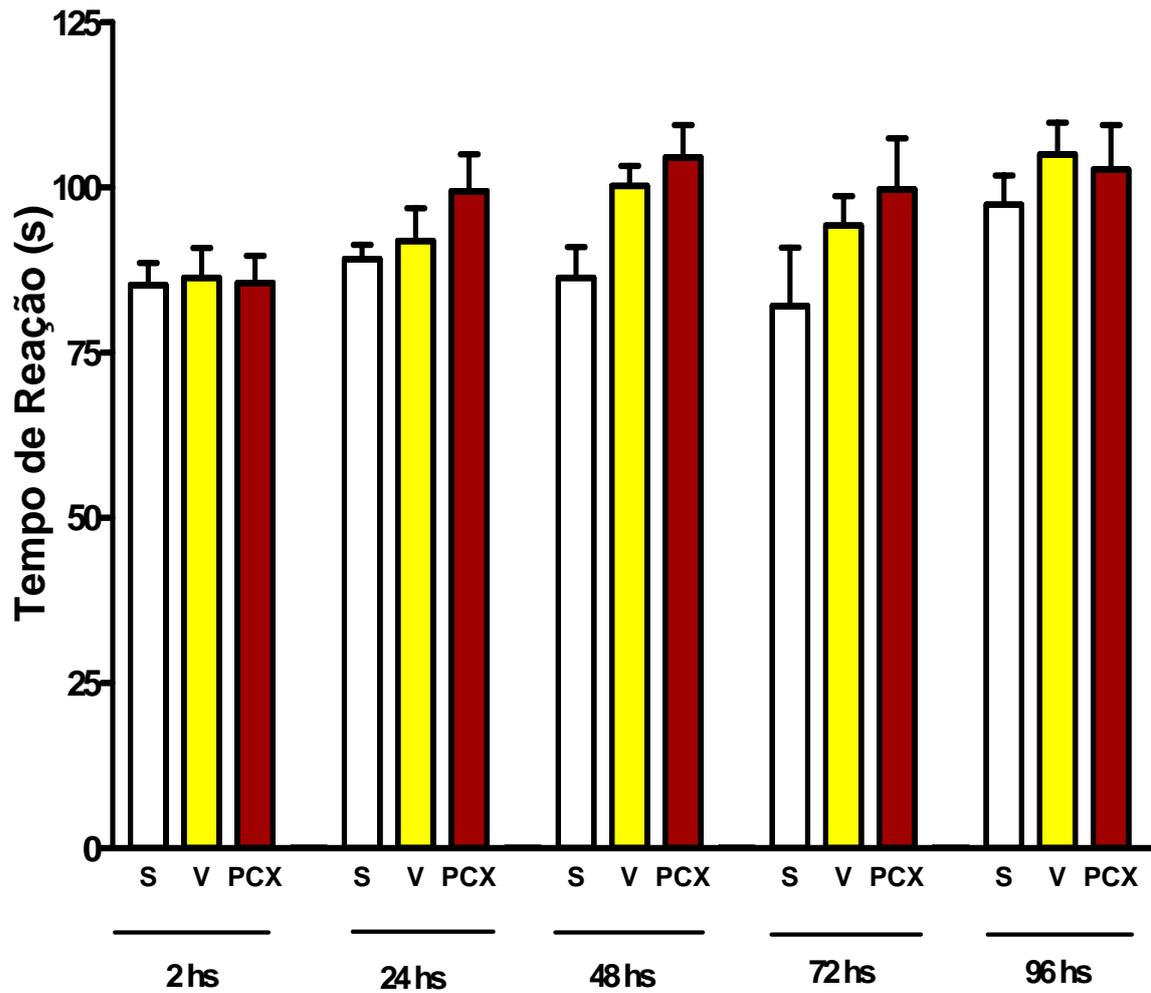


Figura 11. Efeito do paclitaxel (PCX) em dose única (DU) sobre o tempo de reação no teste da placa quente em camundongos. Salina (S), Cremophor-veículo (V) e PCX (8mg/kg- DU) foram administrados por via intraperitoneal imediatamente após a determinação do tempo zero. O tempo de reação foi determinado com 2, 24, 48, 72 e 96 horas após o tratamento dos camundongos. As colunas representam a média \pm EPM do tempo em segundos dos 6 animais de cada grupo (Bonferroni/ANOVA).

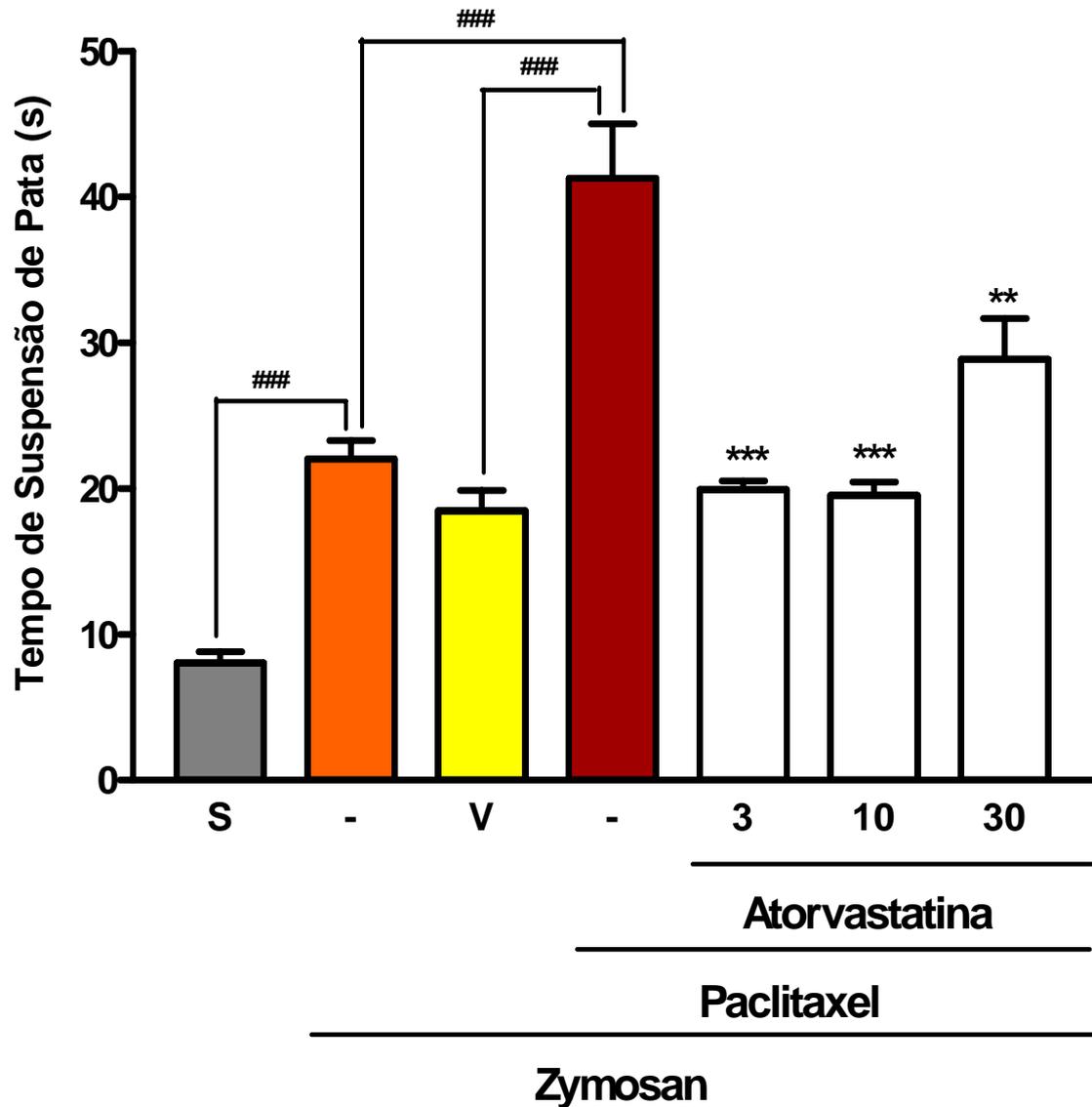


Figura 12. Efeito da administração sistêmica da atorvastatina (ATV) sobre o pico da incapacitação articular induzida por zymosan (ZY) em Joelho de ratos tratados com paclitaxel (PCX). Atorvastatina nas doses de 3, 10, 30mg/kg foi administrada por via oral durante 3 dias consecutivos. No terceiro dia, após 2 horas da dose diária de atorvastatina os ratos receberam ZY (250µg/animal) administrado por via intrarticular e 3 horas depois foram tratados via intraperitoneal com PCX (8mg/kg). A intensidade da incapacitação articular foi medida antes (tempo zero) e a cada hora até a 4ª hora após a administração do estímulo nociceptivo. As colunas representam a média ± EPM do tempo de suspensão da pata realizada na 3ª hora (pico da incapacitação) nos 6 animais de cada grupo. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação aos respectivos grupos controle (***) $p < 0,001$; ### $p < 0,001$: Bonferroni/ANOVA).

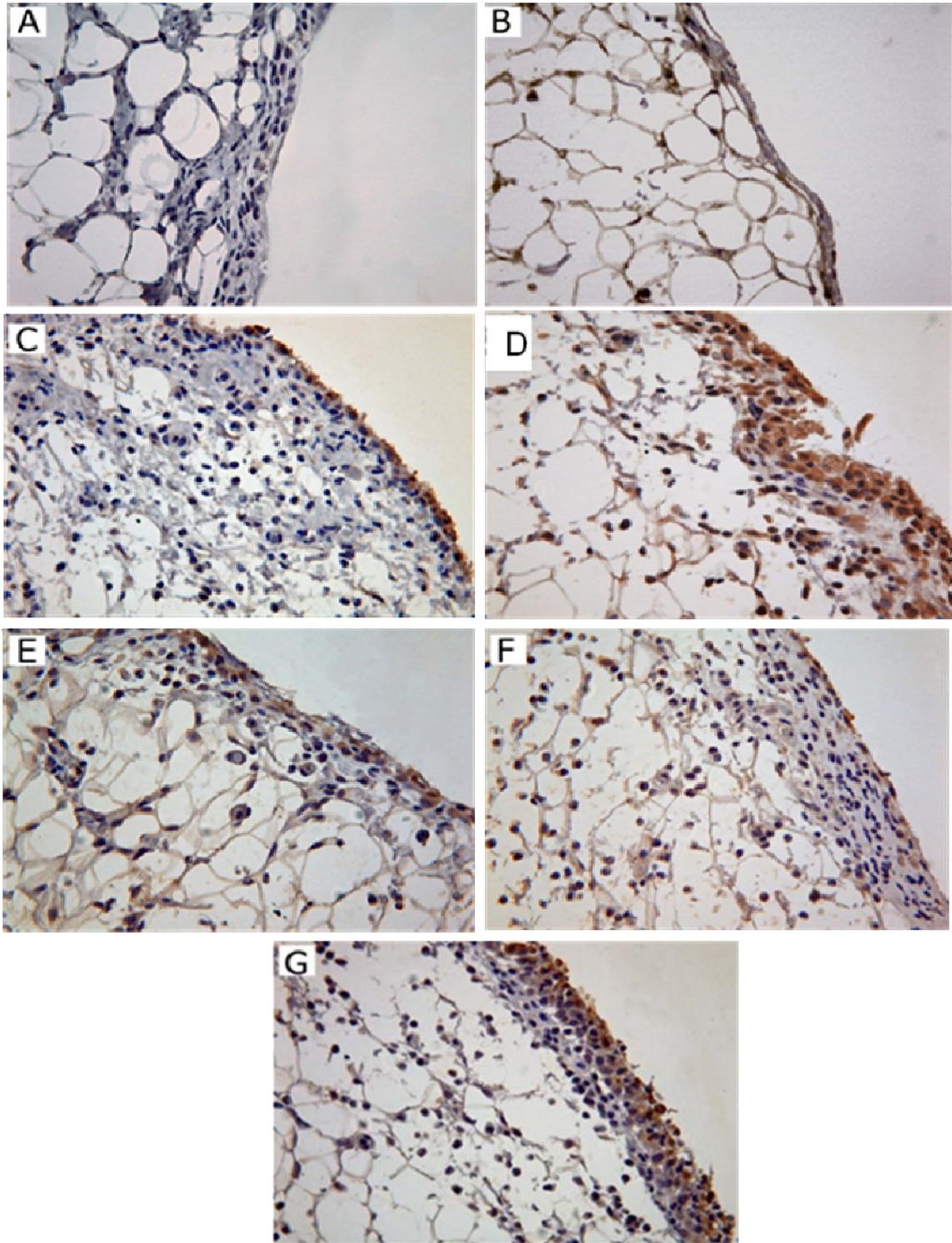


Figura 13. Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica do fator de necrose tumoral (TNF) no tecido sinovial de joelho de ratos submetidos à artrite induzida por zymosan (ZY) e paclitaxel (PCX), e pré-tratados com atorvastatina (ATV). Os animais foram pré-tratados com salina ou ATV (3, 10, 30mg/kg; VO) por 3 dias consecutivos. No 3º dia receberam injeção intrarticular de uma subdose de ZY (250µg/animal) e 2 horas depois do pré-tratamento receberam injeção intraperitoneal de PCX (8mg/kg). As sinóvias foram retiradas após 3 horas da injeção de ZY para detecção de TNF por imunohistoquímica (aumento de 400X). Controle negativo, sinóvia submetida à artrite por ZY e PCX na ausência do anticorpo primário anti-TNF (A); Sinóvia de um animal tratado com salina mostrando ausência de marcação para TNF (B); sinóvia de animal estimulada com veículo e ZY, mostrando moderada marcação para TNF (C); sinóvia de animal estimulada com ZY e PCX com marcação intensa (D); sinóvia de animal estimulada com ZY e PCX, e pré-tratado com doses crescentes de ATV 3mg/kg (E), 10mg/kg (F) e de 30mg/kg (G) mostrando acentuada redução da marcação para TNF (F).

3.11 Efeito do pré-tratamento com atorvastatina (ATV) na produção de interleucina 1 β (IL-1 β) por células da membrana sinovial de joelhos de ratos tratados com paclitaxel e submetidos à artrite experimental por zymosan, demonstrado por reação de imunohistoquímica

Atorvastatina foi administrada nas três doses que demonstraram antinocicepção no teste de incapacitação articular (3, 10, 30mg/kg), por via oral durante três dias consecutivos. No terceiro dia ATV foi administrada previamente ao zymosan (250 μ g/animal) e ao paclitaxel (8mg/kg). Os protocolos de tratamento e indução foram os mesmos utilizados na artrite experimental. Foi observado que paclitaxel induziu a produção de IL-1 β por células residentes da membrana sinovial demonstrado por uma intensa marcação por imunohistoquímica (Figura 14, painel D). O pré-tratamento com ATV diminuiu visivelmente a marcação por imunohistoquímica nas três doses (Figura 14, painel E, F, G).

3.12 Efeito do pré-tratamento com atorvastatina (ATV) na expressão de receptores Toll tipo 4 (TLR-4) na membrana sinovial de joelhos de ratos tratados com paclitaxel e submetidos à artrite experimental por zymosan, demonstrado por reação de imunohistoquímica

Atorvastatina foi administrada nas três doses que demonstraram antinocicepção no teste de incapacitação articular (3, 10, 30mg/kg), por via oral durante três dias consecutivos. No terceiro dia ATV foi administrada previamente ao zymosan (250 μ g/animal) e ao paclitaxel (8mg/kg). Os protocolos de tratamento e indução foram os mesmos utilizados na artrite experimental. Foi observado que paclitaxel induziu a expressão de TLR-4 na membrana sinovial demonstrado por uma intensa marcação por imunohistoquímica (Figura 15, painel D). O pré-tratamento com ATV diminuiu visivelmente a marcação por imunohistoquímica nas três doses (Figura 15, painel E, F, G).

