

*Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia*

*Papel da IL-17 na gênese da hipernocicepção
inflamatória em modelo de artrite induzida por
antígeno em camundongos*

Larissa Garcia Pinto

Ribeirão Preto

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Larissa Garcia Pinto

*Papel da IL-17 na gênese da hipernocicepção
inflamatória em modelo de artrite induzida por
antígeno em camundongos*

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique
Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando de
Queiróz Cunha

Ribeirão Preto
2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Ficha Catalográfica

Pinto, Larissa Garcia

Papel da IL-17 na gênese da hipernocicepção inflamatória em modelo de artrite induzida por antígeno em camundongos.

Ribeirão Preto, 2010.
133p.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Farmacologia- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Sérgio Henrique Ferreira
Co-Orientador: Fernando de Queiróz Cunha

Palavras-chave: IL-17, hipernocicepção, artrite, dor inflamatória, citocinas, quimiocinas, endotelina, MMPs, migração de neutrófilos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Larissa Garcia Pinto

Papel da IL-17 na gênese da hipernocicepção inflamatória em modelo de artrite induzida por antígeno em camundongos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em: 10 de fevereiro de 2010

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira
Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Paulo Louzada Junior
Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Juliano Ferreira
Instituição: UFSM Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Dor e Inflamação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedicatória

Aos meus pais, Claive e Laerte, e ao meu irmão, Vinícius, por todo amor, carinho, compreensão... Pelo apoio em todos os momentos da minha vida, pelas palavras de incentivo, por acreditarem em meus sonhos e por estarem sempre presentes, mesmo a distância. Se hoje sou alguém e estou aqui, devo isso a vocês que me ensinaram o valor da família e nunca mediram esforços para me ajudar...

Não existem palavras para expressar todo o meu amor e minha admiração.

Vocês são tudo para mim!

Agradecimientos

Á Deus, pelo dom da vida e por me dar forças para seguir sempre em frente.

À minha família, que mesmo distante sempre esteve presente, me apoiando e incentivando. Agradeço em especial ao meu avô, que hoje sei que é uma estrela no céu que ilumina o meu caminho. Amo muito vocês!

Ao Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira, pela orientação, incentivo, confiança em meu trabalho e principalmente pela preocupação constante. Agradeço pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pela sua amizade e carinho.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha, pela sua co-orientação constante, dedicação e competência. Obrigada pelo incentivo e pela confiança em meu trabalho que foram muito importantes para o meu amadurecimento científico.

Aos Profs. Dr. Juliano Ferreira e Dr. Paulo Louzada pela disponibilidade de participar da minha banca examinadora, por me atenderem prontamente com atenção, engrandecendo as discussões deste trabalho.

Ao meu querido amigo Thiago Cunha, pela dedicação e competência que foram de fundamental importância na realização deste trabalho, mas principalmente pela confiança e paciência. Obrigada Thi por tua amizade e apoio em todos os momentos.

À Katinha, por estar sempre me apoiando, pelas palavras de incentivo e conforto em todos os momentos. Tu és uma pessoa iluminada. Agradeço a deus por fazer parte da minha vida, por ser uma grande amiga e uma mãe de coração. Muito obrigada!

Às minhas amigas e irmãs do coração:

Carla, amiga e colega desde a faculdade. Agradeço a ti amiga querida pelo teu companheirismo, pelos momentos de felicidade, descontração e até mesmo pelas lágrimas compartilhadas durante este período. Obrigada por estar sempre presente e por fazer com que a saudade de casa não seja tão grande! Não sei como seria se tu não estivesses aqui comigo...

Paula, amiga desde o curso de inverno em 2006. Muito obrigada pela amizade, lealdade e companheirismo em todos os momentos desta etapa. Não foi por acaso que tu te tornaste esta pessoa tão especial em minha vida. Ainda temos

muito que nos divertir, chorar de tanto rir e até mesmo quando estivermos tristes. Obrigada pela tua amizade verdadeira e por tornar meus dias aqui mais felizes!

À minha amiga querida, Fabi (gêmea). Muito obrigada pela tua amizade e companheirismo. Em Santa Maria não tivemos a oportunidade de conviver e principalmente de sermos amigas, mas aqui nossos caminhos se cruzaram e hoje tu és uma pessoa muito especial em minha vida. Te adoro muito guria!

À Dani Nascimento, que mesmo estando em Glasqow, está sempre presente. Muito obrigada pela tua amizade, pelas conversas científicas e principalmente pelos momentos de descontração que passamos juntas. Volta logo Dani, pois tu estás fazendo muita falta aqui...

À minha amiga amada Katarina (gêmea inversa, risos), que mesmo a distância está sempre presente e preocupada comigo. Obrigada Kate pelas conversas, conselhos e por tua amizade, que mesmo sendo recente sei que é verdadeira e para sempre.

A uma pessoa muito especial que fez parte da minha vida e que me deu forças para seguir em frente. Porã muito obrigada pelo teu apoio, compreensão e todo carinho durante grande parte desta jornada.

Ao meu querido amigo e companheiro de trabalho, Jhimmy. Agradeço pela tua amizade sincera, pelas conversas científicas e as não científicas também. Ainda temos muito que trabalhar guri.

Ao Prof. Dr. Waldiceu, pela ajuda com os experimentos iniciais deste trabalho, pelas discussões científicas, por estar disposto a me ajudar em todos os momentos que precisei e pela tua amizade.

Ao Sílvio, meu querido amigo, pela sua ajuda na realização deste trabalho, pelos momentos de descontração e por estar sempre presente durante toda esta etapa. Muito obrigada pela sua amizade!

Ao meu querido amigo Henrique, companheiro de viagem, de festas e de trabalho, pela sua ajuda em alguns experimentos deste trabalho, pelas conversas e principalmente pela tua amizade sincera. Te adoro muito Rique!

À Dionéia pela amizade e por me “apresentar” a Farmacologia da FMRP. Muito obrigada Di!

As minhas amigas de Santa Maria, colegas de faculdade e de laboratório: Fabiane, Gabi Colpo, Karine, Sessa, Si, Gabi Souto. Agradeço por ter conhecido pessoas tão íntegras como vocês e pela amizade eterna.

Aos meus queridos amigos Fabrício, Rafael e Spiller, pelo carinho e amizade sincera em todos os momentos.

Ao Thi Garlet, pela amizade, ajuda e disponibilidade na criação do esquema final deste trabalho.

À todos os amigos do laboratório de Dor e Inflamação: Adriana, Andressinha, Dani Secco, Dani Carlos, Dani Nascimento, Daniel, Fabi, Fabrício (amigo desde o curso de inverno), Fernanda (papete), Guilherme, Henrique, Jozi, Kanashiro, Maria do Carmo, Paula, Paulinha, Paulo, Rafa, Renata, Romualdo, Sabrina (papete), Sandra, Silvia, Sílvio, Spiller, Thiago Garlet, Valter, Vanessa Carregaro (Van) e Zeca. Vocês tornam nosso laboratório um ambiente muito agradável e maravilhoso de trabalhar. Adoro todos vocês!

Aos alunos de iniciação científica do laboratório: Bruno, Danilo, Eleonora, Fran, Ibraim, Maria, Morena, Tiago, Vitor, Rafaela, Marina, Camila, e principalmente a minha querida aluna de IC Fernanda. Obrigada pela amizade e por tornarem nosso laboratório um lugar mais divertido.

Aos amigos e colegas que fizeram parte do laboratório e deixaram saudades: Ana Tereza, Flávia, Luis Fernando, Mani, Marcos, Celina, e aos visitantes: em especial ao Fred, Heitor, Patrícia, Fran, Ana Carla, Larissa e Thacy.

Aos excelentes técnicos do laboratório de dor e inflamação: Diva, Fabíola, Giu, Ieda, Kátia e Serginho pela responsabilidade, amizade, dedicação, alegria e sábios ensinamentos que foram de extrema importância para a realização deste trabalho e para a minha vida. Obrigada meus amigos queridos.

Aos amigos Vanessa, Valéria e Acácio pela ajuda nesta fase de minha vida, dedicação em suas atividades, mas principalmente pela amizade.

Aos amigos do DOL, pelas produtivas discussões, mas também pela amizade.

A todos os docentes do Departamento de Farmacologia da FMRP e FCFRP-USP pelos ensinamentos e pelo convívio. Agradeço em especial aos Profs. Dr. Francisco Guimarães e Dr. Leonardo Resstel pela amizade.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva por disponibilizar os animais nocaute e os primers para a realização de alguns experimentos e a sua técnica Cristiane Milanezi, pela sua atenção.

Ao Carlo e a Van pela ajuda e disponibilidade na aquisição da parede de SCW para a realização de outros trabalhos. Muito obrigada pelo esforço e atenção de vocês.

Aos amigos da imuno e da biocel, em especial ao Gustavo, Van, Valter, Djalma, Marcelo e Joni pelas conversas e momentos de descontração. Gosto muito de vocês!

Aos amigos e colegas de pós-graduação do Departamento de Farmacologia, pelo convívio e amizade.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP: Soninha, Fátima e Ramon pela dedicação, amizade e competência nas resoluções administrativa. Obrigado pelo nosso maravilhoso convívio.

Aos bioteristas, Julio, Maria Inês e Eliana pelo cuidado com os animais do biotério, tão importantes para nosso trabalho, e principalmente pelo carinho comigo.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, pela competência, dedicação e também pelo convívio.

A CAPES pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para este trabalho e também a todos que passaram de alguma forma por minha vida durante este período.

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original”.*

Albert Einstein

Resumo

PINTO, L. G. Papel da IL-17 na gênese da hipernocicepção inflamatória em modelo de artrite induzida por antígeno em camundongos. Dissertação de Mestrado – Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

A interleucina 17 (IL-17) é uma citocina importante na fisiopatologia da artrite reumatóide (AR). No entanto, apesar de suas atividades pró-inflamatórias terem sido demonstradas, sua participação na gênese da nocicepção durante a AR não havia sido investigada. Neste trabalho, avaliamos o papel da IL-17 na gênese da nocicepção articular em um modelo de artrite induzida por antígeno (mBSA). Observamos que o desafio com mBSA na articulação fêmur-tibial de camundongos imunizados induziu uma hipernocicepção mecânica dose e tempo dependente. Além disso, a concentração local de IL-17 estava aumentada 3 e 12hs após o desafio intra-articular com mBSA. Após, verificamos que o co-tratamento dos animais desafiados com um anticorpo contra IL-17 inibiu a hipernocicepção e o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular. Demonstramos que a injeção intra-articular de IL-17 foi capaz de induzir hipernocicepção e migração de neutrófilos, os quais foram reduzidos pelo pré-tratamento com fucoidina, um inibidor da adesão leucocitária. O efeito hipernociceptivo da IL-17 foi também reduzido em camundongos deficientes para o receptor do tipo I do TNF- α e pelo pré-tratamento com infliximabe (anticorpo anti-TNF), por um antagonista dos receptores CXCR1/2 (DF-2156) e pelo antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra). Corroborando com estes achados, observamos que a injeção de IL-17 na articulação aumentou a produção de TNF- α , IL-1 β e CXCL1/KC. Além disso, o tratamento com doxiciclina (inibidor inespecífico de metaloproteinases, MMPs), bosentan (antagonista dos receptores de endotelina ET_A/ET_B), indometacina (inibidor de COX) ou guanetidina (bloqueador simpático) inibiram a hipernocicepção induzida pela IL-17. A injeção de IL-17 na

articulação também aumentou a produção de PGE₂, a atividade de MMP-9 e a expressão de RNAm na membrana sinovial de MMP-9, COX-2 e PPET-1. Estes resultados sugerem que a IL-17 é uma citocina pró-nociceptiva na artrite induzida por mBSA e seu efeito é dependente da migração de neutrófilos e de vários mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β , quimiocina CXCL1/KC, MMPs, endotelinas, prostaglandinas e aminas simpáticas. Deste modo, podemos propor a IL-17 como um alvo terapêutico para o controle dos sintomas da AR.

Palavras-chave: IL-17, hipernocicepção, artrite, dor inflamatória, citocinas, quimiocinas, endotelina, MMPs, migração de neutrófilos.

Abstract

PINTO, L. G. **Role of IL-17 in the genesis of inflammatory hypernociception in model of antigen-induced arthritis in mice.** Thesis (Master) – Department of Pharmacology of the School of Medicine of Ribeirao Preto – University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP.

IL-17 is an important cytokine in the pathophysiology of rheumatoid arthritis (RA), produced mainly by a novel subset of Th cells, named Th17. Although the pro-inflammatory action of IL-17 has been shown, its participation in the genesis of nociception during RA was not elucidated. In this study, we evaluated the role of IL-17 in the genesis of articular nociception in a model of antigen (mBSA)-induced arthritis. We found that mBSA challenge in the femur-tibial joint of immunized mice induced a dose- and time-dependent mechanical hypernociception. The local IL-17 concentration within the mBSA-injected joints increased significantly 3 and 12 h after challenge. Moreover, co-treatment of mBSA challenged mice with an antibody against IL-17 inhibited hypernociception and neutrophil recruitment. In agreement, intraarticular injection of IL-17 induced hypernociception and neutrophil migration, which were reduced by the pre-treatment with fucoidin, a leukocyte adhesion inhibitor. The hypernociceptive effect and the neutrophil recruitment of IL-17 were also reduced in TNFR1^{-/-} mice and by pre-treatment with infliximab (anti-TNF antibody), a CXCR1/2 antagonist or by an IL-1 receptor antagonist (IL-1ra). Consistent with these findings, we found that IL-17 injection into joints increased the production of TNF- α , IL-1 β and CXCL1/KC. Treatment with doxycycline (nonspecific MMPs inhibitor), bosentan (ET_A/ET_B antagonist), indomethacin (COX inhibitor) or guanethidine (sympathetic blocker) inhibited IL-17-induced hypernociception. IL-17 injection also increased PGE₂ production, MMP-9 activity and COX-2, MMP-9 and PPET-1 mRNA expression in synovial membrane. These results suggest that IL-17 is a novel pro-nociceptive cytokine in mBSA-induced arthritis, whose effect depends on

both neutrophil migration and various pro-inflammatory mediators, as TNF- α , IL-1 β , CXCR1/2 chemokines ligands, MMPs, endothelins, prostaglandins and sympathetic amines. Therefore, it is reasonable to propose IL-17 targeting therapies to control this important RA symptom.

Key words: IL-17, hypernociception, arthritis, inflammatory pain, cytokines, chemokines, endothelin, MMPs, neutrophil migration.

Lista de abreviaturas

(-/-): deficientes para

AIA: artrite induzida por antígeno

AIZ: artrite induzida por zimosan

AINEs: antiinflamatórios não esteroidais

ANOVA: análise de variância

AR: artrite reumatóide

BK: bradicinina

C5a: quinto fragmento do sistema complemento ativado

CaCl₂: cloreto de cálcio

CFA: adjuvante completo de Freund

Cg: carragenina

CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CIA: artrite induzida por colágeno do tipo II

COX: cicloxigenase

CTL: controle

CXCL: quimiocina CXC ligante

DNA: ácido deoxiribonucleico

ESL-1: ligante para selectina E-1

ET: endotelina

ET_A: Receptor A para ET

ET_B: Receptor B para ET

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

ELISA: ensaio imunoenzimático

E.P.M.: erro padrão da média

FI: falso-imunizado

g: grama (s)

GM-CSF: fator de estimulação de colônias macrófago- granulócito

h: hora

hs: horas

i.a.: intra-articular

i.p.: intra-peritoneal

i.pl.: intraplantar

i.v.: intra-venoso

IASP: Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain*)

ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1

IFN: interferon

Ig: imunoglobulina

IL: interleucina

IL-1ra: antagonista do receptor de IL-1

IM: imunização/ imunizado

KC/ CXCL1: quimiocina derivada de queratinócitos

KCl: cloreto de potássio

KH₂PO₄: fosfato de potássio monobásico

Kg: quilograma (s)

KO: nocaute (*knockout*)

L: litro (s)

LPS: lipopolissacarídeo

LT: leucotrieno

LTB₄: leucotrieno B₄

μg: micrograma (s)

mg: miligrama (s)

min: minuto (s)

μL: microlitro (s)

mL: mililitro (s)

mm²: milímetros quadrados

mBSA: albumina bovina sérica metilada

MMP: metaloproteinase da matriz extracelular

MPO: mieloperoxidase

n/ n^o: número

ng: nanograma (s)

nm: nanômetros

NaCl: cloreto de sódio

Na₂HPO₄: fosfato de sódio dibásico

NaOH: hidróxido de sódio

NF-κB: fator de transcrição nuclear kappa B

NGF: fator de crescimento do nervo

NK: matadora natural (*Natural Killer*)

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

NOS-2: óxido nítrico sintase 2 (isoforma induzida)

OPD: ortofenilenodiamino-2HCl

OVA: ovalbumina

PA: para análise

PAF: fator de agregação plaquetária

PBS: tampão salina fosfato

PECAM: molécula de adesão célula endotelial-plaqueta

PGE₂: prostaglandina E₂

pmol: picomol

PPET-1: Prepro-ET-1

PSGL-1: ligante glicoproteína para selectina P-1

RANTES: citocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais

RIA: radio imuno ensaio

RNA: ácido ribonucléico

RNA_m: RNA mensageiro

RT-PCR: transcriptase reversa- reação em cadeia da polimerase

s.c.: subcutânea

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de policrilamida de dodecil sulfato de sódio

SP: substância P

TCR: receptor de células T

Th: T auxiliar (*helper*)

TLR-2: receptor Toll-like 2

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

TRPV1: receptor de potencial transiente subfamília V membro 1

v.o.: via oral

VCAM: molécula de adesão vascular

Sumário

1. Introdução	27
1.1. <i>Artrite reumatóide.....</i>	28
1.2. <i>Dor Inflamatória</i>	30
1.3. <i>Interdependência entre migração de neutrófilos e hipernocicepção</i>	38
1.4. <i>Modelos experimentais de hipernocicepção articular.....</i>	41
1.5. <i>Células Th17.....</i>	43
1.6. <i>Interleucina 17 (IL-17).....</i>	46
2. Objetivos	49
<i>Objetivo geral.....</i>	50
<i>Objetivos Específicos</i>	50
3. Material e métodos	51
3.1. <i>Animais.....</i>	52
3.2. <i>Preparo de soluções, drogas e reagentes</i>	52
3.3. <i>Indução de artrite experimental.....</i>	55
3.3.1. <i>Artrite induzida por antígeno (AIA).....</i>	55
3.3.2. <i>Artrite induzida por zimosan (AIZ).....</i>	56
3.4. <i>Avaliação nociceptiva articular</i>	56
3.5. <i>Determinação farmacológica dos mediadores inflamatórios envolvidos na hipernocicepção e migração de neutrófilos para a articulação em modelo de AIA.....</i>	59
3.6. <i>Quantificação da migração leucocitária ao tecido articular.....</i>	60
3.7. <i>Contagem total dos leucócitos</i>	60
3.8. <i>Contagem diferencial dos leucócitos</i>	61
3.9. <i>Dosagem de Citocinas</i>	61
3.10. <i>Avaliação da expressão de genes.....</i>	62
3.11. <i>Gel de zimografia.....</i>	64

3.12. <i>Determinação da produção de prostaglandina</i>	65
3.13. <i>Análise Estatística</i>	65
4. Resultados	67
4.1. <i>mBSA induz hipernociceção articular em camundongos</i>	68
4.2. <i>A IL-17 participa da hipernociceção articular induzida por antígeno</i>	70
4.3. <i>Envolvimento das citocinas e quimiocinas no efeito hipernociceptivo da IL-17</i>	75
4.4. <i>Relação entre a hipernociceção mecânica articular induzida pela IL-17 e a migração de neutrófilos para a cavidade articular</i>	83
4.5. <i>Papel das MMPs no efeito hipernociceptivo causado pela IL-17</i>	90
4.6. <i>Endotelina medeia a hipernociceção articular induzida pela IL-17</i>	94
4.7. <i>O efeito hipernociceptivo da IL-17 é dependente de prostanóides e aminas simpáticas</i>	96
5. Discussão	99
6. Conclusão	111
7. Referências	113
8. Anexos	133

1. Introdução

1.1. *Artrite reumatóide*

O processo inflamatório é gerado em decorrência de uma injúria tecidual, do contato do organismo com agentes infecciosos como bactérias, vírus e fungos ou ainda, de forma inapropriada através do reconhecimento de componentes do organismo como sendo não próprios pelo sistema imune. Neste último caso, a inflamação acaba sendo prejudicial ao organismo, contribuindo para o estabelecimento das lesões teciduais como as que ocorrem em algumas doenças inflamatórias, entre elas a artrite reumatóide (AR) (Weissmann & Korchak, 1984; Weiss, 1989).