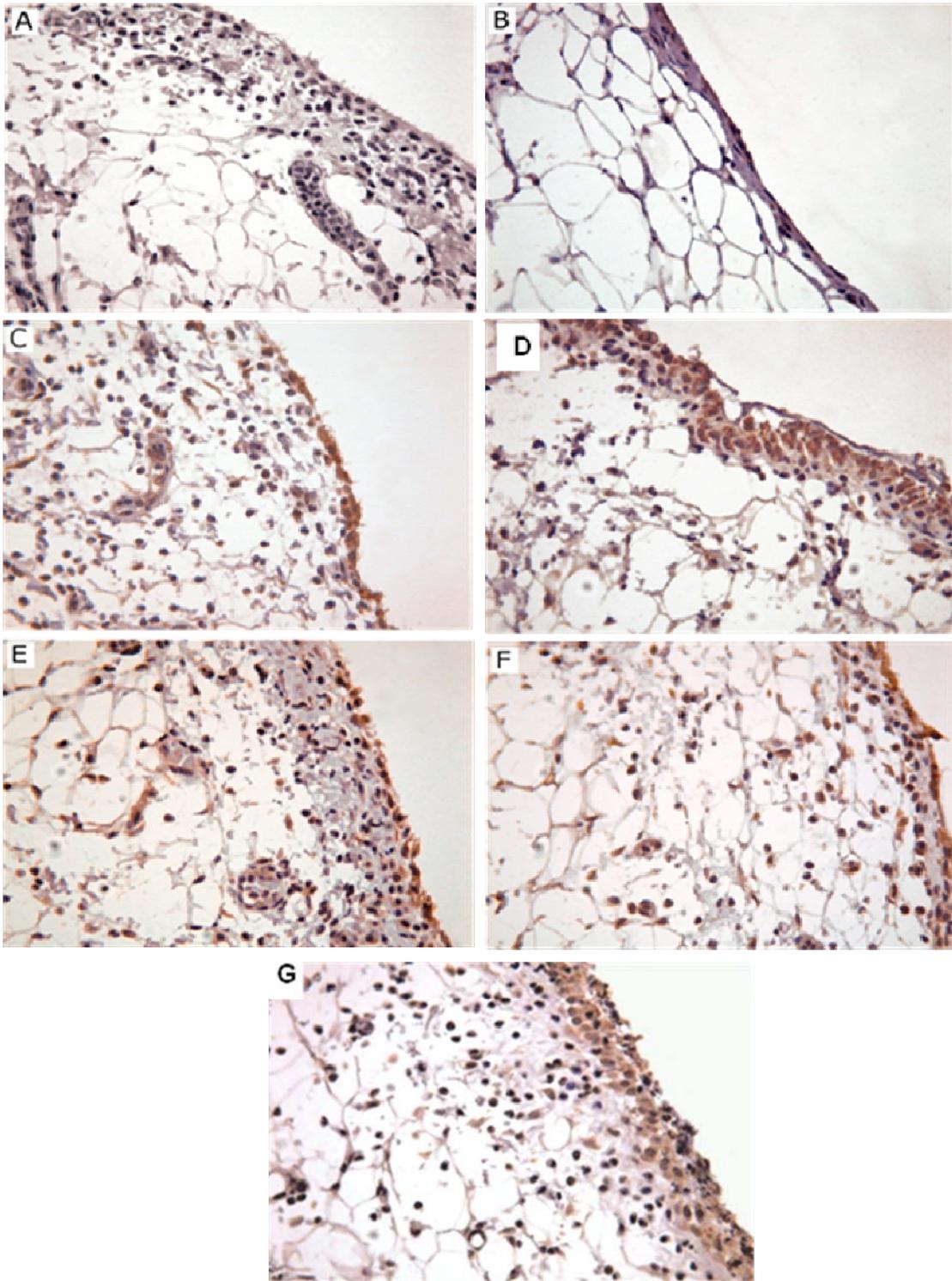


Figura 14. Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica da Interleucina-1 beta (IL-1 β) no tecido sinovial de joelho de ratos submetidos à artrite induzida por zymosan (ZY) e paclitaxel (PCX), e pré-tratados com atorvastatina (ATV). Os animais foram pré-tratados com salina ou ATV (3, 10, 30mg/kg; VO) por 3 dias consecutivos. No 3º dia receberam injeção intrarticular de uma subdose de ZY (250 μ g/animal) e 2 horas depois do pré-tratamento receberam injeção intraperitoneal de PCX (8mg/kg). As sinóvias foram retiradas após 3 horas da injeção de ZY para detecção de IL-1 β por imunohistoquímica (aumento de 400X). Controle negativo, sinóvia submetida à artrite por ZY e PCX na ausência do anticorpo primário anti-IL-1 (A); Sinóvia de um animal tratado com salina mostrando ausência de marcação para IL-1 (B); sinóvia de animal estimulada com veículo e ZY, mostrando moderada marcação para IL-1 (C); sinóvia de animal estimulada com ZY e PCX com marcação intensa (D); sinóvia de animal estimulada com ZY e PCX, e pré-tratado com doses crescentes de ATV 3mg/kg (E), 10mg/kg (F) e de 30mg/kg (G) mostrando acentuada redução da marcação para IL-1.

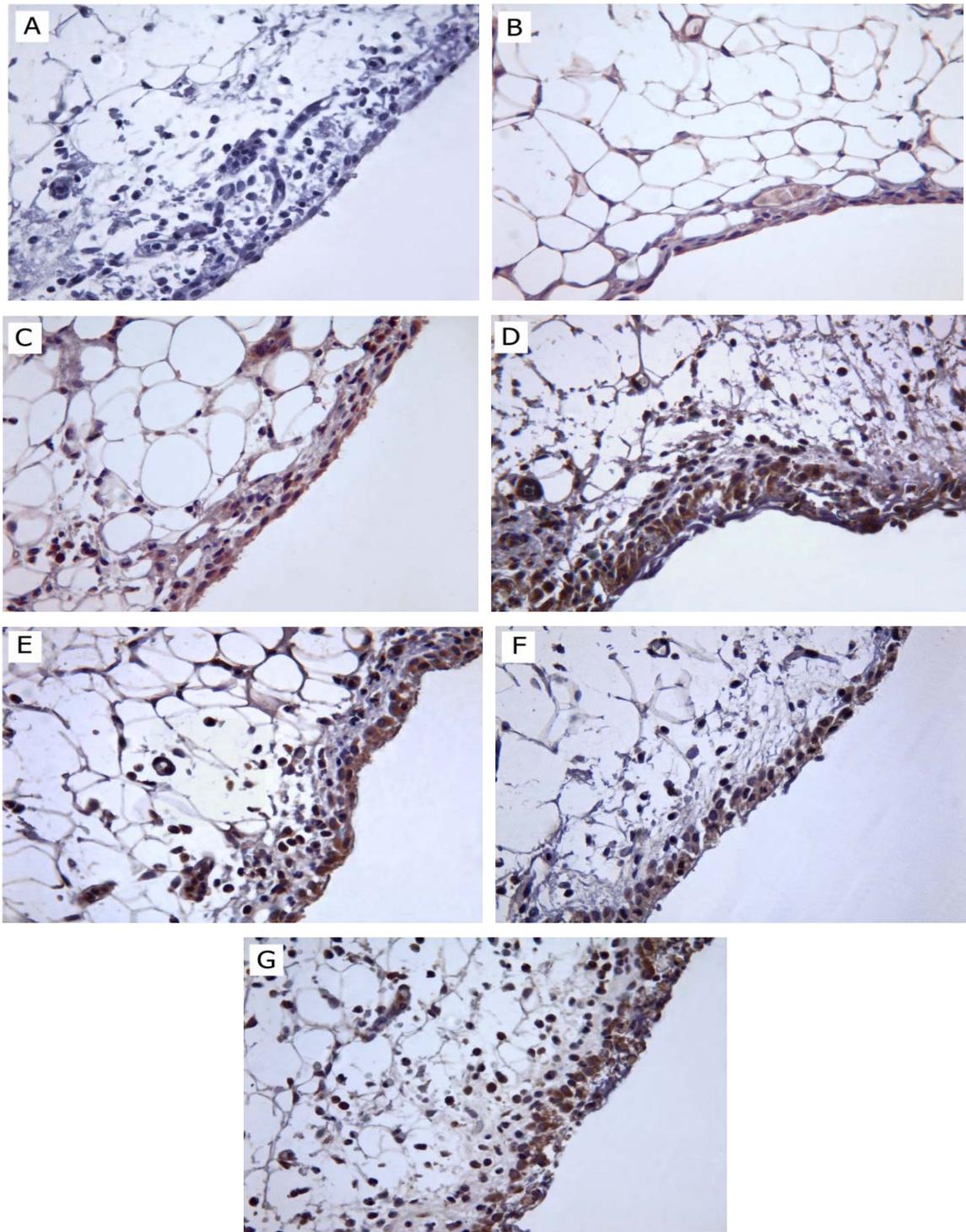


Figura 15. Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica do receptor Toll tipo 4 (TLR-4) no tecido sinovial de joelho de ratos submetidos à artrite induzida por zymosan (ZY) e paclitaxel (PCX), e pré-tratados com atorvastatina (ATV). Os animais foram pré-tratados com salina ou ATV (3, 10, 30mg/kg; VO) por 3 dias consecutivos. No 3º dia receberam injeção intrarticular de ZY (250µg/animal) e 2 horas depois do pré-tratamento receberam injeção intraperitoneal de PCX (8mg/kg). As sinóvias foram retiradas após 3 horas da injeção de ZY para detecção de receptor Toll-4 por imunohistoquímica (aumento de 400X). Controle negativo, sinóvia submetida à artrite por ZY e PCX na ausência do anticorpo primário anti-TLR-4 (A); Sinóvia de um animal tratado com salina mostrando ausência de marcação para IL-1 (B); sinóvia de animal estimulada com veículo e ZY, mostrando moderada marcação para TLR-4 (C); sinóvia de animal estimulada com ZY e PCX com marcação intensa (D); sinóvia de animal estimulada com ZY e PCX, e pré-tratado com doses crescentes de ATV 3mg/kg (E), 10mg/kg (F) e de 30mg/kg (G) mostrando acentuada redução da marcação para TLR-4.

3.13 Efeito do pré-tratamento com atorvastatina sobre a liberação de citocinas (TNF) para cavidade articular de joelho de ratos tratados com paclitaxel e submetidos à artrite experimental por zymosan

A administração por via oral durante três dias consecutivos de atorvastatina nas doses que demonstraram antinocicepção (3, 10, 30mg/kg) no teste de incapacitação articular, foi capaz de inibir de maneira estatisticamente significativa em 32,3%, 17,1% e 37,2% respectivamente ($p < 0,001$) a liberação de TNF para a cavidade articular de joelho de rato no terceiro dia de pré-tratamento. Os protocolos de tratamento e indução foram os mesmos utilizados na artrite experimental e a inibição da liberação de TNF pelas três doses de ATV foi constatada pela dosagem da mesma no sobrenadante do fluido coletado através da lavagem da cavidade articular de juntas estimuladas com zymosan e paclitaxel. Para tal utilizou-se imunoenaios específicos para as citocinas, como descrito anteriormente (Figura 16).

3.14 Efeito do pré-tratamento com atorvastatina sobre a liberação de citocinas (IL-1) para cavidade articular de joelho de ratos tratados com paclitaxel e submetidos à artrite experimental por zymosan

A administração por via oral durante três dias consecutivos de atorvastatina nas doses que demonstraram antinocicepção (3, 10, 30mg/kg) no teste de incapacitação articular, não foi capaz, em nenhuma das três doses, de inibir a liberação de IL-1 β para a cavidade articular de joelho de rato no terceiro dia de pré-tratamento, que foi constatada pela dosagem da mesma no sobrenadante do fluido coletado através da lavagem da cavidade articular de juntas estimuladas com zymosan e paclitaxel (Figura 17).

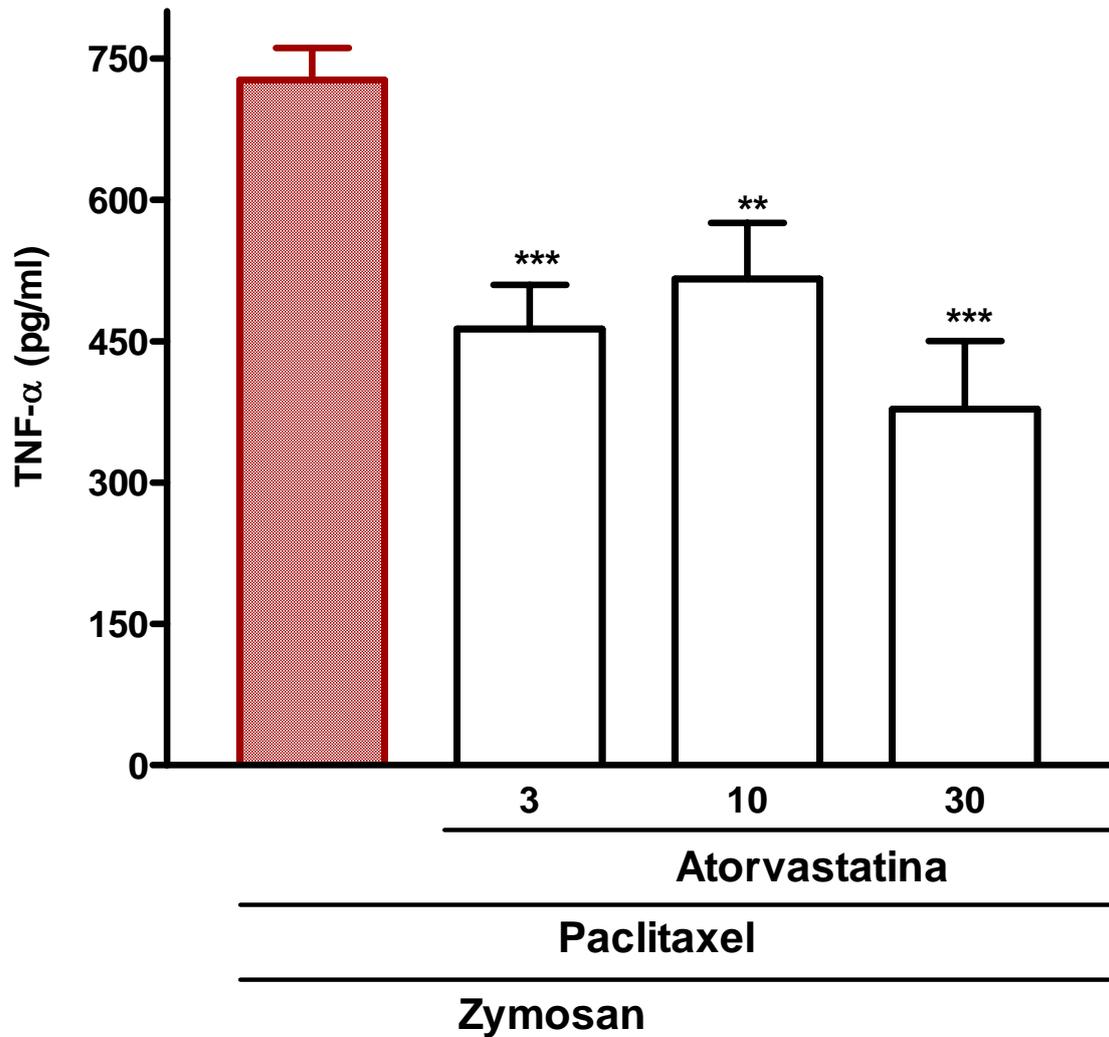


Figura 16. Efeito do pré-tratamento com atorvastatina (ATV) sobre a liberação do fator de necrose tumoral (TNF) na cavidade articular de joelho de ratos estimulados com zymosan (ZY) e paclitaxel (PCX). Atorvastatina nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, ao dia, foi administrada por via oral durante 3 dias consecutivos. No terceiro dia, após 2 horas da dose diária de atorvastatina os ratos receberam ZY (250 μ g/animal) por via intrarticular e em seguida foram tratados com salina ou PCX (8mg/kg) por via intraperitoneal, a semelhança do protocolo utilizado para o modelo de incapacitação articular. Três horas após a injeção do ZY a cavidade articular foi lavada e do sobrenadante obtido, foram dosados os níveis de TNF por espectrofotometria (ELISA). As colunas representam a média \pm EPM da quantidade de TNF dos seis animais de cada grupo. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação aos respectivos grupos controle (**p<0,01; ***p<0,001: Bonferroni/ANOVA).

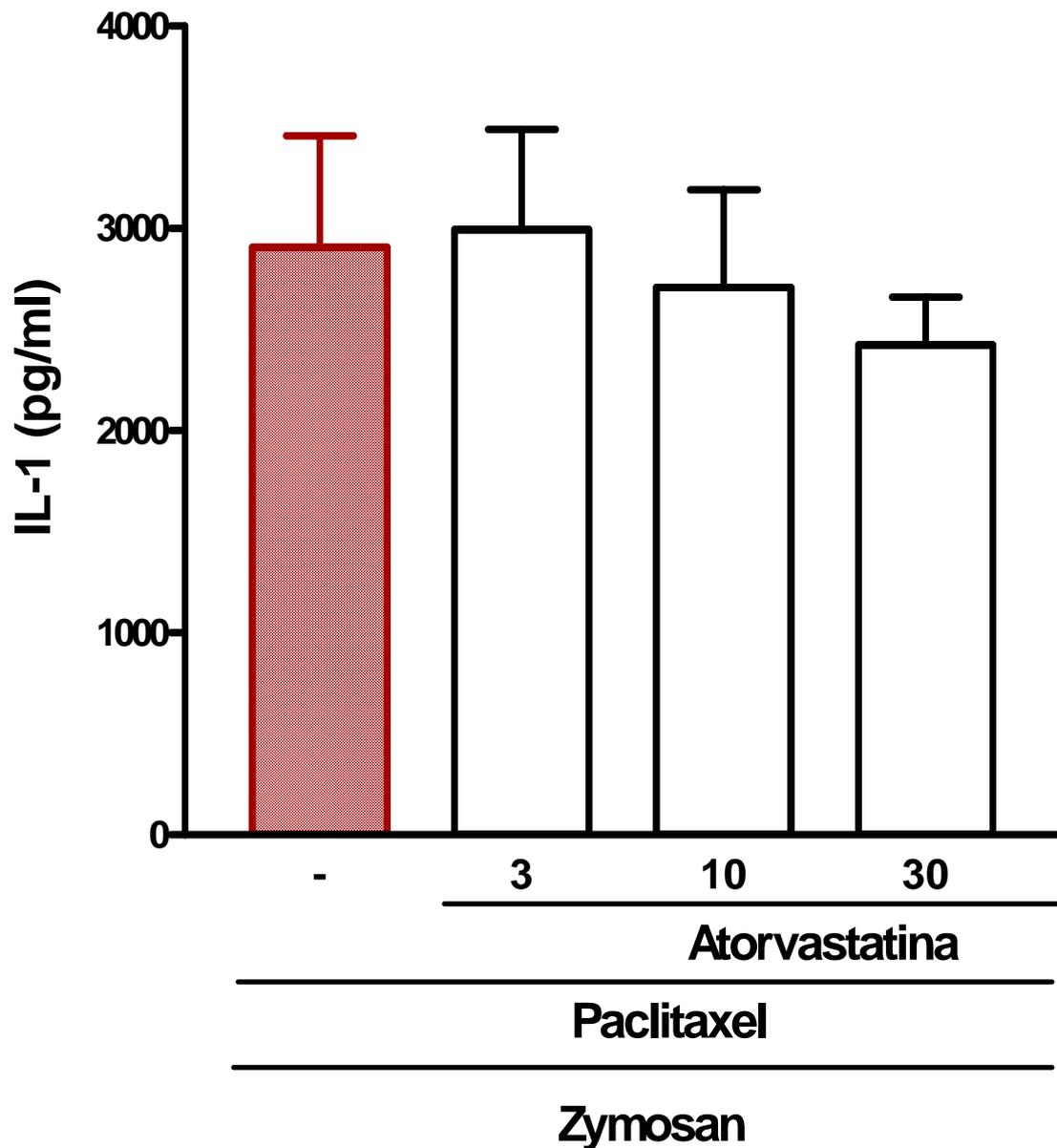


Figura 17. Efeito do pré-tratamento com atorvastatina (ATV) sobre a liberação de interleucina 1 β (IL-1 β) na cavidade articular de joelho de ratos estimulados com zymosan (ZY) e paclitaxel (PCX). Atorvastatina nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, ao dia, foi administrada por via oral durante 3 dias consecutivos. No terceiro dia, após 2 horas da dose diária de atorvastatina os ratos receberam ZY (250 μ g/animal) por via intrarticular e em seguida foram tratados com salina ou PCX (8mg/kg) por via intraperitoneal, a semelhança do protocolo utilizado para o modelo de incapacitação articular. Três horas após a injeção do ZY a cavidade articular foi lavada e do sobrenadante obtido, foram dosados os níveis de (IL-1 β) por espectrofotometria (ELISA). As colunas representam a média \pm EPM da quantidade de (IL-1 β) dos seis animais de cada grupo (Bonferroni/ANOVA).