A AR é uma doença inflamatória crônica com patogênese auto-imune e etiologia desconhecida que apresenta manifestações locais e sistêmicas (Firestein, 2003). É uma enfermidade reumática que abrange em torno de 1% da população ocidental e é associada com alta morbidade e mortalidade, justificando os esforços na elucidação de sua patogênese, diagnóstico e tratamento (Harris, 1990).

A AR é uma artrite poli-articular simétrica que acomete principalmente as pequenas articulações das mãos e dos pés, e também os joelhos. Além da inflamação na membrana sinovial, ocorre à formação do *pannus* (interface entre a cartilagem e o sítio com erosão ativa) o qual invade e destrói as estruturas articulares locais. A sinóvia é normalmente uma estrutura constituída por poucas camadas de células (1-3) formando um revestimento em torno da articulação. Durante a AR, fluido nos espaços peri-articulares e um grande infiltrado de neutrófilos, células T, células B e macrófagos, além da proliferação de sinoviócitos do tipo fibroblastos e do tipo macrófago na cavidade articular e sinóvia tornam a camada de revestimento hiperplásica. Além disso, começam a ser expressas no

local, enzimas degradativas, incluindo as metaloproteinases, serina proteases e agrecanases, as quais digerem a matriz extracelular ocasionando erosão e destruição da cartilagem e osso (Firestein, 2003; Harris et al., 1990).

Como mencionado acima, o infiltrado celular tem sido associado aos principais danos teciduais observados durante a artrite reumatóide, os neutrófilos são as células presentes em maior quantidade, sendo cerca de 90% do infiltrado leucocitário no fluido sinovial, na cartilagem e no pannus de pacientes com artrite reumatóide, particularmente nos estágios iniciais e fases de recidiva da doença (Hollingsworth et al., 1967; Mohr, 1995). Análises morfológicas revelam que esses polimorfonucleares são ativados e degranulados, provavelmente como resultado da associação com imuno-complexos, fragmentos de cartilagem, citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-8, TNF- α , IL-15, IL-17) e quimiocinas (IL-8). O acúmulo de produtos potencialmente lesivos no fluido sinovial ocorre devido aos processos de ativação, fagocitose e morte celular de neutrófilos *in situ* (Mitani et al., 2001). Uma vez recrutado para as articulações, os neutrófilos ficam expostos a uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias as quais aumentam sua atividade na liberação de mediadores citotóxicos que irão contribuir para a destruição destas articulações (Feldmann et al., 1990).

A dor é um dos principais sintomas da artrite reumatóide, levando o paciente a procurar tratamento, uma vez que esta incapacita a realização de atividades diárias, comprometendo a qualidade de vida do indivíduo. A dor na artrite pode ocorrer enquanto a articulação é mantida imóvel, mas principalmente esta é induzida ou agravada durante movimentos ou com a estimulação mecânica da articulação afetada, como quando recebe uma sobrecarga de peso (Kellgren, 1939). Durante a inflamação articular, numerosos neurônios aferentes primários peri-articulares são

sensibilizados. Além disso, a inflamação articular causa sensibilização periférica e central (Schaible et al., 2002).

1.2. *Dor Inflamatória*

A dor foi apontada por Cornelius Celsius (30 a.C. – 38 d.C.) como sendo um dos sinais cardinais clássicos da inflamação aguda. O organismo possui diversos sistemas responsáveis pelo controle da homeostasia, dentre eles a dor tem papel de destaque, pois atua como um mecanismo de alerta do corpo, pois “informa” que algo está ameaçando nosso bem-estar e retém nossa atenção até que a sua causa tenha sido identificada e afastada (Wall, 1999). Neste sentido, a dor é um sintoma clinicamente importante para a detecção e avaliação de muitas doenças.

Atualmente a dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”. Nosso grupo vem trabalhando com uma forma mais simplificada dessa definição, considerando a dor a **“percepção desagradável de uma sensação nociceptiva”**. Este conceito também envolve dois componentes da dor, a nocicepção e a sua percepção. A nocicepção (do latim *nocere*, “ferir”), ou sensação nociceptiva, resulta da detecção seletiva de estímulos capazes de comprometer a integridade física de um organismo. A percepção é uma função integrativa modulada por condições emocionais, motivacionais e psicológicas, bem como experiências de vida de cada pessoa. A partir dessas considerações, dor seria o termo mais adequado quando se refere ao ser humano, enquanto nocicepção seria mais

indicado para animais experimentais, uma vez que não se entende a percepção nos mesmos (Noback et al., 1996).

Portanto, além de envolver a percepção dos estímulos nocivos pelo sistema nervoso central quando receptores sensoriais especializados (nociceptores) são ativados, a dor apresenta um componente afetivo-motivacional, incluindo atenção e aprendizagem (Loeser & Melzack, 1999; Noback et al., 1996).

Os nociceptores são terminações nervosas livres, ramificadas e não-mielinizadas, de uma família específica de neurônios sensoriais primários. O termo nociceptor também é comumente utilizado para definir o neurônio nociceptivo primário como um todo, não apenas as suas terminações nervosas livres, sendo que neste trabalho, quando se utilizar esse termo, estará tratando do neurônio nociceptivo. Os nociceptores são neurônios pseudo-unipolares, possuindo um ramo axonal distal, que se dirige à periferia, e outro ramo axonal proximal, que se dirige ao corno dorsal da medula espinal ou ao tronco cerebral. Os estímulos nocivos (ou nociceptivos) sejam eles físicos (mecânicos ou térmicos) ou químicos (bradicinina, capsaicina, serotonina, prótons etc.), são detectados por nociceptores presentes nos diferentes tecidos. Eles inervam amplamente pele, mucosas, músculos, articulações e vísceras. Os nociceptores que inervam a cabeça e o pescoço vão compor os nervos cranianos e possuem seus corpos celulares, principalmente, no gânglio trigeminal. Já os corpos celulares das fibras que inervam o tronco e membros estão nos gânglios da raiz dorsal (GRDs) dos nervos espinais (Julius & Basbaum, 2001; Kandel et al., 2000; Millan, 1999).

A estimulação dos nociceptores periféricos faz com que a informação nociceptiva seja conduzida através das fibras aferentes primárias (neurônios de primeira ordem) ao SNC. Essas fibras são classificadas, de acordo com seu

diâmetro, estrutura, velocidade de condução, intensidade e qualidade da dor, essencialmente em dois tipos: 1) fibras C: finas (0,4 a 1,2 mm de diâmetro), não mielinizadas e de condução lenta (0,5 a 2 m/s), sendo responsáveis pela dor de longa duração e difusa, e 2) fibras A δ : médias (2 a 6 mm de diâmetro), pouco mielinizadas, de condução intermediária (2 a 30 m/s) e responsáveis pela dor de curta duração, aguda e lancinante, sentida após uma estimulação nociva. As fibras A δ respondem apenas a estímulos nocivos mecânicos e térmicos, já as fibras C respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, sendo assim chamadas de polimodais. Além dessas, existe outra fibra, as fibras A β , de maior diâmetro e muito mielinizadas, responsáveis pela detecção de estímulos inócuos (ex. táteis), que podem passar a responder como nociceptores durante certos processos patológicos, como nas neuropatias, onde ocorre uma plasticidade neuronal (Basbaum et al., 2009).

Dentro do grupo das fibras C, existe uma população de neurônios que apresentam alto limiar de ativação, os chamados nociceptores silenciosos (“silent” ou “sleeping”), que são uma pequena proporção das fibras aferentes, os quais normalmente não são responsivos a estímulos térmicos ou mecânicos. Entretanto, durante um processo inflamatório esses neurônios passam a ser mais facilmente ativáveis, tornando-se responsivos a estímulos sensoriais (Schaible & Schmidt, 1988).

As fibras C são classificadas em dois grupos, de acordo com o seu conteúdo de peptídeos e a localização de seus terminais sinápticos no corno dorsal da medula espinal. As fibras C peptidérgicas sintetizam e liberam peptídeos como substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), e expressam TrkA, o receptor tirosina quinase de alta afinidade para o fator de crescimento do nervo

(NGF). O outro grupo de fibras C denominadas não-peptidérgicas expressa o receptor purinérgico P2X₃, um subtipo específico de canal ativado por ATP, e podem ser marcadas com isolectina B4 (IB4) (Julius & Basbaum, 2001).

É importante ressaltar que, de maneira simplificada, um estímulo nociceptivo na periferia é reconhecido por moléculas sinalizadoras específicas (TRPV1, etc.) presentes nos nociceptores, convertida em impulsos elétricos e transmitida pelos nervos espinais e cranianos aos neurônios de segunda e terceira ordem no SNC. Os nociceptores que transmitem a informação nociceptiva de estruturas cranianas contraem sinapses diretamente com os neurônios secundários, em núcleos no tronco cerebral. Já os presentes nos membros e tronco conduzem a informação nociceptiva para o SNC através da raiz dorsal da medula espinal, onde contraem sinapses com neurônios de segunda ordem. Estas sinapses ocorrem no corno dorsal da medula espinal na substância cinzenta, que foi dividida em 10 lâminas, sendo a lamina I a mais superficial, a partir da região dorsal (Rexed, 1954). A comunicação entre os neurônios nociceptivos primários e secundários depende da liberação de vários neurotransmissores, como o glutamato, SP entre outros (Liu et al., 1997; Schneider & Perl, 1994).

As fibras A δ conduzem informações para áreas nociceptivas específicas nas lâminas I e II da superfície do corno dorsal da medula espinal e também para neurônios na lâmina V, os quais codificam tanto informações de estímulos inócuos quanto nocivos, e as fibras C contraem sinapse com neurônios secundários presentes principalmente na lamina II. Por outro lado, fibras amplamente mielinizadas A β transmitem informações como toque leve ou estímulos mecânicos inócuos para estruturas no corno dorsal da medula espinal nas lâminas III, IV e V (Cousins & Cohen, 2005).

Após a informação nociceptiva ser propagada dos neurônios primários para os secundários e sofrer todas as modulações, ela ascende através de diferentes tratos nervosos, incluindo o trato espinotalâmico e espinoreticulotalâmico, os quais transmitem a informação nociceptiva ao tálamo, tronco cerebral (núcleo parabraquial) e amígdala. No tálamo essa informação converge para o córtex somato-sensorial, fornecendo informações sobre a localização e a intensidade do estímulo doloroso. As projeções do núcleo parabraquial (tronco cerebral) e amígdala convergem para o córtex insular e cingular contribuindo com o componente afetivo emocional da experiência dolorosa (percepção) (Basbaun et al., 2009; Noback et al., 1996).

A sensibilização dos nociceptores (diminuição do limiar de dor) é um dos eventos que ocorre durante o desenvolvimento do processo inflamatório. A dor de origem inflamatória resulta, basicamente, da interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos por meio da participação de mediadores inflamatórios (Flórez, 1993).