Discussão

O objetivo do presente trabalho foi investigar a participação dos receptores Toll tipo 4 (TLR-4) e do fator de necrose tumoral (TNF- α) na gênese do efeito potencializador hipernociceptivo do PCX na artrite experimental induzida por zymosan em ratos. Adicionalmente, o efeito modulador da ATV e seu provável mecanismo sobre a resposta potencializadora do PCX na artrite experimental induzida por zymosan também foi avaliado.

Estudos clínicos e experimentais apontam que o uso do PCX, um dos taxanes antimitóticos disponíveis no mercado, associa-se a uma considerável incidência de sintomas músculos-esqueléticos “tipo influenza”, onde se destacam as artralguas e mialgias de caráter incapacitantes, que comprometem a qualidade de vida e limitam o tempo de tratamento antitumoral. Isto chega a acometer até 57% dos pacientes oncológicos em tratamento com este antineoplásico (CONNELLY et al., 1996; ROWINSKY et al., 1995; DOUILLARD et al., 2001; VASEY, 2002).

Durante o mestrado, na nossa investigação inicial desses eventos de dor inflamatória associadas ao PCX, propusemos um modelo experimental onde o PCX na dose de 8mg/kg, induzia uma amplificação da atividade hipernociceptiva do zymosan em dois modelos experimentais de dor inflamatória. No modelo de contorções abdominais em camundongos, foi demonstrado que o PCX possui uma atividade amplificadora sobre a hipernocicepção induzida por zymosan de 183% em relação ao grupo controle. A atividade potencializadora do PCX sobre a hipernocicepção induzida por zymosan também foi demonstrada no teste de incapacitação articular, utilizando uma subdose de zymosan, permitindo uma melhor visualização do fenômeno de amplificação da resposta.

Pela modulação farmacológica com inibidores de citocinas, inibidores de ciclooxigenase e bloqueador simpático, foi sugerido que no mecanismo de ação envolvido no efeito potencializador hipernociceptivo do PCX, há a participação de citocinas hiperalgésicas, provavelmente o TNF- α liberado por células residentes, visto que talidomida, pentoxifilina, dexametasona, indometacina, celecoxibe e atenolol inibiram de forma significativa e dose-dependente a potencialização (CARDOSO, 2003).

É sabido que a dor inflamatória é caracterizada pela sensibilização dos neurônios nociceptivos (hipernocicepção), resultante da ação dos mediadores inflamatórios por células não neuronais no local da injúria.

Historicamente, foi demonstrado que a liberação dos mediadores finais da hipernocicepção inflamatória, atuantes diretamente nos nociceptores, como as prostaglandinas (FERREIRA et al., 1978) e aminas simpáticas (LEVINE, 1992; NAKAMURA & FERREIRA, 1987) é precedida, em ratos, pela liberação de uma cascata de citocinas.

Demonstrou-se que o TNF- α liberado pela bradicinina é a citocina chave nesta cascata (CUNHA et al., 1992; FERREIRA 1993), atuando via liberação de IL-1 β induzindo a produção de prostaglandinas (FREIRE, 1988). Por outro lado, o TNF- α induz a liberação de CXCL-8/CINC-1 as quais por sua vez, liberam aminas simpáticas (CUNHA et al., 1991). As mesmas evidências foram demonstradas por outros autores no modelo de contorções abdominais em camundongos (DUARTE et al., 1988; RIBEIRO, 2000a).

A generalização destes resultados, no entanto, depende da validação em outros modelos de dor, procurando-se demonstrar a presença da citocina envolvida (TNF- α nos tecidos ou mesmos em líquidos orgânicos ou lavados, onde o estímulo foi administrado.

Portanto, na presente investigação, inicialmente validamos nossos resultados anteriores no que se refere à modulação farmacológica da artrite experimental avaliada pelo teste de incapacitação articular.

Neste sentido, foi demonstrado que o PCX potencializa agudamente a hipernocicepção inflamatória induzida com uma subdose de zymosan no teste de incapacitação articular em ratos, e que este efeito envolve TNF- α demonstrado pela sua detecção significativamente aumentada no lavado articular desses animais. Da mesma forma, foi demonstrado, através de estudo imunohistoquímico, um aumento relevante da expressão de TNF- α pelas células do tecido sinovial de joelhos de ratos igualmente estimulados. Tais efeitos foram inibidos pelo pré-tratamento dos animais com talidomida. Sabe-se que o efeito inibitório significativo da talidomida é relacionado à sua capacidade de inibir a produção de TNF- α , aumentando a degradação do seu RNAm (MOREIRA., 1993; RIBEIRO et al., 2000b; VALE et al., 2006).

Secundariamente, demonstrou-se o envolvimento de receptores Toll, particularmente de TLR-4, na gênese desta produção aumentada de TNF- α pelas células sinoviais, através da inibição significativa da atividade potencializadora do PCX em animais pré-tratados com ATV, um provável antagonista de TLR-4. Tal inibição foi associada à diminuição significativa de TNF- α no lavado articular e visível diminuição da marcação de TNF- α no tecido sinovial destes animais. A ATV é uma representante do grupo das estatinas, classe de drogas bem conhecidas por sua utilização na prevenção de doenças coronárias primárias e secundárias, que recentemente vem chamando atenção pelo seu potente efeito antiinflamatório nas doenças cardiovasculares.

Dessa forma, passamos na sequência a descrever nossas observações, resultados obtidos e o seu significado diante da carência dos estudos já publicados, visto que a nossa demonstração é inédita.

Poucos agentes antineoplásicos possuem uma ampla aplicação clínica como o PCX, que possui atividade significativa em uma variedade de tumores sólidos, como o câncer de ovário, câncer de mama avançado, câncer de pulmão de pequenas células e não pequenas, câncer de cabeça e pescoço, de próstata, de bexiga e de esôfago, bem como o sarcoma de Kaposi relacionado com a AIDS (KINGSTON et al., 2005). Além disto, exibe características farmacológicas favoráveis e atrativas quando comparados a outros antineoplásicos. Primeiro, porque se ligam, principalmente, a β tubulina, modificando a dinâmica de equilíbrio entre os dímeros de tubulina e os microtúbulos no sentido da polimerização e estabilizando-os contra a despolimerização. Essa estabilização excessiva inibe a reorganização da malha de microtúbulos, essencial ao desempenho das funções mitóticas. Isso acarreta parada da mitose e apoptose “in vitro” mesmo em baixas concentrações (JORDAN et al., 1993; CAPLOW et al., 1994).

Segundo, o PCX age independentemente da via p53 supressor em ensaios experimentais (WOODS et al., 1995; O’CONNOR et al., 1997; DEBERNARDIS et al., 1997; FAN et al., 1998; VIKHANSKAYA et al., 1998) e clínicos (KING et al., 2000; GADDUCCI et al., 2000; LAFRAMBOISE et al., 2000; LAVARINO et al., 2000).

Terceiro, PCX induz a expressão do RNAm TNF- α (DING et al., 1990; BODGAN et al., 1992; 1993; BURKHART et al., 1994; HWANG e DING, 1995; KIRIKAE et al., 1996; 1998, 2000), de interleucinas como a IL-1 β , CXCL-8, e IL-6 (BODGAN et al., 1992; LEE et al., 1996; WHITE et al., 1998; WATSON et al., 1998; COLLINS et al., 2000) e de enzimas como iNOS e COX-2 que geram mediadores inflamatórios e álgicos a partir de macrófagos e monócitos humanos (WHITE et al., 1998). Adicionalmente, ainda induz genes que codificam fatores de transcrição como NF- κ B (MOOS et al., 1998).

Com intuito de investigar os mecanismos envolvidos no efeito potencializador do PCX na artrite experimental já demonstrada durante o mestrado, escolhemos o teste de incapacitação articular em ratos, teste tradicionalmente utilizado no nosso laboratório.

A incapacitação articular em joelho de rato é um modelo experimental fácil e objetivo que permite o estudo de drogas analgésicas periféricas e de efeito central (TONUSSI & FERREIRA, 1992; MAGALHÃES et al., 1997; VIANA et al., 1998; ROCHA et al., 1999). Originalmente, o modelo de incapacitação articular em joelho de ratos foi descrito por

Bustamante (1982) e posteriormente, modificado por TONUSSI & FERREIRA (1992), que passaram a usar a carragenina como estímulo e agregaram ao modelo um sistema automático de aquisição de dados e conseguindo assim, eliminar a subjetividade do observador, frequentemente apontado como importante fator de erros na análise dos dados.

O modelo foi ainda modificado em nosso laboratório, inserindo de forma pioneira, o zymosan como estímulo inflamatório no lugar da carragenina (MAGALHÃES et al., 1997; VIANA et al., 1998; ROCHA et al., 1999). De forma complementar, foi estudado por alguns pesquisadores do laboratório o efeito do zymosan sobre parâmetros inflamatórios, como aumento de permeabilidade vascular, influxo neutrofílico, análise histopatológica e dosagem de mediadores inflamatórios (ROCHA et al., 1999; VALE et al., 2004).

Dados do nosso laboratório mostraram que a incapacitação articular induzida por zymosan (1mg/animal) depende do sítio de injeção do estímulo, levando a sensibilização de nociceptores localizados nos tecidos periarticulares e que a presença de edema sinovial ou de derrame articular, *per se*, não parecem ser responsáveis pela hipernocicepção neste modelo (ROCHA et al., 1999). Zymosan induz extravasamento de proteínas plasmáticas e infiltrado de células inflamatórias, resultando numa cascata de eventos, incluindo ativação do sistema do complemento, degranulação de mastócitos e geração dos produtos do metabolismo do ácido araquidônico (DOHERTY et al., 1985; RAO et al., 1994).

Esses achados estão de acordo com a literatura, onde já foi demonstrado que a membrana sinovial possui poucos nociceptores e que a maioria deles participa da função vascular autonômica, ao contrário da inervação da cápsula fibrosa, ligamento articular e periósteo, estruturas ricamente inervadas por fibras simpáticas e somáticas (HASSELBACHER et al., 1981). Corroborando com estas observações, foi sugerido por alguns autores que, além da presença de mediadores liberados no local, a estrutura periarticular é relevante, tornando o local da injeção do estímulo crucial para o desenvolvimento da incapacitação articular (KENNEDY et al., 1982; GRONBLAD et al., 1985).

Neste modelo, a incapacitação articular (hipernocicepção) ocorre de maneira significativa e dose-dependente com pico entre a 3ª e 4ª hora da artrite (VIANA, 1998; ROCHA, 1999) e está associada diretamente à migração de neutrófilos a cavidade articular que é máxima na sexta hora após a injeção de estímulo. Esse fato foi corroborado pela abolição da incapacitação quando se bloqueou a migração de neutrófilos, quer usando agentes inibidores de quimiotaxia dessas células, como inibidor da síntese de leucotrienos MK866,

quer induzindo neutropenia nos animais através da administração de anticorpo antineutrófilos (ROCHA et al., 2004).

Outra vantagem na utilização do modelo é que, na artrite experimental por zymosan, onde ele é injetado na cavidade articular, já foi demonstrado por dosagem de citocina que há produção local de TNF- α , atingindo concentrações máximas em 1 a 2 horas após a indução (PETTIPHER & SALTER, 1996).

De fato, o aumento na produção de TNF- α vem sendo exaustivamente documentado em trabalhos que destacam o seu envolvimento na mediação da hipernocicepção inflamatória experimental. Vários autores já demonstraram o papel fundamental do TNF- α no desencadeamento de uma cascata de citocinas, culminando com a ativação dos dois componentes da dor inflamatória: eicosanóide e simpatomimético (CUNHA et al., 1992; THOMAZZI, 1996; DUARTE et al., 1998).

O TNF- α é sintetizado como um pró-hormônio que contém 233 resíduos de aminoácidos e seu gene está localizado no cromossomo 6 (MULLER et al., 1987). A análise da sua estrutura sob forma cristalizada ou em solução indica que é uma proteína homotrimérica que se dissocia lentamente e existe em concentrações picomolares (SMITH, 1987; CORTI et al., 1992). Em baixas concentrações (10^{-10} M), o TNF- α atua diretamente sobre os tecidos ou células alvo como regulador da função de leucócitos e células endoteliais, influenciando os eventos da resposta inflamatória aguda e o reparo tecidual, entre eles: ativação de neutrófilos, produção de IL-1 β e CXCL-8 por células endoteliais e por macrófagos, aumento da citotoxicidade para certos patógenos e aumento da atividade fagocítica (KLEBANOFF et al., 1986; TSUJIMOTO et al., 1986) e da quimiotaxia de neutrófilos e monócitos; estimulação da produção de PGE₂ e colagenase por células sinoviais e condrócitos; proliferação de fibroblastos; aumento da reabsorção óssea por osteoclastos; diminuição da síntese óssea por osteoblastos; indução de proteínas da fase aguda no fígado; produção de GM-CSF e G-CSF por células endoteliais (BEUTLER & CERAMI, 1988; LARRICK & KUNKEL, 1988).

A biossíntese de TNF- α é suprimida por alguns fatores, entre eles PGE-2, AMPc, ativadores de proteína-quinase C, dexametasona, pentoxifilina (VALE et al., 2004) ciclosporina (LEUDKE & CERAMI, 1990) e talidomida (VALE et al., 2006). Já o LPS, vírus sendai, células tumorais, mycoplasma ou BCG, IFN- γ , IL-1, enterotoxinas, C5a, vírus, antígenos fúngicos (zymosan) ou parasitários e o próprio TNF- α são considerados estímulos para produção de TNF- α por monócitos/macrófagos residentes.

Em todas as células somáticas humanas, exceto nos eritrócitos, existem duas formas de receptores para TNF- α (TNFRI e TNFRII), que diferem em tamanho e afinidade de ligação, estando o TNFRI relacionado, predominantemente, como mediador da citotoxicidade celular (TARTAGLIA et al., 1991) e toxicidade por LPS (PFEFFER, 1993). Como potente hormônio, o TNF- α possui uma atividade biológica máxima com a ocupação de pequeno número de receptores, em torno de 5%. Depois de ligado, o TNF- α é internalizado, mas o sinal de transdução pode ocorrer na ausência de internalização ou após a ligação aos receptores de um agonista (ENGERLMANN et al., 1990).

Diante da complexidade do processo doloroso envolvendo citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , o qual, nesta última década tem sido demonstrado participar ativamente do início e da manutenção das dores inflamatórias, escolhemos o modelo de incapacitação articular induzida por zymosan, por parecer-nos mais adequado para investigar o que ocorre com os pacientes que experimentam artralguas e mialgias durante o tratamento quimioterápico com o PCX.

Neste estudo, a artrite foi induzida em ratos Wistar, seguindo-se o modelo anteriormente proposto (VALE et al., 2003; CARDOSO, 2003). Interessante notar que a dose de zymosan capaz de promover uma incapacitação articular verdadeira com pico nociceptivo na 3ª e 4ª hora após a injeção é de 1 mg/articulação (ROCHA et al., 2002; VALE et al., 2003).

Na presente investigação farmacológica, utilizamos $\frac{1}{4}$ dessa dose (250 μ g/articulação) não promovendo uma incapacitação real, entretanto quando o PCX é administrado por via sistêmica, dose de 8 mg/kg, o animal desenvolve uma incapacitação verdadeira tão intensa quanto se tivesse recebido a dose de 1mg de zymosan na articulação.

Nossos resultados demonstraram que o efeito potencializador do PCX na incapacitação articular ocorreu principalmente na quarta hora após a injeção do estímulo (zymosan) e na terceira hora após o tratamento sistêmico, já que a droga é administrada somente na primeira hora de medição do TSP, para coincidir o pico da incapacitação com a maior expressão de TNF- α conforme demonstrado em trabalhos anteriores (BOGDAN & DING, 1992).

Demonstramos ainda, que tal amplificação foi inibida pelo pré-tratamento com talidomida, pentoxifilina, dexametasona, indometacina e celecoxibe. Os resultados dessa modulação ratificam os resultados demonstrados anteriormente por nós, reforçando as evidências do envolvimento do TNF- α na gênese do efeito potencializador do PCX neste modelo, já que talidomida leva a inibição da produção de TNF- α por aumentar a degradação

do seu RNAm (MOREIRA et al., 1993; RIBEIRO et al., 2000b; VALE et al., 2006) e da pentoxifilina de inibir a transcrição de seu gene (SCHMIDT-CHOUDHURY et al., 1996; VALE et al., 2004).

A inibição do efeito pela indometacina e celecoxibe pode ser explicada pela habilidade dessas drogas de inibirem a síntese de prostaglandina por bloquearem a COX-2, ou ainda via inibição da síntese e liberação de TNF- α , especificamente pela dexametasona (BARNES & ADCOCK, 1993).