Alterações plásticas nos neurônios que transmitem a nocicepção são responsáveis pelas modificações nas sensações dolorosas observadas durante o processo inflamatório (Millan, 1999). A plasticidade neuronal pode ocorrer tanto em nível periférico quanto central. Ela é importante no aparecimento de dois fenômenos da dor inflamatória: a hiperalgesia e a alodinia. Hardy et al. (1950) definiram hiperalgesia como “um estado de intensificação da sensação dolorosa mediante uma estimulação nociva”, enquanto alodinia é definida pela IASP como “a dor decorrente de um estímulo normalmente não doloroso”. Enquanto o aparecimento do fenômeno de hiperalgesia parece estar associado, principalmente, à sensibilização dos nociceptores (sensibilização periférica), o processo de alodinia

parece também envolver uma plasticidade neuronal no sistema nervoso central, em especial na medula espinal (Woolf & Salter, 2000; Zeilhofer & Zeilhofer, 2008).

É importante ressaltar que as definições de hiperalgesia e alodinia foram elaboradas para serem usadas em humanos, pois a alodinia possui uma característica fundamental que é induzir também uma mudança qualitativa na percepção da sensação esperada com base nas características do estímulo aplicado, ou seja, ocorre uma perda da especificidade da modalidade sensorial (ex. estímulos táteis causam dor). Assim, alodinia é uma característica principalmente das neuropatias, as quais se caracterizam por lesões neuronais, fazendo com que estímulos de pouca intensidade e pequena duração passem a causar dores lancinantes ou sensações de queimação contínua. Contudo, esta característica de alteração da percepção não pode ser avaliada nos modelos experimentais usuais de nocicepção animal, embora o uso impróprio deste termo tenha se generalizado nas descrições do modo de ação e nas pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos para tratamento de doenças como as neuropatias. Em função disso, a diminuição do limiar nociceptivo, que ocorre durante a inflamação, será referida neste texto como hipernocicepção inflamatória ou, simplesmente, hipernocicepção, quando houver referências a experimentos de nocicepção animal, e como hiperalgesia, quando ocorrer no homem.

Os mediadores inflamatórios liberados durante a resposta inflamatória, no que se refere à dor, podem ser divididos em dois grupos: os mediadores hiperalgésicos/hipernociceptivos intermediários e os mediadores hiperalgésicos/hipernociceptivos finais. Os primeiros são liberados no início e durante a inflamação, sendo responsáveis pela liberação de outros mediadores. Já os mediadores finais interagem diretamente com seus receptores específicos,

presentes nos neurônios aferentes primários, provocando sua sensibilização (Cunha et al., 2007).

Dentre os mediadores finais podemos destacar as prostaglandinas (PGs) e as aminas simpatomiméticas (noradrenalina e dopamina), como substâncias que sensibilizam diretamente os nociceptores, desencadeando a hipernocicepção (Ferreira et al., 1978; Nakamura e Ferreira, 1987). Além destes, a endotelina também pode agir sensibilizando diretamente os nociceptores (Ferreira et al., 1989). A liberação destes mediadores hipernociceptivos finais, geralmente, é precedida pela liberação de mediadores hipernociceptivos intermediários. Entre os mediadores intermediários destacam-se as citocinas como sendo os mediadores que possuem papel mais bem caracterizado na dor inflamatória (Verri et al., 2006b).

Nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a demonstrar a participação das citocinas durante o processo inflamatório. Em 1988, Ferreira et al. demonstraram que a IL-1 β induz hipernocicepção via indução da enzima cicloxigenase (COX) e conseqüentemente liberação de PGs, o que foi também demonstrado por outros pesquisadores (Schweizer et al., 1988; Watkins et al., 1994). Em um segundo trabalho, Cunha et al. (1991) demonstraram que uma outra citocina participa da hipernocicepção inflamatória, a IL-8, e que sua ação é dependente da liberação de aminas simpáticas.

Alguns trabalhos da literatura demonstraram que citocinas possuem a propriedade de estimular a liberação de outras citocinas como, por exemplo, o TNF- α , que induz a produção de IL-1 β (Dinarello et al., 1986). Sabendo disso, nosso grupo demonstrou, de maneira pioneira, que a liberação dos mediadores finais da hipernocicepção é precedida por uma cascata de liberação de citocinas, sendo o TNF- α uma citocina chave nesta cascata. Utilizando modelo de hipernocicepção

mecânica em ratos, foi observado que o TNF- α liberado após a administração de carragenina ou LPS, ativa duas vias hipernociceptivas distintas. De um lado, o TNF promove a liberação de IL-6 e IL-1 β as quais estimulam a produção de prostanóides e, por outro lado, estimula a liberação de IL-8/CINC-1 que estimulam a produção/liberação de aminas simpáticas (Cunha et al., 1992; Lorenzetti et al., 2002).

Sabendo-se que existia uma hierarquia de liberação entre os mediadores e a importância das citocinas na ligação entre o estímulo inflamatório e a liberação de mediadores finais responsáveis pela sensibilização dos nociceptores em ratos, Cunha et al. (2005) investigaram se o mesmo ocorria em camundongos, e demonstraram que existe uma cascata de citocinas, mas com uma diferença importante na hierarquia de liberação entre as citocinas. Em camundongos, a hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina depende não só do TNF- α , mas também da quimiocina KC, sendo as primeiras citocinas a serem liberadas e após sucedidas pela IL-1 β , que estimula a produção de PGs. Além disso, a KC também induz a liberação de aminas simpatomiméticas.

Outro mediador hipernociceptivo importante são as endotelinas. As endotelinas foram identificadas inicialmente como um peptídeo com potente atividade vasoconstritora (Yanagisawa et al., 1988). Ferreira et al. (1989) demonstraram pela primeira vez que as endotelinas também apresentavam efeito hipernociceptivo. Neste estudo, foi demonstrado que a ET-1 induzia hipernocicepção no modelo de pressão constante na pata de ratos, que não foi alterada pelos tratamentos com indometacina ou guanetidina, sugerindo um efeito independente de prostaglandinas ou aminas simpáticas. No entanto, a administração intraperitoneal

de ET-1 em camundongos induziu contorções abdominais dependente de prostaglandinas.

Recentemente, foi demonstrado que a IL-18, uma citocina encontrada em altos níveis no fluido sinovial de pacientes com AR, com atividades pleiotrópica na regulação da resposta celular, apresenta atividade hipernociceptiva nos modelos de pressão constante e crescente na pata de ratos por um mecanismo que não envolve a participação de prostaglandinas e aminas simpáticas, mas dependente de endotelinas via receptores do subtipo ET_B (Verri et al., 2004). Foi demonstrado, ainda, que as endotelinas também estão envolvidas na hipernocicepção induzida por outras citocinas além da IL-18, como a IL-12, via receptores ET_B, e a IL-15, via receptores ET_A. Além disso, a hipernocicepção induzida pela IL-15 depende da liberação seqüencial de IFN- γ --> ET-1 (endotelina-1) --> PGE₂ (Verri et al., 2005; 2006a; 2007). Dessa forma, os efeitos hipernociceptivos induzidos pela endotelina podem variar conforme a espécie animal e o modelo experimental, podendo ser diretos ou indiretos.

1.3. Interdependência entre migração de neutrófilos e hipernocicepção

A migração de leucócitos para o local da injúria é uma etapa essencial da resposta inflamatória. Os primeiros leucócitos a migrarem são os neutrófilos permanecendo geralmente de 12-24 horas no local da injúria, sendo eliminados devido a apoptose, seguida de fagocitose por macrófagos. A partir da décima hora eosinófilos, macrófagos e linfócitos começam a aparecer, permanecendo no local em torno de uma semana, porém se o agente agressor não for removido ocorre a cronificação do processo (McInnes et al. 1997; Savill, 1997).

O processo de migração de neutrófilos consiste em várias etapas iniciando pelo rolamento sobre as células endoteliais o qual é mediado pela expressão de uma família de moléculas de adesão denominadas selectinas (L-, P- e E-selectinas) (Watson et al., 1990). As selectinas endoteliais (P- e E-selectinas) ligam-se, através de seu domínio lectina, à região sialil-Lewis-X de certas glicoproteínas expostas na membrana dos leucócitos, como as moléculas PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) e ESL-1 (*E-selectin ligand-1*) (Yang et al., 1999). A L-selectina, expressa constitutivamente por todos os leucócitos, liga-se a um grupo de oligossacarídeos sialomucina presente na superfície das células endoteliais (Jones et al., 1993; Lawrence & Springer, 1993; Simon & Green, 2005; Smith et al., 1999). Estas ligações específicas, embora fracas, resultantes da interação entre as selectinas e seus ligantes, favorecem a diminuição da velocidade com que os neutrófilos passam pelos vasos sanguíneos.

Após ocorre a ativação das integrinas presentes nos neutrófilos combinada com um aumento na expressão das moléculas da superfamília das imunoglobulinas no endotélio, resultando em uma interação e forte adesão entre os neutrófilos e as células endoteliais (Hentzen et al., 2000; Hynes, 1992a; b). A transmigração é o passo final do recrutamento de neutrófilos, no qual essas células ultrapassam a parede endotelial principalmente através das junções intercelulares presentes entre as células endoteliais (diapedese), degradando a membrana basal com o auxílio de enzimas proteolíticas, ultrapassando a barreira endotelial.

O processo da migração de neutrófilos é intermediado por diferentes mediadores inflamatórios e quimiotáticos, os quais promovem um aumento nas interações entre os neutrófilos e as células endoteliais, favorecendo a migração destes leucócitos a favor do gradiente de concentração entre a área lesada e as

vênulas pós-capilares (Huttenlocher et al., 1995). Dentre essas substâncias, destacam-se as citocinas, como a IL-1 β e TNF- α , vários mediadores inflamatórios incluindo LTB₄, PAF, histamina, C5a, e várias quimiocinas, como IL-8 induzem a migração de neutrófilos por aumentar a expressão de moléculas de adesão nos neutrófilos e nas células endoteliais, assim como induzir a liberação de outros fatores quimioatraentes (Brinder et al., 1999; Burke-Gaffney & Hellewell, 1996; Fricke et al., 1985; Macmillan & Foster, 1988; Mantovani & Dejana, 1998).

Os neutrófilos, uma vez presentes no foco inflamatório, são capazes tanto de fagocitar e destruir microorganismos como promover dano tecidual através de enzimas proteolíticas e de mecanismos dependentes de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Lehrer et al., 1988). Este fenômeno pode ocorrer em doenças auto-imunes como a artrite reumatóide, onde o infiltrado inflamatório crônico na membrana sinovial é considerado o principal responsável pelas lesões articulares que ocorrem nos quadros agudos da doença (Kitsis & Weissmann, 1991).