Com base nestes resultados e sabendo-se que a cavidade articular permite a avaliação de parâmetros inflamatórios através da coleta do exsudato articular, para análise da migração leucocitária e dosagem de mediadores liberados diretamente no local da inflamação, foi coletado lavado articular de joelhos de ratos tratados com PCX e zymosan que receberam talidomida como pré-tratamento, para dosagem de TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias.

Apesar da incapacitação articular está associada à migração leucocitária (ROCHA et al., 2004), no presente estudo, não se detectou um aumento significativo destas células no exsudato articular (dado não mostrado) de joelho de ratos estimulados com PCX e zymosan, talvez porque o fenômeno investigado se estabelece agudamente (2h) e o pico da migração só ocorre após 6 horas do estímulo. Por outro lado, ainda há muitas controvérsias na literatura relacionadas a este assunto. Segundo Cunha e Verri (2006), o envolvimento dos neutrófilos na gênese da hipernocicepção depende do tipo e intensidade do estímulo e dos diferentes estágios da resposta inflamatória.

Talidomida na dose de 45mg/kg foi utilizada para avaliar a produção de TNF- α e de outras citocinas envolvidas na hipernocicepção inflamatória na cavidade articular, dentre elas: IL-1, IL-6 e CINC-1. Para isso, os animais foram pré-tratados com talidomida e foi induzida artrite com PCX e zymosan, seguindo o mesmo protocolo visto para o teste de incapacitação articular. Nossos dados mostraram que PCX foi capaz de induzir a liberação de TNF- α e IL-1 β , mas não, a liberação de IL-6 e CINC-1 no lavado articular e que talidomida inibe a produção de TNF- α de modo significativo, mas não, a das outras citocinas.

É registrado na literatura que as citocinas não são frequentemente estocadas nas células produtoras e, portanto, a síntese é requerida para serem secretadas e, uma vez liberadas, têm uma vida média curta que limita a sua atividade biológica (LITCHTMAN, 2007). Evidências anteriores já relacionavam a presença de IL-6 no líquido sinovial de portadores de artrite reumatóide e outras artrites inflamatórias não só com sua produção por

macrófagos e monócitos, mas destacavam a atuação dos sinoviócitos como fontes da sua produção adicional durante uma inflamação local (HOUSSIAU et al., 1988; WAAGE et al., 1989), porém, neste modelo, contrariamente, a sua presença não foi detectada.

Mais recentemente, alguns autores mostraram experimentalmente, que os níveis de IL-6 no plasma apresentavam-se elevados a partir da terceira hora após injeção do estímulo inflamatório (carragenina) em pata de ratos, enquanto de IL-1 β e do TNF- α não foram detectados na mesma hora. Desta forma, os autores sugerem que IL-6 participa da hipernocicepção inflamatória só como mediadora da transmissão do sinal inflamatório da periferia para o SNC (OKA et al., 2007).

Vários estudos vêm sendo publicados explorando as propriedades farmacológicas da talidomida. Estas propriedades incluem a inibição de liberação de TNF- α , CXCL-8, IL-6, a inibição da COX-2, o aumento de produção das interleucinas IL-10, IL-4, IL-5 e IL-12 (VEERAINDAR, 2007). Recentemente, seu efeito anti-TNF foi demonstrado estrategicamente, na modulação da resposta hipernociceptiva induzida por formalina administrada na região orofacial de ratos (PEREIRA et al., 2008). A ação sobre esses fatores participantes da gênese da dor inflamatória tem sido fortemente explorada, no sentido da melhor utilização desse efeito antihipernociceptivo da droga.

A observação do papel central desempenhado pelas células residentes (sinoviócitos) na liberação de TNF- α que, por sua vez, ativariam os dois componentes da dor inflamatória, deflagrando a resposta amplificada associada ao PCX, foi por nos demonstrado por meio de estudo imunohistoquímico.

Ao avaliar a imunexpressão de TNF- α observamos uma intensa marcação na sinóvia retirada de animais tratados com PCX e estimulados com zymosan quando comparadas visualmente com o grupo pré-tratado com salina e veículo. A diminuição acentuada da marcação para TNF- α foi observada na sinóvia de animais pré-tratados com talidomida. Este dado somando aos demais sugere que TNF- α expresso no tecido sinovial é essencial para deflagrar a resposta amplificadora do PCX na hipernocicepção induzida por zymosan, já que o efeito antihipernociceptivo da talidomida no presente modelo está associado a sua atividade inibitória sobre a produção de citocinas, principalmente TNF- α (VALE et al., 2006).

Assim como no modelo de incapacitação articular em ratos, papel de TNF- α no modelo de contorções abdominais em camundongos já foi, anteriormente estudado. Neste modelo foi demonstrado que células residentes da cavidade peritoneal de camundongos

desempenham papel crucial no desenvolvimento da resposta hipernociceptiva do zymosan e que talidomida atenua significativamente esta resposta por inibir a produção de TNF- α (RIBEIRO et al., 2000b).

Como já discutido na introdução deste estudo, a presença de macrófagos e mastócitos residentes iniciam a resposta hipernociceptiva e a depleção destas células da cavidade peritoneal inibe o desenvolvimento da hipernocicepção. Tais células são capazes de produzir e liberar diversos mediadores, dentre estes citocinas, como o TNF- α (THOMAZZI, 1996) já descrito anteriormente como componente do sobrenadante de macrófagos estimulados com LPS (RIBEIRO et al., 1993, 1995), agindo como iniciador da cascata de mediadores responsáveis pela gênese da dor inflamatória.

A liberação de TNF- α e IL-1 β por células residentes peritoneais murinas estimuladas, “in vivo”, com zymosan já foi demonstrada pelo nosso grupo (VALE et al., 2003) por meio do bloqueio da hipernocicepção com anticorpos específicos para essas citocinas, constatado pela diminuição do número de contorções abdominais induzidas por zymosan (RIBEIRO et al., 2000a).

Diante das evidências acima registradas e os dados da literatura que descrevendo que PCX apresenta efeitos semelhantes ao LPS no que diz respeito à ativação de macrófagos (DING et al., 1992; BODGAN & DING, 1992; MANTHEY et al., 1993), procurou-se investigar a atividade do PCX sobre a produção de citocinas por células residentes na cavidade peritoneal de camundongos, já que, na cavidade articular de ratos, seria tecnicamente difícil a coleta.

Para isso, os camundongos foram estimulados “in vivo” com PCX e zymosan e as células foram colhidas e postas em cultura por 12 horas e, no sobrenadante da cultura foram dosados os níveis das citocinas TNF- α e KC por ensaio imunoenzimático. É importante salientar que as células residentes postas em cultura foram obtidas reproduzindo o protocolo utilizado para o tratamento e indução das contorções abdominais segundo o modelo descrito anteriormente e, só após tais procedimentos, as células foram para cultura. As citocinas não foram dosadas diretamente no sobrenadante do lavado peritoneal porque o “clearance” elevado da cavidade peritoneal não permite um acúmulo de níveis detectáveis pelo ensaio imunoenzimático.

Esse experimento não foi realizado em ratos e sim, em camundongos, devido à facilidade da retirada de células residentes da cavidade peritoneal e do cultivo dessas células em curto prazo. Em adição, a atividade potenciadora do PCX sobre as contorções abdominais

induzidas por zymosan foi inicialmente demonstrada em camundongos onde o estímulo foi injetado na cavidade peritoneal desses animais (CARDOSO, 2003).

Dessa forma, achamos que seria válido investigar se nesse modelo o PCX estaria induzindo um aumento da produção de TNF- α e se essa indução era importante para a sua atividade potencializadora sobre a nocicepção induzida por zymosan. Os dados mostraram que macrófagos obtidos de cavidades peritoneais de animais pré-tratados com zymosan e PCX quando em cultura apresentavam um aumento significativo da liberação de TNF- α quando comparado aos macrófagos de animais tratados com PCX, sem zymosan.

O PCX, portanto, neste modelo, exerceu uma atividade amplificadora sobre a liberação de TNF- α induzida por zymosan, observando-se um aumento significativo de 316,4% dos níveis desta citocina. O mesmo não foi observado com a dosagem dos níveis de KC no mesmo sobrenadante. Dessa forma observamos que o PCX por si só não altera os níveis de TNF- α produzido por células residentes. Na verdade, precisa haver uma indução inicial pelo zymosan, demonstrando uma interação entre PCX e zymosan nesse sentido.

Com intuito de reforçar nossos dados de que essa atividade amplificadora do PCX estaria ocorrendo por estimulação de células residentes e conseqüente liberação de substâncias algogênicas (principalmente o TNF), injetou-se o sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais residentes em animais “naive” por via intraperitoneal.

Foi observado o comportamento de contorções abdominais onde o maior número ocorreu em camundongos injetados com o sobrenadante de células estimuladas “in vivo” com zymosan e PCX. Sugerimos, com esse experimento e os anteriores, onde dosamos os níveis de citocinas que, possivelmente, o zymosan foi capaz de induzir contorções abdominais devido à produção e liberação, na cavidade peritoneal, de substâncias algogênicas, dentre elas o TNF- α e que o PCX aumenta acentuadamente essa produção, aumentando por sua vez, o número de contorções abdominais. Dados da literatura corroboram nossos achados indicando que, tanto PCX tem essa capacidade de induzir a síntese de TNF- α , como o TNF- α é importante na gênese da dor inflamatória (CUNHA et al., 1991, 1992; RIBEIRO et al., 2000a; SACHS et al., 2002; VALE et al., 2003).

Vários autores, há mais de uma década, vêm documentando e estudando uma neuropatia periférica sensorial incapacitante induzida pelo PCX, contudo esta costuma manifestarem-se tardiamente quando comparado ao aparecimento das artralguas e mialguas relacionadas ao PCX, além de ter sintomas diferentes (KAPLAN et al., 1993; ROWINSKY et al., 1993b; CHAUDHRY et al., 1994; HILKENS & VAN DEN BENT et al., 1997;

POLOMANO et al., 1998; PACE et al., HELSING et al., 1999; AUTHIER et al., 2000). Dessa forma, procuramos demonstrar que a manifestação nociceptiva observada no presente estudo não é de origem neuropática e sim, de origem inflamatória.

Com esse objetivo, procuramos utilizar um dos modelos normalmente usados para avaliar dor neuropática, o teste térmico de baixa temperatura. Como estímulo térmico, utilizamos uma placa aquecida a 45°C onde os animais foram colocados para registro do tempo de reação na placa quente. Utilizamos dose única e dose cumulativa, sendo realizado o teste durante 4 dias consecutivos.

Experimentalmente, já foi demonstrado por outros autores que a administração intraperitoneal de PCX na dose de 16mg/kg foi necessária para produzir diminuição da alodinia mecânica e térmica. Entretanto, doses acima de 32mg/kg, independente do esquema de administração, se dose única ou cumulativa, o PCX induziu neuropatia periférica em ratos, agora associada a alterações eletrofisiológicas e histológicas registradas entre o 7º e 21º dia após a última injeção do PCX. Os sinais neuropáticos observados após a injeção de PCX nos ratos, segundo os autores, foram bem correlatos com as desordens observadas nos pacientes em tratamento com a droga, como formigamento, “choque”, tremores, disestesias, alodinia térmica e mecânica, característica de dor neuropática frequentemente associadas à neuropatia sensorial periférica (AUTHIER et al., 2000; POLOMANO et al., 2001).

Nossos resultados mostraram que, independente do esquema de tratamento, o PCX na dose de 8mg/kg não foi capaz de modificar o tempo de reação dos animais no teste térmico durante os 4 dias, indicando que provavelmente nesse período e com a dose utilizada, não há lesão ou disfunção de estruturas neurais periféricas, como o brotamento anômalo de fibras A- β , responsáveis em parte, pela alodinia térmica da dor neuropática (TEIXEIRA, 2003). Achemos que não seria necessário demonstrar a conclusão de outros autores, ou seja, continuar a administração até o 7º dia para observar alguma manifestação neuropática. Nossa finalidade era apenas mostrar que, nos primeiros dias, a neuropatia não está presente e que, provavelmente o fenômeno amplificador do PCX parece ser mesmo de origem nociceptiva inflamatória.

Em uma abordagem geral, recapitulando os achados já obtidos, podemos sintetizar que zymosan induz hipernocicepção por mecanismo indireto, possivelmente pela sua ação sobre células residentes, como macrófagos e mastócitos da cavidade peritoneal de camundongos Swiss e da cavidade articular de ratos Wistar, liberando mediadores inflamatórios, como TNF- α , que age como iniciador da cascata de mediadores responsáveis pela sensibilização das terminações nociceptivas presente na dor inflamatória e que essa

atividade hipernociceptiva induzida por zymosan é amplificada significativamente pelo PCX na dose de 8mg/kg. PCX administrado isoladamente neste modelo não apresenta qualquer efeito hipernociceptivo.

É cada vez mais evidente, a partir de modelos animais e de estudos pré-clínicos, que múltiplos mecanismos operando em locais diferentes e com perfis temporais diferentes induzem síndromes dolorosas. A identificação das causas da doença primária é importante, contudo é também essencial diferenciá-las dos mecanismos de dor, principalmente na doença oncológica, onde o mesmo sintoma pode ter vários mecanismos causais e um único mecanismo pode induzir sintomas diferentes. Ademais diversos autores registram a importância das citocinas pró-inflamatórias na gênese das doenças articulares, onde a dor é um fator limitante, demonstrando que as terapias mais promissoras neste sentido seriam as direcionadas para o bloqueio da gênese dessas citocinas, principalmente a nível local (MORELAND, 1999; REINOLD, 2002).

Até pouco tempo, considerava-se que os sistemas imune e nervoso funcionavam de maneira independente um do outro, mas evidências recentes têm mostrado que estes sistemas podem trabalhar juntos em diversas situações, inclusive, no desenvolvimento da hipernocicepção como foi registrado por um grupo de pesquisadores da Universidade de Ontário/Canadá ao demonstrar a participação de linfócitos na modulação da dor visceral, onde na ausência de injúria, camundongos deficientes para linfócitos B e T apresentavam maior dor visceral e a reposição de células T CD4+, mas não células B, restabeleceram os limiares nociceptivos (VERMA-GANDHU et al., 2006).

Nesta linha de raciocínio, vários autores, devido ao comportamento comparável entre PCX e o LPS em macrófagos murinos, vêm sugerindo desde a década passada, que LPS e PCX compartilham uma etapa inicial no processo de transdução de sinais aumentando a liberação de TNF- α por meio de um mecanismo receptor-dependente (DING et al., 1990; BODGAN & DING, 1992; MANTHEY et al., 1992; ZAKS-ZILBERMAN et al., 2001., PERERA et al., 1997, 2001), e que antagonistas do receptor de LPS inibem a expressão de genes e a fosforilação de tirosina-proteína pelo PCX (MANTHEY et al., 1993).

Nesta via de sinalização compartilhada entre LPS e PCX, segundo dados da literatura, a participação de receptores Toll é fundamental para desencadear a resposta imune inata para geração de citocinas por estímulos inflamatórios, especialmente TLR-4 que é um receptor chave para a maioria dos lipopolissacarídeos bacterianos, embora o TLR-2 também se ligue a algumas variedades dos referidos lipopolissacarídeos (KAWAZAKI et al., 2000, 2001a; BYRD-LEIFER et al., 2001; JONES et al., 2001; HIRSCHFELD et al., 2001).

Um dos mais importantes avanços na imunologia humana nas últimas décadas foi à caracterização e evolução dos mediadores moleculares, importantes no controle da imunidade inata. O primeiro desses exemplos foi a descoberta da família de receptores tipo Toll. Em mamíferos, os receptores tipo Toll respondem a uma variedade de produtos de microrganismos e serve de ponte entre a imunidade inata e adaptativa.

Esses receptores presentes em células residentes inflamatórias como macrófagos, células dendríticas, queratinócitos, linfócitos T, quando reconhecem o seu PAMP (padrões moleculares associados à patógenos), desencadeiam o processo de sinalização intracelular, resultando na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias ou IFN tipo I. Recentemente, a interrelação entre os mastócitos e receptores tipo Toll na geração de mediadores inflamatórios vem sendo investigada por alguns pesquisadores. Wojciech e Marshal (2007) demonstraram que tanto mastócitos humanos como de roedores podem expressar receptores do tipo Toll, direcionando a resposta dependendo do tipo de patógeno. Segundo os autores, existem múltiplas vias diretas e indiretas de ativação seletiva dos mástocitos por meio de patógenos, incluindo TLR-2 e TLR-4, co-receptores e receptores do sistema complemento.

Foi demonstrado que TLR-4 está associado fisicamente a MD-2, uma molécula que confere ao LPS responsividade quando ligado ao TLR-4. Com a finalidade de determinar se o complexo TLR-4/MD2 também é o mediador do sinal induzido pelo PCX. Kawazaki e colaboradores (2000) utilizaram uma linhagem de células pró-B de camundongos Ba/F3, expressando somente TLR-4, camundongos expressando TLR-4 + MD2 e camundongo expressando TLR-4 + MD2 desprovidos de parte do citoplasma, com objetivo de avaliar se PCX induzia, assim como LPS, a ativação da via NF- κ B nesses animais. Visivelmente, a ativação da via NF- κ B pelo PCX foi detectada em camundongos da linhagem Ba/F3 que expressavam TLR-4 e MD2, mas não, nos outros animais. O PCX induziu a ativação da NF- κ B via TLR-4/MD2 e foi bloqueado por antagonistas de LPS, que também bloquearam a ativação desta mesma via (TLR-4/MD2), só que induzida por LPS. Esses resultados sugerem que a co-expressão de TLR-4/MD2 em camundongos é necessária para que o PCX ative a via NF- κ B e que o complexo TLR-4/MD2 é uma molécula que participa da transdução de sinais do PCX e LPS em camundongos e não, em humanos (KAWAZAKI et al., 2000, 2001b).

Posteriormente, estes mesmos autores, investigaram a base molecular para esta ação espécie-específica do PCX em camundongos que expressavam TLR-4 com MD2 mutante, já que a expressão de MD2 em camundongos confere a ambos responsividade em

células renais humanas embrionárias 293, ao passo que a expressão de MD2 em humanos confere responsividade somente ao LPS, sugerindo que MD2 é associado à responsividade espécie-específica do PCX. Foi demonstrado ainda, que uma mudança de aminoácido Gln na molécula de MD2 foi suficiente para causar uma redução drástica na capacidade de resposta conferida ao PCX, embora essa capacidade de resposta permanecesse ao LPS. Estes resultados indicaram que MD2 é essencial para a sinalização do PCX, mas não do LPS em camundongo mutante Gln (KAWAZAKI et al., 2001b).

Tendo em vista estas propriedades do PCX semelhantes ao do LPS e que seu efeito potencializador no modelo de contorções abdominais e de incapacitação articular é demonstrado apenas quando ocorre um estímulo prévio (zymosan), motivou-nos a estudar o mecanismo através do qual a droga exerça esse efeito, além de constatar que o assunto até a presente data ainda não foi discutido na literatura.

Inicialmente, a artrite associada à injeção do zymosan foi atribuída à ativação do sistema complemento e liberação de prostaglandina, leucotrienos, fator de ativação plaquetária, TNF e IL-1 (ROUBIN et al., 1982; PETTIPHER & SALTER, 1996) a partir de células inflamatórias. Estudo recente, utilizando camundongos “knock-out” para receptor do TLR-2, demonstrou redução significativa da sinovite quando comparados a animais normais, mais uma vez sugerindo a importância do componente imunológico na fisiopatologia da artrite induzida por zymosan (FRASNELLI et al., 2005).

Dados da literatura identificam o zymosan, um polissacarídeo da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, como um bom exemplo de PAMP que pode ser reconhecido pelos TLR-2 (FRASNELLI et al., 2005), assim como o LPS é um potente agonista bacteriano de TLR-4 (KNAPP et al., 2003; KNAPP & VANDER POLL, 2004).

Em relação à ativação de receptores de superfície celular, a expressão de TLR-2 e TLR-4 em neutrófilos e monócitos durante a sepse tem sido objeto de interesse crescente, já que esses receptores são, respectivamente, os responsáveis pelo reconhecimento de produtos de patógenos Gram-positivos e Gram-negativos, de tal forma que camundongos com deficiência de TLR-2 são altamente suscetíveis a infecções por *S. aureus* (TAKEUCHI et al., 1999). Por outro lado, camundongos deficientes de TLR-4, quando comparados com animais TLR-4 normais, são mais susceptíveis a infecções por bactéria Gram-negativas induzidas por *S. typhimurium* (O'BRIEN et al., 1980), *N. meningitidis* (WOODS et al., 1988), *E. coli* (HAGBERG et al., 1984). Observou-se também, que em camundongos tolerantes a endotoxina, existe diminuição da expressão de TLR-4 (AKASHI et al., 2000) e, mais

recentemente, foi ainda demonstrado o envolvimento de TLR-4 no desenvolvimento do choque séptico induzido por infecções polimicrobiais (ALVES-FILHO et al., 2006).

Estes achados da literatura sugerem a possibilidade que ocorra um “cross-talk” entre os receptores Toll, especificamente entre TLR-2 e TLR-4 e que agonistas diferentes de TLR-2 e TLR-4 são capazes de induzir a ativação das vias NF- κ B, AP1 e MAP cinase e geração de citocinas e óxido nítrico, importantes mediadores da resposta inflamatória sistêmica (JONES et al., 2001; HIRSCHFELD et al., 2001). Vários autores já identificaram outros PAMP que igualmente são reconhecidos pelo sistema TLR-2 e TLR-4, são eles: ácido lipoprotéico, produtos bacterianos, zymosan, mycobacterias, espiroquetas. Sendo o TLR-4 essencial para a sinalização do LPS de bactérias Gram-negativas e do antineoplásico PCX (AHMAD-NEJAD et al., 2002; GOLDSBY et al., 2003; TRINCHIERI & SHER, 2007).

Registramos na introdução deste trabalho, que os TLR-4 são os únicos receptores da família Toll que reconhecem seus agonistas (LPS e PCX) e desencadeiam as duas vias de sinalização de ativação do NF- κ B para indução da expressão de TNF- α : a via MyD88-dependente e a MyD88-independente onde a ativação é por meio da molécula adaptadora TIRAP (TAKEUCHI et al., 2000; AKIRA et al., 2004; BARTO & MEDZHITOV, 2004).

Diferentemente de TLR-4, o TLR-2, ao reconhecer seu agonista (zymosan) ativa NF- κ B somente pela via MyD88 dependente, levando-nos a considerar que a interação de TLR-2/zymosan esteja produzindo um “priming” infeccioso para que, nestas condições, ocorra a ativação das vias de sinalização do NF- κ B pelo antineoplásico PCX para indução da expressão de TNF- α . Este fato poderá auxiliar na elucidação do PCX, quando administrado sozinho sem o estímulo prévio do zymosan, não ter demonstrado atividade hipernociceptiva no modelo de artrite experimental.

Esta observação é consistente com estudos recentes de Wadashi e Hargreaves (2006) que demonstraram o papel importante de TLR-4 na periodontite infecciosa através da descrição inédita da presença destes receptores em nociceptores do gânglio trigeminal de humanos. Isto significa que o neurônio aferente primário tem a capacidade de reconhecer produtos bacterianos, portanto um efeito direto destes produtos sobre os nociceptores pode ser importante na dor de dente de origem infecciosa. O papel destes receptores tipo Toll na dor ainda está por ser determinado. No entanto, esta descoberta é muito importante por sugerir um efeito direto de agentes infecciosos sobre o nociceptor.

As evidências de que os receptores TLR-4 são geralmente associados a células imunocompetentes e que a sua expressão e sinalização sofrem influência direta da ATV,

propiciaram a investigação da real participação de TLR-4 na sinalização intracelular para indução de TNF- α .

Methe e colaboradores (2005) demonstraram que a ATV reduziu de maneira dose-dependente a expressão “in vitro” e “in vivo” em monócitos humanos de TLR-4/CD14, causando um “downregulation” na ativação de IRAK-1 quinase e conseqüente redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias. A mesma influência da ATV foi demonstrada em monócitos humanos estimulados por LPS, dado este que nos estimulou a investigar a modulação da ATV na atividade amplificadora do PCX, já que LPS e PCX compartilham a via de sinalização para indução de genes pró-inflamatórios, ratificando a importância desta via para nossa investigação.

Além de seu efeito sobre a redução dos níveis de colesterol, as estatinas apresentam efeitos pleiotrópicos, dentre tais destacam-se as ações antiinflamatórias (HERNANDEZ-PRESA et al., 2002), imunomodulatórias (BARSANTE et al., 2005) e aumento da expressão da sintase de óxido nítrico endotelial/NOS_e (MASSY et al., 1996; WAGNER et al., 2000).

A demonstração de um efeito benéfico bifásico da ATV sobre os parâmetros inflamatórios com conseqüente diminuição de riscos de doenças coronarianas em portadores de artrite reumatóide vem estimulando alguns grupos de pesquisa a testarem esta classe de drogas também em diferentes modelos experimentais de doenças inflamatórias, como por exemplo, modelos de artrite reumatóide. Foi verificado por alguns autores um efeito benéfico demonstrado nos modelos de artrite induzida por Adjuvante Complexo de Freund em ratos e induzida por colágeno em camundongos (AKTAS et al., 2003; LEUNG et al., 2003; BARSANTE et al., 2005).

Diante das escassas evidências identificadas na literatura sobre o uso da ATV em modelos experimentais de dor, observamos que o modelo de incapacitação articular induzida por zymosan seria de grande valia para o estudo da possível atividade antihipernocéptica da ATV modulando o efeito hipernocéptico do PCX, como antagonista de TLR-4 no nosso modelo.

O pré-tratamento dos animais com ATV durante três dias, semelhante ao modelo proposto por Santodomingo-Gazon e colaboradores (2007), foi capaz de inibir, de maneira significativa, o efeito potencializador hipernocéptico do PCX na artralgia experimental induzida por zymosan em ratos.

Estes resultados estão de acordo com os publicados recentemente por Santodomingo-Gazon e colaboradores (2007), onde seu efeito antihipernocéptico foi

demonstrado em modelos de hipernocicepção mecânica induzida pelo LPS e albumina bovina metilada intraplantar.

Utilizando os mesmos protocolos de pré-tratamento e indução usados na artralgia experimental em nosso modelo, foi investigada a atividade da ATV sobre a produção de TNF- α , IL-1 β e a expressão de TLR-4 por células sinoviais. Nossos resultados mostraram que a ATV inibiu significativamente a produção de TNF- α dosado por ensaio imunoenzimático, mas não, a de IL-1, dado que merece uma melhor investigação. Ao mesmo tempo, observamos que, no estudo imunohistoquímico, a expressão de TLR-4 está aumentada em animais que receberam PCX e zymosan e diminuído nos animais pré-tratados com ATV, indicando que possivelmente, a ATV está inibindo a expressão desses receptores induzidos pelo PCX. Entretanto, se prestarmos atenção, a produção de IL-1 β é pouco amplificada pelo PCX, não chegando a ser significativa diante de uma análise estatística. Desse modo, podemos sugerir que a ATV inibe a produção de TNF- α e a expressão de TLR-4, mas não, a produção de IL-1, talvez porque a produção dessa citocina não seja tão dependente da ativação de TLR4 como é o TNF- α no modelo de artrite induzida por zymosan.

Nossos resultados fortalecem as recentes pesquisas que estabelecem uma relação entre a função neuroimune e a nocicepção focada na compreensão do papel das citocinas, pois destaca o papel essencial do TNF- α e da via de sinalização de TLR-4 na artralgia experimental induzida por zymosan em ratos, avaliada pelo teste de incapacitação articular, utilizado como ferramenta farmacológica para tentar explicar a ocorrência relevante de artralgia e mialgias nos pacientes em tratamento com o PCX, atualmente representando a droga antineoplásica mais comercializada mundialmente com vendas que representam 1/3 de todo mercado farmacêutico de drogas quimioterápicas (KINGSTON et al., 2001; TOOGOOD, 2002).

Corroborando com nossos achados, foi demonstrado, recentemente por Amaral e colaboradores (2008) que camundongos livres de germes apresentavam redução da percepção da dor após diferentes estímulos (carragenina, LPS, TNF- α , IL-1 β e CXCL1) e que essa hiporesponsividade foi revertida pela reposição da microbiota ou pela ativação de TLR-4. Neste sentido, os autores destacam a importância da microbiota comensal para o desenvolvimento da hipernocicepção inflamatória possivelmente dependente da ativação de TLR-4.

Por fim, o presente estudo procurou avaliar, de forma inédita, o papel de TNF- α no efeito potencializador do PCX, inicialmente validando nossos resultados anteriores, que

utilizaram modulação farmacológica com inibidores de citocinas, como talidomida, sabidamente com sua atividade inibitória da produção da referida citocina. O aumento na produção de TNF- α também foi demonstrado no lavado articular e nas células do tecido sinovial de joelho de ratos tratados com zymosan e PCX. Tal aumento foi inibido por talidomida e ATV tanto no lavado articular como no tecido sinovial, provavelmente pela inibição da liberação de TNF- α por estas células residentes.

Em adição, nossos resultados sinalizam para os efeitos antihipercéptivo da ATV e sugerem a participação de TLR-4 como receptor de reconhecimento essencial para sinalização do PCX e seu efeito amplificador na artrite experimental induzida por zymosan. De fato, o pré-tratamento com ATV, um provável antagonista de TLR-4, inibiu este efeito provavelmente pela inibição da sua expressão pelas células do tecido sinovial, demonstrado pela visível diminuição da marcação para TLR-4 por meio de estudo imunohistoquímico neste tecido.

Apesar do muito que falta ser esclarecido, os resultados obtidos neste trabalho reforçam a necessidade de continuação das pesquisas envolvendo as vias de sinalização dos TLR-4, notadamente em condições onde a dor inflamatória é proeminente, pois nossos resultados ilustram o potencial terapêutico das estatinas, um antagonista de TLR-4, como nova estratégia para o tratamento das doenças inflamatórias que cursam com dores articulares, como a artralgia de caráter incapacitante, associada ao uso do antineoplásico PCX, que serviu de tela e estímulo para a realização deste trabalho.

Interessante destacar que o antineoplásico docetaxel, outro potente estabilizador de microtúbulos, experimentalmente não ativou as vias de sinalização LPS-dependentes ou induziu a produção de TNF- α em macrófagos murinos, o que explicaria em parte, a menor incidência de artralgias e mialgias associadas a esse taxane (GARRISON et al., 2003). Isto reforça a idéia de que o mecanismo antitumoral do PCX no qual induz a estabilização de microtúbulos não é o mesmo da indução de citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelos eventos álgicos, como registrado na introdução deste trabalho.

Ao realizarmos a transferência dos nossos achados experimentais para a prática clínica, podemos sugerir que os pacientes oncológicos que experimentam artralgias durante os ciclos de quimioterapia com PCX, provavelmente já teriam algum processo articular infeccioso subclínico por mais branda que seja, visto que não são todos os pacientes que apresentam esse quadro de dor articular. Adicionalmente, percebemos que o PCX, por si só, em nenhuma das doses por nós estudadas, foi capaz de induzir um quadro de incapacitação

articular, sendo sempre necessário que se fizesse inicialmente uma indução com zymosan. Nesse caso o zymosan numa subdose, mimetizaria um processo inflamatório subclínico que então seria amplificado pelo tratamento com PCX, transformando-se em algo mensurável experimentalmente.

Deixamos aqui a nossa contribuição, a essa problemática clínica, sugerindo a ATV e talidomida como possíveis ferramentas terapêuticas a serem exploradas, pois a necessidade de desenvolvimento e aprimoramento das terapias para o tratamento da dor no câncer torna as pesquisas nesta área relevantes para a promoção da saúde e melhoria da qualidade de vida dos pacientes oncológicos.

Conclusões

Analisando em conjunto, nossos resultados obtidos na avaliação do efeito potencializador do paclitaxel no modelo de artralgia experimental induzida por zymosan em ratos, permite-nos concluir de maneira inédita que:

- O efeito do paclitaxel na artralgia experimental induzida por zymosan parece envolver a produção, via células residentes, de citocinas hiperalgésicas e prostaglandinas, desde que foi inibido de forma significativa pelo pré-tratamento com talidomida, pentoxifilina, dexametasona, indometacina e celecoxibe.

- TNF- α parece desempenhar um papel essencial na deflagração da resposta amplificadora do paclitaxel, pois níveis elevados dessa citocina foram encontrados no lavado articular e no tecido sinovial de joelho de ratos, associado ao fato da talidomida ter inibido esse efeito

- TLR-4 parece participar da patogênese desse efeito do paclitaxel, pois a sua expressão está aumentada no tecido sinovial de animais estimulados com paclitaxel e zymosan

- Atorvastatina inibe esse efeito do paclitaxel possivelmente via inibição de TNF- α e da expressão de TLR-4.

Referências

ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The activated macrophage and granulomatous inflammation, **Curr Top Pathol.** v.79, p.151-67, 1989.

AHMAD-NEJAD, P.; HACKER, H.; RUTZ, M.; BAUER, S.; VABULAS, R. M. and WAGNER, H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. **Eur J Immunol.** v. 32, p. 1958-68, 2002.

AKIRA, S. & TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat. Immunol.** v. 4, p. 499–511, 2004.

AKTAS, O.; WAICZIES, S.; SMORODCHENKO, A.; DORR, J.; SEEGER, B.; PROZOROVSKI et al. Treatment of relapsing paralysis in experimental encephalomyelitis by targeting Th1 cells through atorvastatin. **J Exp Med.** v. 197, p. 725–733, 2003.

ALVES-FILHO, J.C.; FREITAS, A.; RUSSO, M.; CUNHA, F.Q. Toll-like receptor signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Crit Care Med.** v. 34, n. 2, p. 461-470, 2006.

AMARAL, F. A.; SACHS, D.; COSTA, V. V.; FAGUNDES, C. T.; CISALPINNO, D.; CUNHA, T. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; SILVA, T. A.; NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. Commensal microbiota is fundamental for the development of inflammatory pain. **PNAS.** v.105, n.6, p.2193-2197, 2008.

AMEZIANE, N.; BEILLAT, T.; VERPILLAT, P.; CHOLLET-MARTIN S.; AUMONT, M. C.; SEKNADJI, P.; LAMOTTE, M.; LEBRET, D.; OLLIVIER, V.; DE PROST D. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 23, p. 61-4, 2003.

AUTHIER, N.; GILLET, J. P.; FILALIP, J.; ESCHALIER, A.; COUDORE, F. Description of a short-term taxol-induced nociceptive neuropathy in rats. **Brain Res.** v. 887, p.236-249, 2000.

BALLANTYNE, J.; FISHMAN, S. M.; ABDI, S. **The Massachusetts General Hospital Handbook of Pain Management.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 01, p. 3-29.

BARNES, P. J., ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends Pharmacol Sci.** v. 14, n.12, p. 436-441, 1993.

BARSANTE, M. M.; ROFFE, E.; YOKORO, C. M.; TAFURI, W. L.; SOUZA, D. G.; PINHO, V. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. **Eur J Pharmacol.** v. 516, p. 282–289, 2005.

BARTO, G. M.; & MEDZHITOV, R. Toll signaling: Ripping off the TNF pathway. **Nat. Immunol.** v.5, p. 472–474, 2004.

BECKER, E. L - Chemotactic factors of inflammation. **Trends Pharmacol Sci.** v. 4, n. 5, p. 223-25, 1983.