Antigamente, acreditava-se que a formação de edema, dor inflamatória e o infiltrado leucocitário constituíam processos independentes. Entretanto, a partir da década de 80 vários estudos passaram a demonstrar uma relação entre recrutamento de leucócitos e hipernocicepção.

Levine et al. (1984) demonstraram que a resposta hipernociceptiva induzida pelo LTB₄ é abolida através da depleção de leucócitos. De acordo, recentemente um trabalho do nosso grupo demonstrou no modelo de hipernocicepção articular que o LTB₄ induz uma resposta pró-nociceptiva dependente de neutrófilos e que existe uma interdependência entre estes eventos, uma vez que o pico de hipernocicepção corresponde ao pico de migração leucocitária articular. Além disso, o tratamento com fucoidina (um inibidor da adesão de leucócitos) inibiu a resposta

hipernociceptiva produzida pelo zimosan e também a migração de neutrófilos para a articulação (Guerrero et al., 2008).

De maneira similar, outro trabalho do nosso laboratório demonstrou que o pré-tratamento dos camundongos com fucoidina inibe a hipernocicepção mecânica plantar induzida pela carragenina, porém não inibe a resposta pró-nociceptiva plantar causada pela PGE₂ e dopamina, já que estas não são dependentes de neutrófilos. Além disso, no mesmo estudo foi demonstrado que a hipernocicepção plantar induzida pelo TNF- α , IL-1 β e CINC-1 foi inibida pela fucoidina, o que sugere, portanto que os neutrófilos estão envolvidos na produção dos mediadores que agem sensibilizando diretamente os nociceptores (Cunha et al., 2008c).

Em outro estudo do nosso grupo, Ting et al. (2008) demonstraram que a resposta hipernociceptiva plantar induzida pelo C5a é dependente de neutrófilos, pois a depleção dos neutrófilos resultou em redução da resposta hipernociceptiva. Importante salientar que a resposta hipernociceptiva provocada pelo C5a é independente da liberação de citocinas. Portanto, tais evidências corroboram com a hipótese da existência de relação entre nocicepção e migração de leucócitos.

1.4. Modelos experimentais de hipernocicepção articular

Vários modelos experimentais têm sido utilizados para investigar os mecanismos envolvidos na hipernocicepção inflamatória observada em doenças de origem imune, como a artrite reumatóide. No entanto, muitos deles utilizam como ferramenta respostas inflamatórias contra estímulos inespecíficos, como adjuvante completo de Freund (CFA), zimosan, entre outros (Cook & Nickerson, 2005; Inglis et al., 2005; Rocha et al., 2004).

Keystone et al. (1977), demonstraram pela primeira vez que a administração intra-articular de zimosan, o qual é um glicano derivado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, na articulação fêmur-tibial de camundongos, foi capaz de induzir artrite inflamatória crônica, com infiltrado de células mononucleares, hipertrofia sinovial e formação de *pannus*.

Recentemente Guerrero et al. (2006), com o intuito de suprir, ou ao menos diminuir, a deficiência existente em modelos para se avaliar dor articular em camundongos desenvolveu um método de avaliação da nocicepção articular que consiste na flexão da articulação tibio-tarsal, a qual foi previamente sensibilizada através de injeção intra-articular de zimosan. Em um outro trabalho, a mesma autora demonstrou que o zimosan injetado na articulação tibio-tarsal de camundongos induz um processo inflamatório caracterizado por infiltrado de neutrófilos, com envolvimento de prostanóides, LTB₄ e PAF (Guerrero et al., 2008 e dados não publicados).

O estudo com modelos de artrite induzida por antígeno (AIA) propicia a observação de respostas imunes mais próximas daquelas observadas na artrite humana, promovendo um estudo mais acurado da patogênese da dor nesta doença. Deste modo, nos últimos anos, vários grupos de pesquisa, inclusive o nosso, tem utilizado o modelo de AIA para um melhor entendimento do papel de diferentes mediadores inflamatórios nos processos de migração celular e hipernocicepção presentes na artrite.

Cunha et al. (2003), utilizando um modelo de AIA, demonstraram que a administração intraplantar de ovalbumina (antígeno proteico) em ratos previamente imunizados induz hipernocicepção mecânica, dose e tempo dependentes. A participação de citocinas como mediadores intermediários, entre o reconhecimento

deste estímulo e a liberação dos mediadores finais da hipernocicepção mecânica (prostaglandinas e aminas simpáticas), também foram demonstradas.

De modo similar, trabalhos posteriores do nosso laboratório, porém utilizando como antígeno solúvel, a proteína albumina bovina sérica metilada (mBSA) associada ao CFA, o qual é utilizado para dirigir a resposta imune para o padrão Th1, demonstraram que a administração do antígeno intraplantar e na articulação tíbio-tarsal de camundongos previamente imunizados produz diminuição do limiar nociceptivo de forma dose e tempo dependente (Cunha et al., 2008b; Verri et al., 2008). No estudo de Cunha et al. (2008b), o efeito hipernociceptivo intraplantar do mBSA depende da liberação de TNF- α , IL-1 β e KC, agindo via liberação de prostanoídes e aminas simpáticas. No entanto, a hipernocicepção causada pela administração de mBSA na articulação tíbio-tarsal de camundongos é dependente da cascata de sinalização via liberação de TNF- α , IL-1 β , INF- γ , ET-1 e PGE₂ (Verri et al., 2008). Neste mesmo estudo, Verri et al. (2008) demonstraram que a IL-33, uma citocina pró-inflamatória da família de citocinas da IL-1, participa da hipernocicepção articular e cutânea induzida por antígeno antecedendo a liberação dos mediadores descritos acima.

1.5. Células Th17

A mais de vinte anos atrás Mosmann & Coffman relataram que existia subtipos distintos de células T CD4⁺, denominados células T *helper* (auxiliar) 1 e T *helper* 2 (Th1 e Th2), as quais produzem diferentes citocinas. O subtipo Th1 produz grandes quantidades de IL-2, IFN- γ , induzem reações de hipersensibilidade tardia, ativam macrófagos e são eficazes na defesa contra patógenos intracelulares. Enquanto o subtipo Th2 secreta IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, e são importantes na

indução da produção de IgE, recrutamento de eosinófilos para o sítio inflamatório e também ajudando na eliminação de parasitas (Mosmann & Coffman, 1989).

As citocinas produzidas por células do sistema imunológico inato governam a diferenciação das células *T-helper*. IL-12 dirige as células *T naive* para a diferenciação em um padrão Th1, mediando a auto-imunidade. A IL-12 foi identificada em 1989, como um fator solúvel que estimula células *natural Killer* (NK) a produzir IFN- γ . A IL-12 é uma citocina heterodimérica formada pelas subunidades p40 e p35, sendo produzida por células apresentadoras de antígeno ativadas em resposta a produtos bacterianos e sinais imunes (Chua et al., 1995; Cooper et al., 1997). Outra proteína, a p19 combina-se com a subunidade p40 da IL-12 formando a IL-23 (Oppmann et al., 2000).

Historicamente, células Th1, produtoras de IFN- γ em resposta a IL-12, foram apontadas como sendo essenciais para o desenvolvimento da artrite reumatóide. No entanto, estudos com camundongos deficientes para IL-23 ou IL-12, a falta de IL-23 deixou os animais altamente resistentes ao desenvolvimento de auto-imunidade e inflamação, enquanto que a perda de IL-12 não apresentou esse resultado (Cua et al., 2003; Murphy et al., 2003). Estes dados aparentemente contraditórios associados à descoberta da IL-23 levou à reavaliação da importância da IL-12 e das células Th1 na AR. Estudos mais recentes têm demonstrado que a IL-23 possui um importante papel na diferenciação e na manutenção de uma população de células T produtoras de IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-21, TNF- α e IL-6, denominadas células Th17 (Langrish et al., 2005; Ouyang et al., 2008). No entanto, a descoberta de que a IL-23 é uma citocina importante para a diferenciação das células Th17 ocasionou um problema conceitual, uma vez que, células *T naive* não expressam receptor para a

IL-23, assim essas células não podem se diferenciar em células Th17 na presença de IL-23 (Mangan et al., 2006). O problema foi esclarecido em 2006, quando três estudos independentes encontraram que a combinação da citocina imunorregulatória TGF- β e a citocina pró-inflamatória IL-6 é necessária para a indução da diferenciação de células T *naive* em Th17 (Bettelli et al., Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). No entanto, deve-se mencionar que existem demonstrações que o TGF- β pode suprimir a inflamação e inibir a auto-imunidade. Isto ocorrer porque células T *naive* na presença de TGF- β expressam o fator de transcrição Foxp3 o qual induz células T regulatórias (Treg) (Li & Flavell, 2008; Marie et al., 2005). Uma descoberta importante que permitiu a elucidação da aparente contradição foi a demonstração de que a IL-6 é um potente inibidor de TGF- β , suprimindo a expressão de Foxp3 em células T *naive*. Por outro lado, esta citocina, em conjunto com o TGF- β , induzem a diferenciação de células Th17 (Bettelli et al., 2006). Além disso, a IL-21 que é produzida em grandes quantidades por células Th17 pode, em conjunto com o TGF- β , amplificar a diferenciação destas células. Assim, a IL-21 pode atuar de maneira autócrina em um ciclo de *feedback* positivo, amplificando os precursores das células Th17 (Korn et al., 2007; Nurieva et al., 2007). Além dos fatores de diferenciação, os fatores de transcrição STAT3 e ROR- γ t estão envolvidos no desenvolvimento das células Th17. A ativação do ROR- γ t induz a expressão do receptor da IL-23 nas células Th17 (Ivanov et al., 2006). Deste modo, a IL-23 é responsável pela expansão e manutenção do padrão Th17, sendo assim um fator de estabilização destas células.

O papel das células Th17 no desenvolvimento da AR tem sido esclarecido por estudos mostrando que camundongos deficientes para a IL-17, ou para a IL-6, são resistentes à indução da CIA (Nakae et al., 2003; Sasai et al., 1999). Além disso, foi

verificado que os níveis de IL-17 e IL-6, bem como o número de células T expressando IL-17, estão aumentados no fluido sinovial de pacientes com AR. Deste modo, parece que o eixo IL-23/Th17 é uma via essencial para a indução de doenças auto-imunes, entre elas a AR.