BEUTLER, B. & CERAMI, A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. **Ann Rev Biochem.** V. 57, p. 505-08, 1988.

BISSONNETTE E.Y.; HOGABOAM, C. M.; WALLACE, J. L.; BEFUS, A. D. Potentiation of tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity of mast cells by their production of nitric oxide. **J Immunol.** v. 147, n. 9, p. 3060-5, 1991.

BOEKHOLDT, S. M.; AGEMA, W. R.; PETERS, R. J.; ZWINDERMAN, A. H.; VAN DER WALL, E. E.; REITSMAN, P. H.; KASTELEIN, J. J.; JUKEMA, J. W.; Regression growth evaluation statin study group. **Circulation.** n.20, v. 107(19), p. 2416-2421, 2003.

BO, ZHONG.; PO, T.; HONG-BING, S. **Innate immune responses: Crosstalk of signaling and regulation of gene transcription. Virology. Minireview.** p. 36-43, 2006.

BOGDAN, C.; DING, A. Taxol, a microtubule-stabilizing antineoplastic agent, induces expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in macrophages. **J Leukoc Biol.** v. 52, p. 119-21, 1992.

BONICA, J. J. Peripheral pain mechanisms and nociceptor plasticity. In: **Bonica's management of pain.** 3^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001. Cap 3. p. 26-72.

BONICA, J. J. Spinal mechanisms and Their Modulation. In: **Bonica's management of pain.** 3^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001. Cap 4. 73-152.

BONICA, J. J. Cancer Pain: Assessment and diagnosis. In: **Bonica's management of pain**. 3ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001. Cap 35. 623-658.

BURKHART, C. A.; BERMAN, J. W.; SWINDELL, C. S.; HORWITZ, S. B. Relationship between the structure of taxol and other taxanes on induction of tumor necrosis factor-alpha gene expression and cytotoxicity. **Cancer Res.** v. 54, p. 5779– 5782, 1994.

BUSTAMENTE, A. M. F. **Caracterización de um modelo para la evolución de la analgesia em ratas: medición de la limitación funcional producida por administración intra-articular de ácido úrico**. 1982, Tese- Universidade Autónoma do México, 1982.

BYRD-LEIFER, C. A.; BLOCK E. F.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; DING. A. The role of MyD88 e TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. **Eur J Immunol.** v. 31, n. 8, p. 2448-57, 2001.

CALANDRA, T. & ROGER, T. Macrophage migration Inhibitory Factor: A regulator of innate immunity. **Nature.** v. 3, p. 791-800, 2003.

CAPLOW, M.; SHANKS, J.; RUHLEN, R. How Taxol modulates microtubule disassembly. **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 23399-23402, 1994.

CARACENI, A.; PORTENOY, R. K. An international survey of cancer pain characteristics and syndromes. **Pain (Amsterdam).** v. 82, n. 33, p. 263-274, 1999.

CARDOSO, M. G. M. **Efeito potencializador do antineoplásico paclitaxel (taxol®) na hiperalgesia inflamatória induzida por zymosan em modelos experimentais de dor**. 2003, 112 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

CARDOSO, M. G. M. Cuidados Paliativos em dor. In: **ALVES NETO. O. Dor princípios e prática**. 1ª ed. Porto Alegre: Ed Artmed, 2008. 27. 335-343.

CARRILO-ESPER, R. Inmunidad innata, receptors Toll y sepsis. **Cir Ciruj.** v. 71, p. 252-258, 2003.

CARVALHO, P.; TIRNAUER, J. S.; PELLMAN, D. Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. **Trends Cell Biol.** v. 5, p. 229-32, 2003.

CAVALETTI, G.; TREDICI, G.; BRAGA, M.; TAZZARI, S. Experimental peripheral neuropathy induced in adult rats by repeated intraperitoneal administration of taxol. **Exp Neurol**. v. 133, p.64-72, 1995.

CHAUDHRY, V.; ROWINSKY, E. K.; SARTORIUS, S. E.; DONEHOWER, R. C.; CORNBLANTH, D.R. Peripheral neuropathy from taxol and cisplatin combination chemotherapy: clinical and electrophysiological studies. **Ann Neurol**. v. 35, p. 304-311, 1994.

COLLIER, H. O. J.; DINNEEN, L. C.; CHISTINE, A.; JOHNSON, A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br J Pharmacol. Chemoter**. v. 32, p. 295-99, 1968.

COLLINS, T. S, LEE, L.F.; TING, J.P. Paclitaxel up-regulates interleukin-8 synthesis in human lung carcinoma through an NF-kappaB- and AP-1-dependent mechanism. **Cancer Immunol Immunother**. v. 49, p. 78– 84, 2000.

CONNELLY, E.; MARKMAN, M.; KENNEDY, A.; WEBSTER, K.; KULP, B.; PETERSON, G.; BELINSON, J. Paclitaxel delivered as a 3-hr infusion with cisplatin in patients with gynecologic cancers: unexpected incidence of neurotoxicity. **Gynecol Oncol**. v. 62, p. 166–168, 1996.

CORTI, A.; FASSINA, G.; MARCUCCI, F. Oligomeric tumor necrosis factor alpha slowly converts into inactive forms at bioactive levels. **Biochem J**. v. 284, p. 905-910, 1992.

CRESTEIL, T.; MONSARRAT, B.; ALVINERIE, P.; TRELUYER, J.M.; VIEIRA, I.; WRIGHT, M. Taxol metabolism by human liver microsims: identification of cytochrome P450 isozymes involved in its biotransformation. **Cancer**. v. 54, p. 386-392, 1994.

CUNHA, F.Q.; Ferreira, S. H. The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. **Eur J Pharmacol**. v. 23, n. 129, p. 65-76, 1986.

CUNHA, F. Q.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S., et al. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br J Pharmacol**. v. 104, n. 3, p. 765-767, 1991.

CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LOREZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumor necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol.** v. 107, p. 660-664, 1992.

CUNHA, T. M.; VERRI JR, A. W. Neutrophils: are they hyperalgesic or anti-hyperalgesic? **Journal of Leukocyte Biology.** v.80, p. 727-728, 2006.

DAUT, R.L.; CLEELAND C.S. The prevalence and severity of pain in cancer. **Cancer.** v. 50, n. 9, p. 1913-8, 1982.

DAWICKI, W.; MARSHALL, J.; S. New and emerging roles for mast cells in host defense. **Current Opinion in Immunology.** v. 19, p. 31-38, 2007.

DEBERNARDIS, D.; SIRE, E. G.; DE FEUDIS, P.; VIKHANSKAYA, F.; VALENTI, M.; RUSSO, P.; PARODI, S.; D'INCALCI, M.; BROGGINI, M. p53 status does not affect sensitivity of human ovarian cancer cell lines to paclitaxel. **Cancer Res.** v. 57, p. 870-874, 1997.

DE SOUZA, G. E.; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions.** v. 17, n. 1, p. 97-103, 1985.

DING, A. H.; PORTEU, F.; SANCHEZ, E.; NATHAN, C.F. Shared actions of endotoxin and taxol on TNF receptors and TNF release. **Science.** v. 248, p. 370- 2, 1990.

DOUILLARD, J.Y.; LEROUGE, D.; MONNIER, A., BENNOUNA, J., HALLER, A.L., SUN, X. S; ASSOULINE, D.; GRAU, B.; RIVIERE, A. Combined paclitaxel and gemcitabine as first-line treatment in metastatic non-small cell lung cancer: a multicentre phase II study. **Br J Cancer.** v. 84, p. 1179-1184, 2001.

DOWNS, J.R.; CLEARFIELD, M.; WEIS, S.; The AFCAPS/TexCAPS Research Group. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: Results of AFCAPS/TexCAPS. **JAMA.** v. 279, p.1615-1622, 1998.

DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neurosci.** v.16, n. 99, 1993.

DUARTE I.D., NAKAMURA M., FERREIRA, S.H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Braz J Med Biol Res.** v. 21, n. 341, 1988.

DUARTE, I.D.; SANTOS, I. R.; LORENZETTI, B. B. et al. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **Eur J Pharmacol.** v. 217, n. 2-3, p. 225, 1992.

DUSTIN, P. Microtubules. **Sci Am.** v. 243, p.66-76, 1980.

EDDY, N.B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 107, n. 3, p. 385-93, 1953.

ENGELMANN, H., HOLTMANN, H., BRAKEBUSH, C. et al. Antibodies to a soluble form of the tumor necrosis factor (TNF) receptor have a TNF-like activity. **J Biol Chem,** 265: 14497-14504, 1990.

FACCIOLI, L. H.; SOUZA, G. E.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. **Agents Actions.** v. 30, n. 3-4, p. 344-9, 1990.

FAN, J.; RANDALL, S. F.; ASRAR, B. M. TLR-4 signaling induces TLR-2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. **The Journal of Clinical Investigation.** v. 112, n. 8, p.1234-1243, 2003.

FAN, S.; CHERNEY, B.; REINHOLD, W.; RUCKER, K.; O'CONNOR, P. M. Disruption of p53 function in immortalized human cells does not affect survival or apoptosis after Taxol or vincristine treatment. **Clin. Cancer Res.** v. 4, p. 1047-1054, 1998.

FERREIRA, S H.; NAKAMURA, M.I.I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. **Prostaglandins,** v.18, p.179, 1979a.

FERREIRA, S.H., LORENZETTI, B.B., BRISTOW, A.F. AND POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature** v. 334 p. 698-700, 1988

FERREIRA, S. H. Inflammatory pain: the role of cytokines and its control by drugs which release nitric oxide. **Ann Ist Super Sanita.** v. 29, n. 3, p. 367-73, 1993

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; CORREA, F. M. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. **Eur. J. Pharmacol.** v. 53, n. 1, p 39, 1978.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol.** v. 110, p. 1227, 1993.

FERREIRA, S.H. Peripheral analgesia: mechanism of the analgesic action of aspirin-like drugs and opiate-antagonists. **Br J Clin Pharmacol.** 10 Suppl v. 2, p. 237-245, 1980.

FERRO, D.; PARROTO, S.; BASILII, S.; ALESSANDRI, C.; VIOLI, F. Simvastatin inhibits the monocyte expression of proinflammatory cytokines in patients with hypercholesterolemia. **J Am Coll Cardiol.** v. 36, p. 427–431, 2000.

FLATTERSA, S. J. L.; BENNET, G. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: Evidence for mitochondrial dysfunction. **Pain.** v. 122, n. 3, p. 245–257, 2006.

FOLEY, K. M.; ROGER, A.; RONDE, R. W. Clinical assessment of cancer pain. **Acta Anesthesiol Scand** (suppl) v. 79, p. 91-96, 1982.

FOLLENFANT, R. L.; NAKAMURA, M. AND GARLAND, L. G. Sustained hyperalgesia in rats evoked by the protein kinase inhibitor H-7. **Br. J. Pharmacol.** v. 99, p. 289, 1990.

FONSECA, F. A. H. Farmacocinética das Estatinas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** out; 85 (supl V): 9-14, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abc/v85s5/v85s5a03.pdf>.

FRASNELLI, M. E.; TARUSSIO, D.; CHOBAN-PECLAT, V.; BUSSO, M.; SO, A. TRL2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Res Ther.** v. 7, p. 370-379, 2005.

GADDUCCI, A.; CIANCI, C.; COSIO, S.; CARNINO, F.; FANUCCHI, A.; BUTTITTA, F.; CONTE, P. F.; GENAZZANI, A. R. p53 status is neither a predictive nor a prognostic variable in patients with advanced ovarian cancer treated with a paclitaxel-based regimen. **Anticancer Res.** v. 20, p. 4793-4799, 2000.

GARRISON, J. A.; McCUNES, J. S.; LIVINGSTON, R. B.; LUNDEN, H. M.; GRALOW, J. R.; ELLIS, G. K.; WEST, H. L. Myalgias and arthralgias associated with Paclitaxel. **Oncology**. v. 17, n. 2, p. 271-277, 2003.

GOLDSBY, R. A.; THOMAS, J. K.; OSBORNE, B. A.; KUBY, J.; **Immunology**, 5th edition, New York: W. H. Freeman and Company, 2003.

GORDON, A.N.; STRINGER, C. A., MATTHEWS, C. M.; WILLIS, D. L.; NEMUNAITIS, L. Phase I dose escalation of paclitaxel in patients with advanced ovarian cancer receiving cisplatin: rapid development of neurotoxicity is dose-limiting. **J Clin Oncol**. v. 15, p.1965-1973, 1997.

GRIGG, P.; SCHAIBLE, H. G.; SCHMIDT, R. F. Mechanical sensitivity of group III and IV afferents from posterior articular nerve in normal and inflamed cat knee. **J Neurophysiol**. v. 55, n. 4, p. 635, 1986.

GRONBLAD M., KORKALA O., LIESI P., KARAHARJU E. Innervation of synovial membrane and meniscus. **Acta Orthop Scand**. v. 56, n.6, p. 484-6, 1985.

HAGBERG, L.; HULL, R.; HULL, S: Difference in susceptibility to gram-negative urinary tract infection between C3H/HeJ and C3H/HeN mice. **Infect Immun**. v. 46, p. 839–844, 1984.

HAND, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. Hormônios locais, inflamação e reações imunológicas. In: **Farmacologia**. 6^a ed, Rio de Janeiro, 2007.

HARRIS, J.W.; RAHMAN, A.; KIM, B.R.; GUENGERICH, P.; COLLINS, J.M. Metabolism of taxol by human hepatic microsomes and liver slices: participation of cytochrome P450 3A4 and unknown P450 enzyme. **Cancer Research**. v 15, p. 4026-4035, 1994.

HASSELBACHER, P.; MCMILLAN, R. M.; VATER, C. A.; HAHN, J.; HARRIS, E. D. JR. Stimulation of secretion of collagenase and prostaglandin E2 by synovial fibroblasts in response to crystals of monosodium urate monohydrate: a model for joint destruction in gout. **Trans Assoc Am Physicians**. v. 94, p. 243-52, 1981.

HELSING, M.; THANING, L.; SEDERHOLM, C.; LAMBERG, K.; MARTINSSON, J.F.; EK, L.; MNSOON, T.; ANDERSSON, L.; HERO, U.; ANJEDANI, D.; SVENNSON, G.

Treatment with paclitaxel 1-h infusion and carboplatin of patients with advanced non-small-cell lung cancer: phase II multicentre trial. **Lung Cancer**. v. 24, p. 107-113, 1999.

HENDERSON, B.; POOLE, S. Modulation of cytokine function: therapeutic applications. **Adv Pharmacol. Review**. v 25, p. 53-115, 1994.

HERNANDEZ-PRESA, M. A.; MARTIN-VENTURA, J. L., ORTEGO, M.; GOMEZ-HERNANDEZ, A.; TUNON, J.; HERNANDEZ-VARGAS, P. Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in rabbit model of the atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, v. 160, p. 49-58, 2002.

HILKENS, P. H. E.; VAN DEN BENT, M. J. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **J Peripher Nerv Syst**. v. 2, p. 350-361, 1997.

, K. The incidence of cancer pain and improvement of pain management in Japan. **Posgrad Med J**. v. 67, p.14-25, 1991.

HIRSCHFELD, M.; WEIS, J.; TOSHCHAKOV, V.; SALKOWISKI, C. A.; CODY, M. J.; WARD, D. C.; QURESHI, N.; MICHALEK, S. M.; VOGEL, S. N. Signaling by Toll-like Receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. **Infec Immun**. v. 69, n. 3, p. 1477-1482, 2001.

HOLTON, R. A.; SOMOZA, C.; KIM, H. B.; LIANG, F.; BIEDIGER, R. J.; BOATMAN, P. D.; SHINDO, M.; SMITH, C. C.; KIM, S.; NADIZADEH, H.; SUZUKI, Y.; TAO, C.; VU, P.; TANG, S.; ZHANG, P.; MURTHI, K. K.; GENTILE, L. N.; LIU, J. H. First Total Synthesis of Taxol. 1. Functionalization of the B Ring. **J. Am. Chem. Soc**. v. 116, p. 1597, 1994.

HOUSSIAU, F. A.; DEVOGELAER, J. P.; VAN DAME, J.; DEUXCHAISNES, C. N.; VAN SNICK, J. Interleukin-6 synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. **Arthritis Rheum**. v. 31, n. 6, p. 784-788, 1988.

HWANG, S.; DING, A. Activation of NF-kappa B in murine macrophages by taxol. **Cancer Biochem Biophys**. v. 14, p. 265– 72, 1995.

JANJAN, N. A.; CLEELAND, C. S. Pain and suffering during cancer therapy: continued sins of omission. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**. v. 72, n. 1, p.6-8, 2008.

JONES, B. W.; MEANS, T. K.; HELDWEIN, K. A.; KEEN, M. A.; HILL, P. J.; BELISLE, J. T.; FENTON, M. J. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage response. **J Leukoc Biol.** v. 69, n. 6, p. 1036-1044, 2001.

JORDAN, M. A.; TOSO, R.J.; THROWER, D.; WILSON, L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. **Proc Natl Acad Sci.** v. 90, p. 9552-9556, 1993.

KAGAN, J. C. et al. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- β . **Nature Immunol.** v. 2, p. 1038-1569, 2008.

KAPLAN, J.G.; EINZING, A. L.; SCHAUMBURG, H. H. Taxol causes permanent large fiber peripheral nerve dysfunction: a lesson for preventative strategies. **J Neurooncol.** v. 16, p. 105-107, 1993.

KAWAZAKI, K.; AKASHI, S.; SHIMAZU, R.; YOSHIDA, T.; MIYAKE, K.; NISHIJIMA, M. Mouse toll-like receptor 4. MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction Taxol. **J Biol Chem.** v. 28, n. 4, p. 2251-4, 2000.

KAWAZAKI, K.; AKASHI, S.; SHIMAZU, R.; YOSHIDA, T.; MIYAKE, K.; NISHIJIMA, M. Involvement of TLR4/MD-2 complex in species-specific lipopolysaccharide-mimetic signal transduction Taxol. **J Endotoxin Res.** v. 7, n. 3, p. 232-6, 2001.

KAWAZAKI, K.; GOMI, K.; NISHIJIMA, M.; Cutting edge: Gln22 of mouse MD-2 is essential for specie-specific lipopolysaccharide-mimetic signal transduction Taxol. **J immunol.** v.1, n.1, p.11-4, 2001.

KENNEDY J.C.; ALEXANDER I.J.; HAYES K.C. Nerve supply of the human knee and its functional importance. **Am J Sports Med.** v.10, n.6, p. 329-35, 1982.

KIM YM & PAIK S G. Induction of expression of inducible nitric oxide synthase by taxol in murine macrophage cell. **Biochem Biophys Res Commur.** v.14, n. 326, p. 410-6, 2005.

KING, T. C.; AKERLEY, W.; FAN, A. C.; MOORE, T.; MANGRAY, S.; HSIU CHEN, M.; SAFRAN, H. p53 mutations do not predict response to paclitaxel in metastatic non-small cell lung carcinoma. **Cancer (Phila.)** v. 89, p. 769-773, 2000.

KINGSTON, D. G. I. Recent advances in the chemistry of Taxol. **J Nat Prod.** v. 63, p. 726-727, 2000.

KINGSTON, D. G. I. Taxol, a molecule for all seasons (Review). **Chem. Commun.** p. 867-880, 2001.

KINGSTON, D. G. I. The taxol pharmacophore and the T-taxol bridging principle (Review). **Cell Cycle**, n.4, v. 2, p. 279-289, 2005.

KIRIKAE, T.; OJIMA, I.; FUERO-ODERDA, C.; LIN, S.; KIRIKAE, F. HASHIMOTO, M.; et al. Structural significance of the acyl group at the C-10 position and the A ring of the taxane core of paclitaxel for inducing nitric oxide and tumor necrosis factor production by murine macrophages. **FEBS Lett** v. 478, p. 221–6, 2000.

KIRIKAE, T.; OJIMA, I.; KIRIKAE, F.; MA, Z.; KUDUK, S.D.; SLATER, J.C. et al. Structural requirements of taxoids for nitric oxide and tumor necrosis factor production by murine macrophages. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 227, p. 227–235, 1996.

KIRIKAE, T.; OJIMA, I.; MA, Z.; KIRIKAE, F.; HIRAI, Y.; NAKANO, M. Structural significance of the benzoyl group at the C-3V-N position of paclitaxel for nitric oxide and tumor necrosis factor production by murine macrophages. **Biochem Biophys Res Commun** v. 245, p. 698–704, 1998.

KLEBANOFF, S. J.; VADAS, M. A.; HARLAN, J. M.; SPARKS, L. H.; GAMBLE, J. R.; AGOSTI, J. M.; WALTERSDORPH, A. M. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. **J Immunol.** v. 136, n. 11, p. 4220-4225, 1986.

KNAPP, S.; DE VOS, A. F.; FLORQUIN, S.; GOLENBOCK, D. T. and VAN DER POLL, T. Lipopolysaccharide binding protein is an essential component of the innate immune response to Escherichia coli peritonitis in mice. **Infect Immun.** v. 71, p. 6747-53, 2003.

KNAPP, S.; VAN DER POLL, T. Update on CD14, LBP, and Toll-like Receptors in acute infections. In: VINCENT, J. L. (Ed.). **Yearbook of Intensive Care Medicine.** Springer-Verlag: Berlin p. 3-14, 2004.

KOH, K. K. Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammation, and plaque stability. **Cardiovas Res.** v. 47, p. 648-657, 2000.

KOLEK, M. J.; CARLQUIST, J. F.; MUHLESTEIN J. B.; WHITING, B. M.; HORNE, B. D.; BAIR, T. L.; ANDERSON, J. L. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. **Am Heart J.** v.148, p. 1034-40, 2004.

KUMAGAI, Y.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pathogen recognition by innate receptors. **J Infect Chemother.** v. 14, p. 86-92, 2008.

KUMAR, N. Taxol-induced polymerization of purified tubulin: mechanism of action. **J Biol Chem.** v. 256, p. 10435-10441, 1981.

LAFRAMBOISE, S.; CHAPMAN, W.; MCLAUGHLIN, J.; ANDRULIS, I. L. p53 mutations in epithelial ovarian cancers: possible role in predicting chemoresistance. **Cancer J.** v. 6, p. 302-308, 2000.

LARUE, F. et al. Multicentre study of cancer pain and its treatment in France. **BMJ.** v. 30, p. 1034-1037, 1995.

LATZ, E.; VISINTIN, A.; LIEN, E.; FITZGERALD, K. A.; MONKS, B. G.; KURTJONES, E. A.; GOLENBOCK, D. T and ESPEVIK, T. Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. **J Biol Chem.** v. 277, p. 47834-43, 2002.

LAVARINO, C.; PILOTTI, S.; OGGIONNI, M.; GATTI L PEREGO, P.; BRESCIANI, G.; PIEROTTI, M. A.; SCAMBIA, G.; FERRANDINA, G.; FAGOTTI, A.; MANGIONI, C.; LUCCHINI, V.; VECCHIONE, F.; BOLIS, G.; SCARFONE, G.; ZUNINO, F. *p53* gene status and response to platinum/paclitaxel-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. **J. Clin. Oncol.** v. 18, p. 3936-3945, 2000.

LARRICK, J. W., KUNKEL, S. L. The role of tumor necrosis factor and interleukin 1 in the immunoinflammatory response. **Pharm Res. Mar.** v. 3, p.129-139, 1988.

LEE, L.F.; SCHUERER-MALY, C. C.; LOFQUIST, A.K.; VAN HAAFTEN-DAY, C.; TING, J.P.; WHITE, C. M. Taxol-dependent transcriptional activation of IL-8 expression in a subset of human ovarian cancer. **Cancer Res.** v. 56, p.1303- 1308, 1996.

LEUDKE, C. E.; CERAMI, A. Interferon-gamma overcome glucocorticoid suppression of caquectin/tumor necrosis factor biosynthesis. **J Clin Invest.** v. 86, n. 4, p. 1234-1240, 1990.

LEUNG, B. P.; SATTAR, N.; CRILLY, A.; PRACH, M.; MCCAREY, D. W.; PAYNE, H. A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. **J Immunol.** v. 170, p. 1524–1530, 2003.

LEVINE, J.; TAIWO, J.D.; HELLER, P.H: Hyperalgesic pain: inflammatory and neuropathic. In: **Hyperlgesia and allodynia.** 1st ed. New York: WD Willis, Jr. ed. Raven Press, 1992, p. 174-198.

LINDBLON. U. Pain terms. A current list with definitions and notes on usage. Apud MERSKEY, H. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Pain** (Suppl), 3: 215-221, 1986.

LICHTMAN, A. H., S. PILAI., ABBAS, K. Cytokines In_. **Cellular and Molecular Immunology.** 6thEdition Saunders. USA: Elsevier Science, 2007. cap 12. 384-409 .

LOESER, J.D. & TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain.** v.137, p. 473-477, 2008.

LOPRINZI, C. L.; MADDOCKS-CHRISTIANSON, K.; WOLF, S. L.; RAO, R. D.; DYCK, P. J.; MANTYH, P.; DYCK, P. J. The Paclitaxel acute pain syndrome: sensitization of nociceptors as the putative mechanism. **Cancer J.** v.13, n.6, p. 399-403, 2007.

LORENZ, E.; MIRA, J. P.; CORNISH, K. L.; ARBOUR, N. C. and SCHWARTZ, D. A. LOSSHER, P.; NAGAYAMA, O. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association. **Drugs Fut.** v. 22, p. 556, 1997.

LOWMAN, M.N.; BENYON, R.C.; CHURCH, M. K. Characterization of neuropeptide-induced histamine release from human dispersed skin mast cells. **Br. J. Pharmacol.** v.95, p. 121, 1998.

MAGALHÃES, J.F.G.; VIANA, C. F. G.; ARAGÃO, J. R. A.G.; MORAES, V.G.; RIBEIRO R.A.; VALE, M.R. Analgesic and anti-inflammatory activities of *ageratum conyzoides* in rats. **Phytoterapy Research**. v. 2, p.183-188, 1997.

MANFREDI, J.J.; PARNES, J.; HORWITZ. S.B. Taxol binds to cellular microtubules. **J Cell Biol**. v. 94, p. 688-696, 1982.

MANNAIONI P.F.; MASINI, E.; PISTELLI, A.; SALVEMINI, D.; VANE J.R. Mast cells as a source of superoxide anions and nitric oxide-like factor: relevance to histamine release. **Int J Tissue React**. v.13, n. 6, p. 271-8, 1991.

MANTHEY, C. L.; BRANDES, M.E, PERERA, P.Y.; VOGEL, S.N. Taxol increases steady-state levels of lipopolysaccharide-inducible genes and protein-tyrosine phosphorylation in murine macrophages. **J Immunol**. v. 149, p. 2459- 65, 1992.

MANTHEY, C. L.; PERERA, P.Y.; SALKOWSKI, C.A.; VOGEL, S.N. Taxol provides a second signal for murine macrophage tumoricidal activity. **J Immunol**. v.152, p.825-831, 1994.

MANTHEY, C.L.; QURESHI, N.; STUTZ, P.L.; VOGEL, S.N. Lipopolysaccharide antagonists block taxol-induced signaling in murine macrophages. **J Exp Med**. v.178, p.695-702, 1993.

MARTINS, S. P. **Expressão de receptores de superfície em neutrófilos e avaliação do metabolismo oxidativo em neutrófilos e monócitos de pacientes sépticos e sua associação com disfunção de órgãos**. 2005, 144 f. Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2005.

MASHIMO, T.; PAK, M.; INAGAKI, Y.; YOSHIYA, I. Effects of intravenous regional administration of vasodilators: guanethidine, nicardipine, nitroglicerine and prostaglandin E2 in a patient with causalgia. **Pain Clin**. v.8, p.255-261, 1995

MASINI, E.; SALVEMINI, D.; PISTELLI, A. Rat mast cells synthesize a nitric oxide like-factor which modulates the release of histamine. **Agents Actions**. v. 33, n. 1-2, p. 61, 1991.

MASSY, Z.A.; KEANEWF; KASISKE, B.L. Inhibition of the mevalonate pathway: benefits beyond cholesterol reduction? **Lancet**. v. 347, p.102-103, 1996.

MAYER, E.A.; GEBHART, G.F. Basic and clinical aspects of visceral hyperalgesia. **Gastroenterology**. v.107, n.1, p. 271-93,1994.

MCCAREY, D. W.; MCINNES, I.B.; MADHOK, R.; HAMPSON, R.S; CHERBAKOV, O.; FORD, I.; CAPELL, H. A.; SATTAR, N. Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomized placebo-controlled trial. **Lancet**. v. 9426, n. 363, p. 2015-21, 2004.

MCCAREY, D.W.; SATTAR, N.; MCINNES, I. B. Do the pleiotropic effects of statins in the vasculature predict a role in inflammatory diseases? **Arthritis Res Ther**. v.7, p. 55-61, 2005.

MCMAHON, S.B.; AND KOLTZENBURG, M. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. **Trends Neurosci**. v. 13, p. 199, 1990.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P. and JANEWAY, C. A. JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**. v. 388, p. 394-7, 1997.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Task force on taxonomy: classification of chronic pain**. Seattle: IASP, 1994.

MELLER, S. T.; CEMMINGS, C. P.; TRAUB, R. J.; GEBHART, G. F. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rats. **Br J Pharmacol**. v.60, n. 2, p.367-374, 1994.

METHE H.; KIM J, KOFLER S.; NABAUER M. ; WEIS M. Statins decrease Toll-like receptor 4 Expression and downstream signaling in human CD14+ monocytes. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**. v. 25, p.1439-1445, 2005.

MEYER & CAMPBELL, JN. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: _ WALL, PD.; MELZACK, R. eds. **Textbook of pain**. 2 ed. Oxford, Churchill Livingstone, 1989, p. 22-45.

MONSARRAT, B.; ALVINERIE, P.; WRIGHT, M. Hepatic metabolism and biliary excretion of taxol in rats and humans. **Monogr Natl Cancer Inst**. v.15, p. 39-45, 1993.

MONSARRAT, B.; MARIEL, E.; COSS, S. Taxol metabolism: isolation and identification of three major metabolites in rat bile. **Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.** v.18, p. 895-901, 1990.

MOORE, P.K.; OLUYOMI, A.O.; BABBEDGE, R.C.; WALLACE, P.; HART, S.L. L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br J Pharmacol.** v.102, n.1, p.198-202, 1991.

MOOS P. J.; FITZPATRICK F. A. Taxane-mediated gene induction is independent of microtubule stabilization: induction of transcription regulators and enzymes that modulate inflammation and apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 95, p. 3896-3901, 1998.

MOREIRA, A.L.; SAMPAIO, E.P.; ZMUIDZINAS, A.; FRINDT, P.; SMITH, K.A.; KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. **J Exp Med.** v.177, p. 1675, 1993.

MORELAND L.W. The role of cytokines in rheumatoid arthritis: Inhibition of cytokines in therapeutic trials. **Drugs Today (Barc).** v.35, n. 4-5, p.309-19, 1999.

MULLER R. Hemorheological and peripheral vascular diseases: a new therapeutic approach. **J. Med.** v.12, p. 209-235, 1987.

NAGAI, Y.; AKASHI, S.; NAGAFUKU, M.; OGATA, M.; IWAKURA, Y.; AKIRA, S.; KITAMURA, T.; KOSUGI, A.; KIMOTO, M. and MIYAKE, K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. **Nat Immunol.** v.3, p. 667-72, 2002.

NAKAMURA, A.; FUJITA, M.; SHIOMI, H. Involvement of endogenous nitric oxide in the mechanism of bradykinin-induced peripheral hyperalgesia. **Br J Pharmacol.** v. 117, p. 407-412, 1996.

NAKAMURA, M.; FERREIRA, S.H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur J Pharmacol.** v.135, n. 2, p.145, 1987.

NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. **J Clin Invest.** v. 79, n. 2, p. 319, 1987.

NICOLAU, K.C.; YANG, Z.; LIU, J.J.; UENO, H.; NANTERMET, P.G.; GUY, R.K.; CLAIRBONE, C. F.; RENAUD, J.; COULADOUROS, E.A.; PAULVANNAN, K.; SORENSEN, E.J. Total synthesis of taxol. **Nature**. v. 369, p.630-634, 1994.

NOMURA, F.; ARASHI, S.; SAKAO, Y.; KAWAI, T.; MATSUMOTO, M.; NAKANISHI, K.; KIMOTO, M.; MIYAKE, K.; TAKEDA, K. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. **J Immunol**. n.1, v.164(7), p.3476-3479, 2000.

O'BRIEN, A.D.; ROSENSTREICH, D.L, SCHER I: Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: role of the LPS gene. **J Immunol**. v.124, p.20–24, 1980.

O'CONNOR, P. M.; JACKMAN, J.; BAE, I.; MYERS, T. G.; FAN, S.; MUTOH, M.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A.; SAUSVILLE, E. A.; WEINSTEIN, J. N.; FRIEND, S.; FORNANCE, A. J. JR.; KOHN, K. W. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. **Cancer Res**. v. 57, p. 4285-4300, 1997.

OKA, Y.; IBUKI, T.; MATSUMURA, K.; NAMBA, M.; YAMAZAKI, Y.; POOLE, S.; TANAKA, Y.; KOBAYASHI, S. Interleukin-6 is candidate molecule that transmits inflammatory information to the CNS. **Neuroscience**. v. 2, p.12, 2007.

OZOLS, R. F. Carboplatin and paclitaxel of advance ovarian cancer. **Cancer** (Suppl 1) v. 4, p. 7-13, 1994.

PACE, A.; BOVE, L.; ALOE, A.; NARDI, M.; PIETRANGELI, A.; CALABRESI, F.; INNOCENTI, P.; JANDOLO, B. Paclitaxel neurotoxicity: clinical and neurophysiological study of 23 patients. **Ital J Neurol Sci**. v. 18, p.73-79, 1997.

PERERA, P. Y.; MAYADAS, T. N.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; ZAKS-ZILBERMAN, M.; GOYERT, S. M.; VOGEL, S. N. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. **J Immunol**. v.166, n.1, p.574-81, 2001.

PERERA, P.Y.; VOGEL, S.N.; DETORE, G. R.; HAZIOT, A.; GOYERT, S.M. CD14-dependent and CD14-independent signaling pathways in murine macrophages from normal

and CD14 knockout mice stimulated with lipopolysaccharide or taxol. **J Immunol.** v.158, n. 9, p.4422-4429, 1997.

PEREIRA, S. J. P.; DORNELLES, N. F.; SANTOS, D. S.; CALIXTO, J. B.; MORRONE, F. B.; CAMPOS, M. M. Nociceptive and inflammatory responses induced by formalin in the orofacial region of rats: Effect of anti-TNF-alpha strategies. **Int Immunopharmacol.** Oct. 25, 2008.

PETTIPHER, E.R.; SALTER, E.D. Resident joint tissues, rather than infiltrating neutrophils and monocytes, are the predominant sources of TNF-alpha in zymosan-induced arthritis. **Cytokine.** v.8, n. 2, p.130-3, 1996.

PFEFFER, K.; MATSUYAMA, T.; KUNDIG, T.M. et al. Mice deficient for the 55 KD tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. **Cell.** v. 73, p. 457-467, 1993.

PIMENTA, C. A. M. **Aspectos culturais, afetivos e terapêuticos relacionados à dor do câncer.** 1995. 132f. Tese (Doutorado)- Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.SP,1995.

PIPER P - Leukotrienes. **Trends Pharmacol Sci.** v. 4, n. 2, p. 75-77, 1983.

POLOMANO, R.C.; MANNES, M.; BENNETT, G.J. Paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in rats. **Coc Neurosci Abstr.** v. 24, p. 381, 1998.