1.6. Interleucina 17 (IL-17)

Como descrito anteriormente, as citocinas e quimiocinas participam do recrutamento de neutrófilos e da hipernocicepção em diversas condições inflamatórias, incluindo a artrite reumatóide (Harris, 1990; Koch et al., 1991; 1994). Dessa forma, a importância destas substâncias na fisiopatologia da artrite reumatóide tem sido demonstrada tanto em humanos quanto em modelos animais (Feldmann et al., 1996).

A IL-17 é uma família de citocinas com seis membros que inclui a IL-17A (também denominada de IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (ou IL-25) e IL-17F. As células T CD4⁺, conhecidas como células Th17, produzem as citocinas IL-17A e IL-17F que também podem ser secretadas por células T CD8⁺ de memória ativadas, células NKT e linfócitos $\gamma\delta$ (Korn et al., 2009; Mills, 2008; Yao et al., 1995). Enquanto, os genes dos outros membros da família da IL-17 são mapeados em cromossomos diferentes, o gene da IL-17A e da IL-17F é localizado no cromossomo 1 em camundongos e no cromossomo 6 em humanos. A proteína IL-17A é um homodímero, ligada por pontes dissulfeto, com peso molecular em torno de 35 kDa e constituída por 155 aminoácidos. Este polipeptídeo contém resíduos de cisteína que formam ligações intermoleculares durante a dimerização (Yao et al., 1995). Os

outros membros da família da IL-17 (IL-17B-F) possuem de 163-202 aminoácidos que apresentam de 20-50% de homologia com a IL-17A (Kawaguchi et al., 2004). A IL-17F também é um homodímero que apresenta 55% de homologia com a IL-17A e, pode formar um heterodímero com a IL-17A (Liang et al., 2007). No entanto, apesar de serem produzidas pelo mesmo padrão de células e apresentarem certa homologia, a IL-17A e a IL-17F possuem diferentes efeitos biológicos. Estudos realizados em animais deficientes para IL-17A e IL-17F demonstraram que a IL-17A tem um papel mais importante na indução da auto-imunidade do que a IL-17F (Yang et al., 2008).

A IL-17 (ou IL-17A) é uma citocina altamente pró-inflamatória encontrada em altos níveis no fluido sinovial de pacientes com AR (Chabaud et al., 1999; Kotake et al., 1999) e que estimula fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais e macrófagos a produzir quimiocinas, GM-CSF, IL-1 β , IL-6, ICAM-1, PGE₂, RANTES, metaloproteinases, NOS-2, dentre outros mediadores envolvidos com a migração neutrofílica, erosão óssea e destruição tecidual (Witowski et al., 2004).

Ademais, a IL-17 pode agir em conjunto com outras citocinas como o TNF- α e IL-1 β , promovendo aumento na produção de quimiocinas, como a IL-8, MIP-2, KC e LIX, e G-CSF, amplificando a migração de neutrófilos (Albanesi et al., 1999; Fossiez et al., 1996; Jones & Chan, 2002; Ruddy et al., 2004a; b). Neste sentido, estudos conduzidos em modelos animais de AR demonstraram que o bloqueio de ambos, IL-17 e TNF- α , foi mais efetivo em controlar a inflamação sinovial e reabsorção óssea do que o bloqueio destas citocinas separadamente (Chabaud & Miossec, 2001; Chabaud et al., 2001).

Além disso, camundongos deficientes para IL-17 mostraram-se resistentes a indução da artrite induzida por colágeno tipo II (CIA), assim como a neutralização da

IL-17 endógena com anticorpo anti-IL-17 após o início da CIA diminuiu a gravidade da doença (Lubberts et al., 2005). Embora, estes dados mostrem o importante papel pró-inflamatório da IL-17 na patogênese da AR, não existem provas de que a IL-17 contribui para a gênese da hipernocicepção articular.

2. Objetivos

Objetivo geral

Baseado nos estudos acima relatados, o presente estudo teve por objetivo elucidar os mecanismos de participação da IL-17 na indução da hipernocicepção articular e da migração de neutrófilos em modelo de artrite induzida por antígeno em camundongos.

Objetivos Específicos

1. Determinar a curva dose e tempo-resposta de hipernocicepção e a migração de neutrófilos na articulação fêmur-tibial de camundongos no modelo de artrite induzida por antígeno;
2. Avaliar o efeito do tratamento com anticorpo anti-IL-17 na hipernocicepção e migração de neutrófilos induzidas pelo desafio com mBSA em camundongos imunizados;
3. Determinar a possível capacidade da IL-17 de induzir hipernocicepção e migração de neutrófilos na articulação fêmur-tibial de camundongos (dose e tempo-resposta);
4. Determinar se a inibição da migração leucocitária articular induzida pelo mBSA e pela citocina IL-17 administradas intra-articularmente, inibe a hipernocicepção articular;
5. Avaliar os possíveis mediadores e mecanismos que poderiam estar envolvidos nos processos de hipernocicepção e migração de neutrófilos induzidos pela IL-17 em modelo de artrite induzida por antígeno.

3. Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos de acordo com o comitê de ética para animais de experimentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo nº 173/2008, ver anexo 1).

3.1. *Animais*

Os experimentos foram realizados utilizando-se camundongos isogênicos das linhagens C57BL/6 e Balb/c machos de 20 a 25g, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo (USP) Campus de Ribeirão Preto. Além destes, foram utilizados camundongos geneticamente modificados de 20 a 25g para o receptor tipo I do TNF- α (KO p55^{-/-}) provenientes do biotério do Departamento de Imunologia da USP Campus de Ribeirão Preto. Foram utilizados no mínimo cinco animais por grupo experimental, os quais permaneceram cerca de dois dias no biotério de Departamento de Farmacologia, sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso a água e comida, antes de serem submetidos aos ensaios biológicos.

3.2. *Preparo de soluções, drogas e reagentes*

- *Tampão de salina-fostato (PBS)*

Cloreto de Sódio P. A (NaCl, Merck)	8,0 g
Cloreto de Potássio P. A (KCl, Merck)	0,2 g
Fosfato de Sódio dibásico P.A (Na ₂ HPO ₄ , Merck)	1,15 g
Fosfato de Potássio monobásico P.A (KH ₂ PO ₄ , Merck)	0,2 g
Água Milli-Q q.s.p	1L

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH ou HCl e a solução foi armazenada a 4°C antes de ser utilizada.

- ***PBS/EDTA***

PBS 100 mL

EDTA (Merck)..... 37,2 mg

- ***Líquido de Turkey***

Ácido Acético Glacial P.A (Merck) 9 mL

Azul de Metileno (Merck) 1 mL

Água Milli-Q q.s.p 1 L

- ***Corante panótico rápido (LaborClin)***

Panótico rápido nº 1: solução de triarilmetano 0,1%.

Panótico rápido nº 2: solução de xantenos 0,1%.

Panótico rápido nº 3: solução de tiazinas 0,1%.

- ***Tampões utilizados para o ensaio de ELISA***

- ***Solução de ligação (binding buffer) pH 9,0***

Na₂HPO₄ (Merck) 0,1 M

- ***Tampão substrato pH 5,0***

Ácido cítrico (Merck) 34,7 mM

Na₂HPO₄ (Merck) 66,7 mM

- Substrato

OPD (Sigma).....	0,4 mg
H ₂ O ₂ (Merck)	0,4 µL
Tampão substrato q.s.p.....	1 mL

- **Albumina bovina sérica metilada (mBSA)**

A mBSA (Sigma) foi diluída em adjuvante de Freund completo ou salina antes de ser utilizada.

- **Drogas**

A tabela 1, a seguir, descreve as drogas e os veículos utilizados para a realização do presente trabalho.

Tabela 1 – Drogas e veículo

DROGAS	VEÍCULO
Infliximabe (Shering-Plough)	Salina 0,9%
Anticorpo anti-IL-17 (R&D systems)	Salina 0,9%
DF-2156 (Dompe, Itália)	Salina 0,9%
IL-1ra (NIBSC, UK)	Salina 0,9%
Fucoidina (Sigma-Aldrich)	Salina 0,9%
Doxiciclina (Pfizer)	H ₂ O destilada
Bosentan (Actelion Pharmaceuticals)	Goma arábica 5% em H ₂ O destilada
Indometacina (Prodome)	Tampão Tris 0,1 M; pH 8,0
Guanetidina (Sigma-Aldrich)	Salina 0,9%
Zimosan (Sigma-Aldrich)	Salina 0,9%
IL-17 (R&D systems)	Salina 0,9%
ET-1 (American Peptides)	Salina 0,9%
Dopamina (Sigma-Aldrich)	Salina 0,9%
PGE₂ (Sigma-Aldrich)	Salina 0,9%

3.3. Indução de artrite experimental

3.3.1. Artrite induzida por antígeno (AIA)

Camundongos C57BL/6 e Balb/c foram imunizados, através de injeção subcutânea (s.c) com uma emulsão contendo 200 μ L de volumes iguais de PBS e adjuvante completo de Freund (CFA), na qual foi dissolvido 500 μ g de mBSA. No sétimo dia após a primeira imunização foi administrado s.c reforço da mesma preparação (Fig. 1). Os animais falso-imunizados (FI) receberam o mesmo tratamento aplicado aos demais, porém sem a administração de mBSA. No vigésimo primeiro dia os animais imunizados foram desafiados com mBSA, IL-17, ET-1, PGE₂ ou dopamina através da injeção na articulação fêmur-tibial direita. Após a administração dos estímulos a hipernocicepção articular foi avaliada nos diferentes tempos.

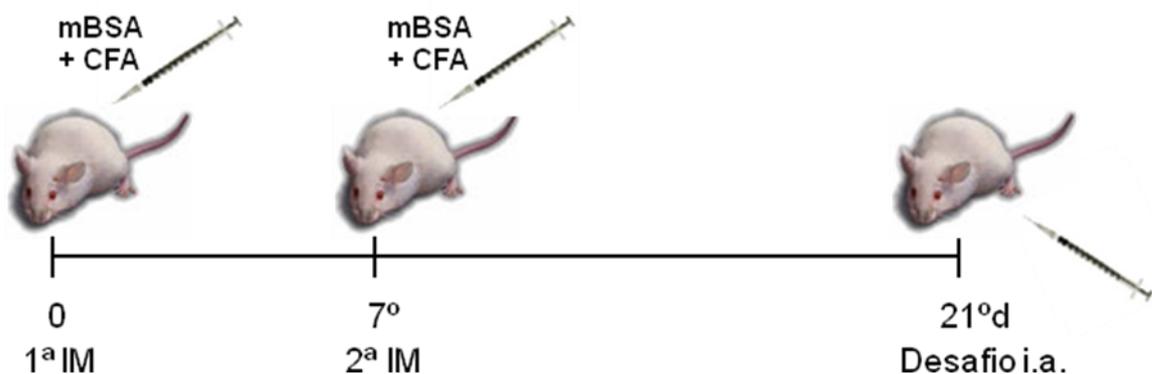


Figura 1 – Representação esquemática do protocolo experimental de artrite induzida por antígeno

3.3.2. Artrite induzida por zimosan (AIZ)

O modelo experimental de inflamação induzida por zimosan em joelhos de camundongos foi primeiramente utilizado por Keystone et al. (1977). No presente trabalho a artrite por zimosan foi induzida nos camundongos após a administração intra-articular de 30 µg de zimosan (de *Saccharomyces cerevisiae*) diluído em 10 µL de salina na articulação fêmur-tibial direita. Nos animais controle foram injetados 10 µL de salina na articulação.

3.4. Avaliação nociceptiva articular

A avaliação da hipernocicepção mecânica na articulação fêmur-tibial foi realizada por modificação do método de flexão dorsal da articulação tíbio-tarsal de camundongos como descrito por Guerrero et al. (2006). Deste modo foi possível avaliar a hipernocicepção e migração de neutrófilos de forma direta (lavado da cavidade articular) no mesmo sítio inflamatório. Ao contrário da articulação tíbio-tarsal na qual a migração de neutrófilos é avaliada indiretamente pela atividade mieloperoxidase (MPO) devido a dificuldade técnica de se realizar um lavado dessa articulação. O método descrito por Guerrero et al. (2006) foi baseado no método eletrônico de quantificação da intensidade da nocicepção inflamatória em camundongo descrito por Cunha et al. (2004).

Os experimentos foram realizados com anestesímetro eletrônico (modelo 1601C, Life Science Instruments California, USA) (Fig. 2), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expresso em gramas (g). A captação da pressão é feita pelo contato do transdutor de pressão à pata, que

é realizado através de uma ponteira de polipropileno com área de 4,15 mm² que está conectada ao transdutor (Fig. 3). A avaliação da nocicepção na articulação fêmur-tibial consiste na aplicação, por entre as malhas da rede, de uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo, até que o animal flexione a região fêmur-tibial, produzindo uma resposta de retirada da pata (Fig. 4). A ponteira de 4,15 mm² permite avaliar a hipernocicepção articular, pois tal ponteira não é *per se* nociceptiva (Guerrero et al., 2006). A intensidade de hipernocicepção mecânica articular é quantificada através de valores absolutos de limiar mecânico (em gramas).

Os testes nociceptivos foram realizados entre 08:00 e 17:00 h. Todos os experimentos seguiram as normas e éticas estabelecidas para experimentação com animais conscientes, recomendadas pela IASP (Zimmermann, 1983).



Figura 2- Foto do equipamento utilizado no modelo de nocicepção articular

A foto apresenta o anestesiômetro eletrônico (Modelo 1601C, Life Science Instruments Califórnia, EUA), as caixas de acrílico, o assoalho em rede de malhas e o espelho, utilizados no modelo de nocicepção articular.



Figura 3- Foto da ponteira utilizada no modelo de nociceção articular

A foto apresenta a ponteira utilizada na avaliação da resposta nociceptiva articular. A ponteira A (ponteira de área- 4,15 mm²).



Figura 4- Foto no momento do teste de nociceção articular

A foto apresenta a ponteira em contato com a pata do animal. O experimentador aplica, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produza flexão dorsal da articulação fêmur-tibial.

3.5. Determinação farmacológica dos mediadores inflamatórios envolvidos na hipernocicepção e migração de neutrófilos para a articulação em modelo de AIA

Para determinar os mediadores envolvidos no processo de migração e de hipernocicepção, foram utilizados animais deficientes para o receptor do tipo I do TNF- α e/ou drogas como: infliximabe (anticorpo anti-TNF- α), indometacina (inibidor das cicloxigenases), guanetidina (bloqueador da liberação de aminas simpáticas da terminação nervosa), bosentan (antagonista dos receptores ET_A/ET_B), DF-2156 (antagonista CXCR1/ CXCR2), doxiciclina (inibidor não-específico das metaloproteinases), fucoidina (inibidor da migração de leucócitos), IL-1ra (antagonista do receptor da IL-1), anticorpo contra IL-17 e anticorpo isotipo controle (IgG de rato normal). Na tabela abaixo são descritos os protocolos farmacológicos de pré-tratamentos, segundo as drogas, os tempos, as doses e as vias de administração (Tabela 2). A figura 5, a seguir, descreve esquematicamente os protocolos farmacológicos de pré-tratamentos.

Tabela 2 – Pré-tratamentos: Segundo as drogas, o tempo, a dosagem e a via

DROGAS	TEMPO	DOSE/VIA	REFERÊNCIA
Anticorpo anti-IL-17	Co-tratamento	2,25 μ g; i.a.	Lemos et al., 2009
Anticorpo controle	Co-tratamento	2,25 μ g; i.a.	Lemos et al., 2009
DF-2156	20 min antes	30 mg/kg; i.v.	Cunha et al., 2008a
IL-1ra	30 min antes e 3,5 hs após	50 mg/kg; i.v.	Verri et al., 2008
Fucoidina	15 min antes e 3,5 hs após	20 mg/kg; i.v.	Verri et al., 2009
Doxiciclina	30 min antes	3, 10 e 30 mg/kg; v.o.	Gutierrez et al., 2008
Infliximabe	48 hs e 60 min antes	10 mg/kg; i.p.	Thwin et al., 2009
Bosentan	60 min antes	100 mg/kg; v.o.	Verri et al., 2007
Indometacina	30 min antes	5 mg/kg; i.p.	Cunha et al., 2005
Guanetidina	60 min antes	30 mg/kg; s.c.	Cunha et al., 2005

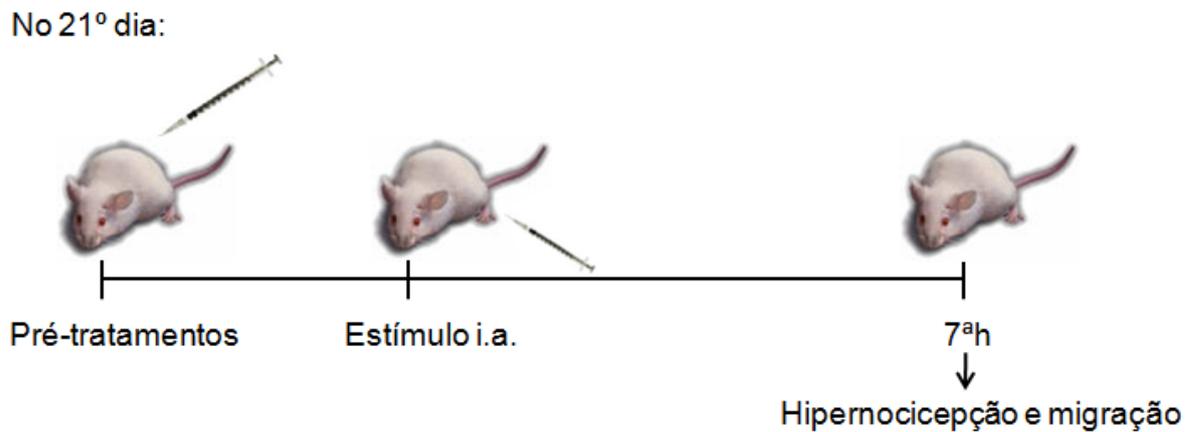


Figura 5 – Representação esquemática dos protocolos farmacológicos.

3.6. Quantificação da migração leucocitária ao tecido articular

Para avaliação da migração de neutrófilos, os camundongos foram sacrificados após o desafio com mBSA, IL-17 ou zimosan e foi realizado o lavado intra-articular (2x) com 5 µl de PBS contendo EDTA (1 mM). Este lavado foi diluído em 90 µl de PBS/EDTA e a partir deste, foram realizadas a contagem total e diferencial de leucócitos.

3.7. Contagem total dos leucócitos

Alíquotas de 10 µl do lavado articular foram diluídas em líquido de Turk, na proporção de 1:1, sendo a contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x) e contador manual e expressa como número de células x 10⁴/ cavidade articular.

3.8. Contagem diferencial dos leucócitos

As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação de uma alíquota do lavado intra-articular (citospin; Shandon Lipshaw Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA) e coradas pelo corante panótico rápido (LaborClin; Produtos para Laboratório Ltda, Pinhais, PR, Brasil). As células foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000 x). Foram então contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se quatro tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, mononucleares e mastócitos. O número de neutrófilos presentes na cavidade articular foi obtido através da percentagem de neutrófilos (dada pela contagem diferencial) e da quantidade de células total presentes na cavidade articular. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos x 10^4 / cavidade articular.

3.9. Dosagem de Citocinas

Após a injeção i.a. do estímulo inflamatório, as amostras da região da articulação fêmur-tibial foram coletadas nos tempos indicados e trituradas com auxílio de polytron em solução Tampão Fosfato Salina (PBS) contendo: 0,4 M de NaCl, 0,05% de Tween 20, 0,5% de albumina bovina sérica (BSA), 0,1 mM de fluoreto de fenil-metil-sulfonila, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 0,001% aprotinina. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 3000g durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para avaliar os níveis de IL-17, TNF- α , IL-1 β e KC/CXCL1 por ELISA seguindo o seguinte procedimento:

Placas de 96 poços foram incubadas por toda a noite a 4 °C com anticorpos contra IL-17, TNF- α , IL-1 β e KC/CXCL1 murinas que foram dosadas (na

concentração referente a citocina a ser dosada). No dia seguinte, as placas foram lavadas e incubadas por 2 horas com uma solução a 1% de albumina bovina no intuito de evitar ligações inespecíficas. Após esse bloqueio e lavagem das placas, as curvas-padrão em várias diluições ou as amostras (em triplicata) foram adicionadas e incubadas a 4 °C por 24 h. As placas foram lavadas três vezes com tampão e os anticorpos policlonais biotinizados contra IL-17, TNF- α , IL-1 β e KC/CXCL1 murinas, diluídos na proporção que se enquadre melhor a cada citocina e quimiocina, foram adicionados (100 μ l/poço). Após uma incubação em temperatura ambiente por 1 hora, as placas foram lavadas e 50 μ l de avidina-HRP diluída 1:5000 foi adicionada. Em seguida (trinta minutos após), 50 μ l do reagente colorido (o-fenilenodiamina-2HCl; OPD, Sigma USA) foi adicionado e as placas foram mantidas no escuro, em temperatura ambiente, por 15-20 min. A reação enzimática foi interrompida com H₂SO₄ 1M e as absorbâncias foram determinadas a 490 nm. Os resultados foram obtidos comparando a densidade óptica com as densidades das curvas padrões. Além disso, os resultados foram expressos em picogramas da respectiva citocina por articulação. Como controle foram utilizados os níveis das citocinas que foram determinadas em camundongos normais injetados com salina.