POTIER, P.; COLIN, D.; GUENARD, F.; GUERITTE-VOEGELEIN. Taxol derivatives, their preparation and pharmaceutical. Compositions containing them. **EP Patent** 0,253,738, 1988.

RANG H.P., BEVAN S., DRAY A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurones **Br Med Bull.** v.47, n. 3, p.534-48, 1991

RAO, S.; HORWITZ, S.B.; RINGRL I. Direct photoaffinity labeling of tubulin with taxol. **J Natl Cancer Inst.** v. 84, p. 785-788, 1992.

RAO, S.; KRAUSS, N.E.; HEERDING, J.M, et al. 3'-(P-Azidobenzamido)taxol photo labels the N-terminal 1 amino acids of beta-tubulin. **J Biol Chem.** v. 269, p. 3132-3134, 1994.

RASPE, H.; KAHLMANN, T. Disorders characterized by pain: a methodological review of population surveys. *J Epidemiol. Community Health*. v.48, p.531-537,1994.

REIMOLD AM. TNF alpha as therapeutic target: new drugs, more applications. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. v.1, n. 4, p.377-92, 2002.

RIBEIRO R.A.; DE LUCCA, F.L.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q. & FERREIRA, S.H. RNA from LPS-stimulated macrophages induces the release of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 by resident macrophages. *Mediators of Inflammation*. v. 2, p. 435-442, 1993.

RIBEIRO R.A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S.H.& DE LUCCA, F.L. Partial characterization of the RNA from LPS-stimulated macrophages that induces the release of chemotactic cytokines by resident macrophages. *Moll. Cell. Biochem*. v.148, p. 105-113, 1995.

RIBEIRO R.A.; VALE M.L.; THOMAZZI S.M.; PASCHOALATO A.B.; 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. *Eur J Pharmacol*. v. 387, n. 1, p.111-8, 2000a.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M. L.; FERREIRA S.H.; CUNHA, F.Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. *Eur J Pharmacol*. v. 391, p. 97, 2000b

ROCHA, F.A.C.; ARAGAO, A.G. JR.; OLIVEIRA, R.C.; POMPEU, M.M.L.; VALE, M.R.; RIBEIRO, R.A. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflamm Res*. v.48, n. 9, p.485, 1999.

ROCHA, J. C. S.; PEIXOTO, M. E. B.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F. Q.; JACAR, S.; ROCHA, F. A. C. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol*. v.136, p.588-596, 2002

ROCHA, F.A.C.; 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. *Eur J Pharmacol*. v.497, p.81-86, 2004

ROSENSON, R.S. Non-lipid-lowering effects of statins on atherosclerosis. *Curr Cardiol Rep*. v. 1, p.225-232, 1999.

ROUBIN, R.; MENCIA-HUERTA, J. M.; BENVENISTE, J. Release of platelet-activating factor (PAF-acether) and leukotrienes C and D from inflammatory macrophages. **Eur J Immunol.** v. 12, n. 2, p. 141-146, 1982.

ROWINSKY E.K.; DONEHOWER R. C. Paclitaxel (taxol). **New Engl J Med.** v. 332, p.1004-1014, 1995.

ROWINSKY EK. Paclitaxel pharmacology and other tumor types. **Semin Oncol.** v. 24, n. 19, p.1– 12, 1997.

ROWINSKY, E.K.; CAZENAVE, L.A.; DONEHOWER R.C. Taxol: novel investigational antimicrotubule agent. **J Natl Cancer Inst.** v. 82, p.1247-1259, 1990.

ROWINSKY, E.K.; DONEHOWER R. C. The clinical pharmacology of paclitaxel. **Semin Oncol (Suppl).** v.3, p. 16-25, 1993a.

ROWINSKY, E.K.; EISENHAEUER, E. A.; CHAUDHRY, V.; ARBUCK, S.G.; DONEHOWER, R.C. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol[®]). **Semin Oncol Suppl.** v. 20, n. 3, p.1-15, 1993b.

ROZENDO, A.B., PIZZOL F. D; FIERGENPAUR, M; ALEMIDA. S. Pharmacogenetics and Anti-Inflammatory Effect of HMG-CoA Reductase Inhibitors. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 51, n. 4, p. 520-525, 2007.

SACHS D.; CUNHA F.Q.; POOLE S.; FERREIRA S.H. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity. **Pain.** v. 96, n.1-2, p.89-97, 2002.

SAKURADA, T.; SUGIYAMA, A.; SAKURADA, C.; TANNO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K.; HARA, A.; ABIKO, Y. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochem Int.** v. 29, n. 3, p.271-8, 1996.

SALVEMINI D.; MASINI E.; ANGGARD E.; MANNAIONI, P.F.; VANE J. Synthesis of a nitric oxide-like factor from L-arginine by rat serosal mast cells: stimulation of guanylate cyclase and inhibition of platelet aggregation. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 15, n.2, p.596-601, 1990.

SANTODOMINGO-GARZON, T.; CUNHA, T. M.; VERRI JR, W. A.; VALÉRIO, D. A. R.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F.Q. Atorvastatin inhibits inflammatory hypernociception. **British Journal of Pharmacology**. v.149, p. 14-22, 2006.

SATO, S.; SUGIYAMA, M.; YAMAMOTO, M.; WATANABE, Y.; KAWAI, T.; TAKEDA, K. and AKIRA, S. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. **J Immunol**. v.171, p. 4304-10, 2003.

SCHIFF, P.B.; FANT, J.; HORWITZ, S.B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. **Nature**. v. 277, p. 665-667, 1979.

SCHIFF, P.B.; HORWITZ, S.B. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. **Proc Natl Acad Sci**. v. 77, p.1561-1565, 1980.

SCHMIDT-CHOUDHURY, A.; FURUTA, G.T.; LAVIGNE, J.A.; GALLI, S.J. & WERSHIL, B.K. The regulation of tumor necrosis factor-alpha production in murine mast cells: pentoxifylline or dexamethasone inhibits IgE-dependent production of TNF-alpha by distinct mechanisms. **Cell Immunol**. v. 171, p. 140-146, 1996.

SHEPHERD, J.; COBBE, S. M.; FORD, I.; ISLES, C.G.; LORIMER, A.R.; MACFARLANE, P.W. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland coronary prevention study group. **N Engl J Med**. v. 333, p.1301-7, 1995.

SIMES, R.J.; MARSCHNER, I.C.; HUNT, D. A Relationship between lipid levels and clinical outcomes in the Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID) trial: To what extent is the reduction in coronary events with pravastatin explained by on-study lipid levels? **Circulation**. v.105, p. 1162- 1169, 2002.

SMITH, R.A.; BAGLIONI, C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. **J Biol Chem**. v. 262, p. 6951-6954, 1987.

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

SPARREBOOM, A.; TERLLINGEN, V.O.; NOOIJEN, W.J.; BEIJNEN, J.H. Nonlinear pharmacokinetics of Paclitaxel in mice results from the pharmaceutical vehicle Cremophor EL. **Cancer Res.** v. 56, p. 2112-2115, 1996.

STEAD, R.H.; DIXON M.F.; BRAMWELL N.H.; RIDDELL R.H.; BIENENSTOCK J. Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. **Gastroenterology.** v. 97, n. 3, p. 575-85, 1989.

STERANKA, L.R.; MANNING, D.C.; DEHAAS, C.J.; FERKANY, J.W.; BOROSKY, S.A.; O'CONNOR, J.R.; VAVREK, R.J.; STEWART, J.M.; SNYDER, S.H. Bradykinin as a pain mediator, receptors are localized to sensory neurons, and antagonists has analgesic actions. **Procl. Natl. Acad. Sci.** v. 85, p. 3245, 1988.

SUBBARAMAIAH, K.; HART, J.C.; NORTON, L.; DANNENBERG, A.J. Microtubule-interfering agents stimulate the transcription of cyclooxygenase: 2. Evidence for involvement of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. **J Biol Chem.** v. 275, p.14838-45, 2000.

SUBRATA HALDAR, J.C. AND CARLO M. C. Taxol Induces *bcl-2* Phosphorylation and Death of Prostate Cancer Cells. **Cancer Research.** v. 56, n. 15, p.1253-1255, 1996.

TAIWO, Y.O.; BJERKNES, L.K.; GOETZL, E.J AND LEVINE, J.D. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. **Neuroscience.** v. 32, p. 577, 1989.

TAKEMURA, R.; WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. **Am J Physiol.** v. 246, n. 1 Pt 1, p.C1-9, 1984.

TAKEUCHI, O.; HOSHIRO, K.; KAWAI, T.; TAKADA, H.; OGAWA, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity.** n.11, v.4, p.443-451,1999.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. **International Immunopharmacology.** v.1, p.625-635, 2000.

TARTAGLIA, L.A.; WEBER, R.F.; FIGARI, I.S. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. **Proc Natl Acad Sci.** v. 88, p. 9292-9296, 1991.

TAUSZING, S.; JOUANGUY, E.; HOFFMANN, J.U.A. Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. **Proc Natl acad Sci.** v. 97, p.10520-10525, 2000.

TEIXEIRA. M.J. Epidemiologia geral da dor. In: **Dor Contexto Interdisciplinar.** 1ª ed. Curitiba: Editora Maio, 2003. Cap 2. 53-66.

TEIXEIRA. M.J. Dor neuropática. In: **Dor Contexto Interdisciplinar.** 1ª ed. Curitiba: Editora Maio, 2003. Cap 22. 343-362.

THOMAZZI, S.M. **Participação de macrófagos e citocinas (TNF- β , IL-1 e IL-8) na modulação da nocicepção induzida no modelo de contorções abdominais.**1996, Dissertação (Mestrado), 105 f. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996.

TONUSSI, C.R., FERREIRA, S.H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain.** v. 48, n.3, p. 421-7, 1992.

TOOGOOD, L. P. Progress toward the development of agents to modulate the cell cycle. **Curr. Opin. Chem. Biol.** v. 6, p. 472-478, 2002.

TOPOL, E.J. Intensive statin therapy - a sea change in cardiovascular prevention. **N Engl J Med.** v. 350, p.1562-1564, 2004.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defense. **Nature Reviews Immunology.** v.7, p.179-190, 2007.

TSUJIMOTO. M.; YOKOTA, S.; VILCEK, J & WEISSMANN, G. Tumor necrosis factor provokes superoxide anion generation from neutrophils. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 137, p. 1094, 1986.

TURK, D C.; RUDY, T E. Classification logic and strategies in chronic pain. In: TURK, D C., MELZAK, R. eds: **Handbook of Pain Assessment.** New York, The Guilford press, 1992.

TWYXCROSS RG. Ethical and clinical aspects of pain treatment in cancer patients. **Acta Anaesthesiol Scand**. v.26, n. 74, p.83-90, 1982.

VALE, M. L.; MARQUES, J. B.; MOREIRA, C. A.; ROCHA, F. A.; FERREIRA, S. H.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 304, p.102-108, 2003.

VALE M, L; MARQUES, J. B.; MOREIRA, C. A.; ROCHA, F. A.; BRITO, A. C. B.; BENEVIDES, V. M.; FERREIRA, S. H.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Antihyperalgesic effect of pen toxifylline on experimental inflammatory pain. **British Journal of Pharmacology**. v. 143, p. 833–844, 2004.

VALE M, L.; FERREIRA, S. H.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; BRITO, A. C. B.; BENEVIDES, V. M.; RIBEIRO, R. A. Anti-nociceptive effect of thalidomide on zymosan-induced experimental articular incapacitation. **European Journal of Pharmacology**. v. 536, p. 309–317, 2006.

VAN DEN BENT, M.J.; VAN RAAIJ-VAN AARSEN, V.J.; VERWEIJ, J.; DOORN, P.A.; SILLEVIS SMITT, P.A. Progression of paclitaxel-induced neuropathy following discontinuation of treatment. **Muscle Nerve**. v. 20, p. 750-752, 1997.

VARSEY, P A. Survival and long-term toxicity results of the SCOTROC study: docetaxel-carboplatina (DC) vs. Paclitaxel-carboplatina (PC). **Proc Am Soc Clin Oncol**. v. 21, p. 202a, 2002.

VAUGHAN, C.J.; MURPHY, M.B.; BUCKLEY, B.M. Statins do more than just lower cholesterol. **Lancet**. v. 348, p.1079-1082, 1996.

VEERAINDAR, G. Does Thalidomide have an analgesic effect? Current status and future directions. **Curr Pain Headache Rep**. v. 2, p.109-114, 2007.

VERBON, A., DEKKERS, P. E., TEN HOVE, T., HACK, C. E., PRIBBLE, J. P.,TURNER, T., SOUZA, S., AXTELLE, T., HOEK, F. J., VAN DEVENTER, S. J. and VAN DER POLL, T. IC14, an anti-CD14 antibody, inhibits endotoxin-mediated symptoms and inflammatory responses in humans. **J Immunol** 166: 3599-605, 2001.

VERMA-GANDHU, M.; BERCIK, P.; MOTOMURA, Y.; VERDU, E.F.; KHAN, W.I.; BLENNIE, P. A.; WANG, L. EL-SHARKAWY R. T., Collins S. M. *CD4+* T-cell modulation of visceral nociception in mice. **Gastroenterology**. v.130, n. 6, p.1721-8, 2006

VERRI, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. C. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Proc Natl Acad Sci USA**, n.20, v. 103(25), p9721-9725, 2006.

VIANA, C.F.G.; ARAGÃO, J.R. A.G.M.; RIBEIRO, R.A.; MAGALHÃES, J.F.G.; VALE, M.R. Effect of *Ageratum conyzoides* in nociception and inflammatory response induced by zymosan. **Fitoterapia**. v. LXIX, n.4, p. 349-354, 1998.

VIKHANSKAYA, F.; VIGNATI, S.; BECCAGLIA, P.; OTTOBONI, C.; RUSSO, P.; D'INCALCI, M.; BROGGINI M. Inactivation of p53 in a human ovarian cancer cell line increases the sensitivity to paclitaxel by inducing G₂/M arrest and apoptosis. **Exp. Cell Res**. v. 241, p. 96-101, 1998.

VISINTIN, A.; MAZZONI, A.; SPITZER, J. A. and SEGAL, D. M. Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to toll like receptor 4. **Proc Natl Acad Sci**. v. 98, p.12156-61, 2001.

VOGEL, S.; HIRSCHFELD, M.J.; PERERA, P.Y. Signal integration in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated murine macrophages. **J Endotoxin Res**. v.7, n. 3, p.37-41, 2001.

VON HOFF DD. The taxoids: same roots, different drugs. **Semin Oncol**. v. 24, n. 13, p.3-10, 1997.

WAAGE, A.; KAUFMANN, C.; ESPEVIK, T.; HUSBY, G. Interleukin-6 in synovial fluid from patients with arthritis. **Clin Immunol Immunopathol**. v. 50, n.3, p.394-398, 1989.

WADACHI. A & HARGREAVES. K, M Trigeminal Nociceptors Express TLR-4 and CD14: a Mechanism for Pain due to Infection. **J Dent Res**. v. 85, n.1, p. 49-53, 2006.

WAGNER, A.H.; KOHLER, T.; RUCKSCHLOSS, U.; JUST, I.; HECKER M. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMGCoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 20, p. 61–69, 2000.

WAHL, A. F.; DONALDSON, K. L.; FAIRCHILD, C.; LEE, F. Y.; FOSTER S. A.; DEMERS, G. W.; GALLOWAY, D. A. Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G₂/M arrest and apoptosis. **Nat. Med.** v. 2, p.72-79, 1996.

WANI, M.C.; TAYLOR, H.L.; WALL, M.E.; COGGAN, P.; MCPHAIL. A.T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **J Am Chem Soc.** v. 93, p. 2325-2327, 1971.

WATSON, J.M.; KINGSTON, D.G.; CHORDIA, M.D.; CHAUDHARY, A.G.; RINEHART, C.A.; HASKILL, J.S. Identification of the structural region of taxol that may be responsible for cytokine gene induction and cytotoxicity in human ovarian cancer cells. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 41, p.391– 7, 1998.

WHITE, C.M.; MARTIN, B.K.; LEE, L.F.; HASKILL, J.S.; TING, J.P. Effects of paclitaxel on cytokine synthesis by unprimed human monocytes, T lymphocytes, and breast cancer cells. **Cancer Immunol Immunother.** v.46, p.104–112, 1998.

WILSON, L. Microtubules as drug receptors: pharmacological properties of microtubule protein. **Ann N Y Acad Sci.** v.253, p.213-251, 1975.

WOJCIECH, D. & MARSHALL, J. S. New and emerging role for mast cell in defense. **Current Opinion in Immunology.** v.19, p. 31-38, 2007.

WOODS C. M.; ZHU, J.; MCQUENEY, P. A.; BOLLAG, D.; LAZARIDES, E. Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway. **Mol. Med.** v.1, p. 506-526, 1995.

WOODS, J. P.; FRELINGER, J. A.; WARRACK, G. Mouse genetic locus LPS influences susceptibility to *Neisseria meningitidis* infection. **Infect Immun.** v.56, p.1950–1955, 1988.

XIAO, W.; BOROUJERDI, A.; BENNETT, G. J.; LUO, Z. D. Chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy: analgesic effects of gabapentin and effects on expression of the alpha-2-delta type-1 calcium channel subunit. **Neuroscience.** v.19, n. 144, p. 714–720, 2007.

YOUSSEF, S.; STUVE, O.; PATARROYO, J.C.; RUIZ, P.J.; RADOSEVICH, J.L.; HUR EM. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. **Nature.** v. 420, p. 78–84, 2002.

ZAKS-ZILBERMAN, M.; ZAKS, T. Z.; VOGEL, S. N. Induction of proinflammatory and chemokine genes by lipopolysaccharide and paclitaxel (Taxol) in murine and human breast cancer cell lines. **Cytokine**. v. 15, p.156–165; 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)