3.10. Avaliação da expressão de genes

A expressão de RNAm para COX-2, MMP-2, MMP-9 e prepro-endotelina (PPET-1) foi avaliada por RT-PCR em tempo real como descrito previamente (Verri et al., 2008). Os animais foram sacrificados nos tempos indicados após as injeções de IL-17 ou mBSA (i.a.) e as membranas sinoviais foram coletadas. O RNA celular total da membrana sinovial foi extraído usando o reagente de Trizol (Invitrogen Life

Technologies Corporation, Carlsbad, CA). A seguir, 200 μ L de clorofórmio (Gibco BRL) foram adicionados à suspensão, a qual foi centrifugada a 13000 g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa formada foi transferida para um novo tubo. A este tubo foi adicionado isopropanol na proporção de 1:1 e, após agitado em Vortex, e incubou-se por 15 minutos à -20 °C, para precipitação do RNA disperso na fase aquosa. Após incubação e centrifugação a 13000g durante 15 minutos a 4 °C, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi suspenso em etanol PA, agitado em Vortex e centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi então novamente descartado e, o precipitado, re-suspenso em água livre de RNase. A concentração de RNA foi determinada pela densidade ótica no comprimento de onda de 260 nm, por meio do aparelho GeneQuant (Amersham Biosciences Corp., Piscataway). Um micrograma do RNA total foi transcrito para cDNA por ação da enzima transcriptase reversa Pre-Improm II (Promega, Madison, Wisconsin, USA). A reação quantitativa do RT-PCR em tempo real foi feita no ABI Prism 7500 Sequence Detection System usando o sistema de fluorescência SYBR-green (Applied Biosystems, Warrington, UK) para a quantificação das amplificações. O RT-PCR foi executado com volume final da reação de 13 μ L e mantido sobre 95 °C (10 min), e mais 40 ciclos de 94 °C (1 min), 56 °C (1 min) e 72 °C (2 min). A curva de fusão foi analisada (65–95 °C) para verificar se apenas um produto foi amplificado. Amostras que tiveram mais de um pico foram excluídas. Os resultados foram analisados através do método comparativo de “cycle threshold” (CT). Os pares de *primers* para camundongos utilizados estão contidos na Tabela 3.

Tabela 3- Sequência dos pares de “primers” utilizados

<i>Primers</i>	<i>sense</i>	<i>anti-sense</i>
β-actina	5'- AGC TGC GTT TTA CAC CCT TT- 3'	5'- AAG CCA TGC CAA TGT TGT CT- 3'
COX-2	5'- GTG GAA AAA CCT CGT CCA GA- 3'	5'- GCT CGG CTT CCA GTA TTG AG- 3'
MMP-2	5'- GGC TCT GTC CTC CTC TGT AGT TAA CC- 3'	5'- GCA ACA GTT AAG GTG GTG CAG GTA- 3'
MMP-9	5'- TCC CCA AAG ACC TGA AAA CCT C - 3'	5'- GCC CCA CTA GAG TTT AAC TGT TCA CT- 3'
PPET-1	5'-TGT GTC TAC TTC TGC CAC CT- 3'	5'- CAC CAG CTG CTG ATA GAT AC- 3'

3.11. Gel de zimografia

A atividade gelatinolítica das MMPs foi analisada pela zimografia de gelatina conforme descrito (Gutierrez et al., 2008). As membranas sinoviais foram coletadas 7 h após o desafio com IL-17 ou salina e homogeneizadas em tampão Tris-CaCl₂ contendo inibidores de protease. A fim de confirmar que a atividade gelatinolítica quantificada foi específica para MMPs, *o*-fenantrolina (1 mM) foi adicionada ao tampão de incubação, abolindo todas atividades gelatinolíticas. A concentração de proteínas da amostra foi determinada pelo método colorimétrico Coomassie (Bradford) *Protein Assay Kit* (Pierce, Rockford, IL, USA). As amostras do homogenato foram desnaturadas a 40 °C durante 10 min. Em seguida, as amostras foram aplicadas (10 µg de proteína por grupo) em gel de poliacrilamida a 10% copolimerizado com gelatina (40 mg/ml, tipo A de pele porcina, Sigma) e separadas por eletroforese, conforme a técnica SDS-PAGE. Após o tempo de eletroforese, os géis foram lavados duas vezes com Triton X-100 a 2% para remover o SDS, e colocados durante 18 h a 37 °C em tampão de ativação Tris-CaCl₂ (50 mmol/L de

Tris-HCl, 150 mmol/L de cloreto de sódio, 10 mmol/L de cloreto de cálcio, e 0,05% de azida de sódio). Após incubação, os géis foram fixados e corados com azul brilhante de Coomassie (G-250, Sigma). Para a visualização das bandas referentes as MMPs os géis foram descorados com metanol a 30% e ácido acético a 10%. Observa-se a formação de bandas claras contra o fundo azul do Coomassie (devido à degradação da gelatina incorporada ao gel pelas MMPs). Os zimogramas foram digitalmente escaneados, e a intensidade das bandas foi quantificada usando o programa ImageJ.

3.12. Determinação da produção de prostaglandina

As amostras da articulação fêmur-tibial foram coletadas duas e seis horas após a injeção de IL-17 em uma mistura de 0,5 mL de tampão PBS contendo indometacina (20 µg/ml) e 1 mL de solvente de extração (isopropanol/ acetato de etila/ 0,1 N HCl, 3:3:1). Após homogeneizar as amostras com auxílio de um polytron, estas foram centrifugadas por 10 min a 2000 g a 4 °C. A fase orgânica foi coletada e evaporada em rota-evaporador. O pellet foi reconstituído em 500 µl de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) contendo 0,8% de azida de sódio e 0,1% de gelatina. As concentrações de PGE₂ foram determinadas por radio imuno-ensaio (RIA). Os resultados foram expressos como pg de PGE₂ por articulação (Verri et al., 2007).

3.13. Análise Estatística

Os resultados são representados como a média ± E.P.M. por grupo de cinco animais e estes são representativos de dois experimentos independentes. Conforme

indicado, a análise dos resultados foi feita pelo teste de análise de variância de dois fatores (tratamento e tempo) ou de um fator (tratamento). As comparações *post-hoc* foram realizadas com o teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $P < 0,05$ (do teste de Bonferroni).

4. Resultados

4.1. mBSA induz hipernocicepção articular em camundongos

Primeiramente avaliamos o efeito da administração de um antígeno específico na nocicepção articular em um modelo de AIA. Para tanto, os camundongos foram imunizados previamente com mBSA (antígeno) e no 21º dia após a primeira imunização os animais foram desafiados com uma injeção intra-articular (i.a.) de mBSA na articulação fêmur-tibial direita. Observamos que o desafio i.a. com mBSA causou uma significativa redução do limiar nociceptivo de modo dose dependente (10-90 µg/ articulação) quando comparado ao grupo imunizado desafiado com salina ou com o grupo falso-imunizado desafiado com mBSA (Fig. 6). A resposta hipernociceptiva começou 3 h após a injeção do estímulo, alcançando um platô entre a sétima e a vigésima quarta horas e retornou aos níveis do controle 72 e 96 hs após o desafio (Fig. 6). Para os experimentos seguintes foi escolhida a dose de 30 µg/ articulação de mBSA e o tempo de 7 hs após a administração do estímulo.

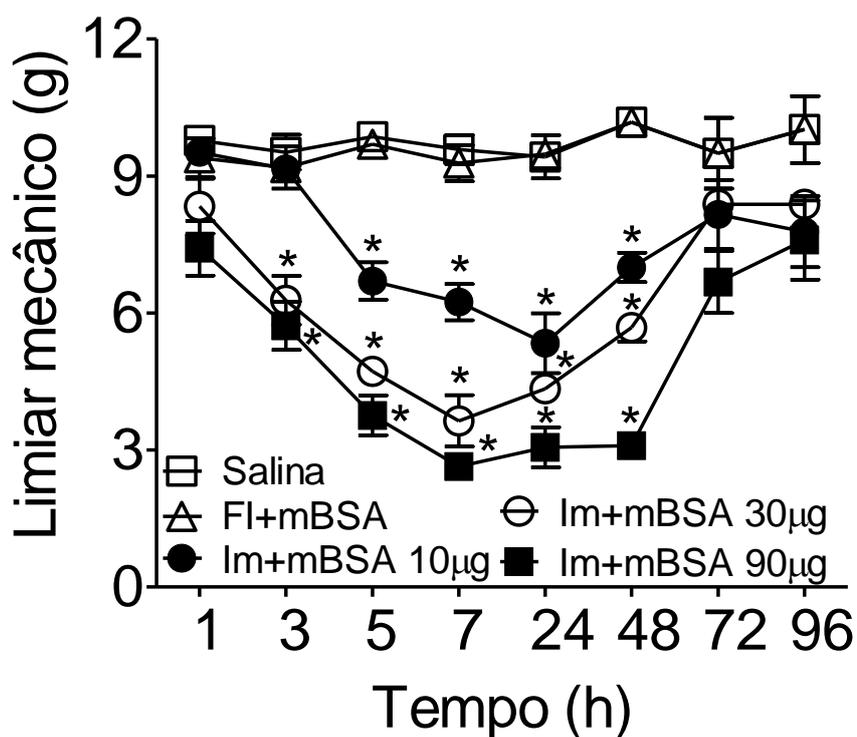


Figura 6- Hipernociceção mecânica articular induzida por mBSA em camundongos previamente imunizados. Curvas dose e tempo resposta hipernociceptiva em camundongos balb/c imunizados com mBSA e desafiados i.a. com mBSA (10, 30, 90 µg) ou 10 µl de salina. Os animais falso imunizados foram desafiados i.a. com 90 µg de mBSA. A hipernociceção articular foi avaliada 1-96 h após a injeção do estímulo. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. de 5 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significante quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina.

4.2. A IL-17 participa da hipernocicepção articular induzida por antígeno

Após determinar a dose de mBSA necessária para induzir resposta hipernociceptiva articular em camundongos, foram realizados experimentos para testar o papel da IL-17 neste modelo de artrite induzida por antígeno. O tratamento dos camundongos com um anticorpo anti-IL-17 (2,25 µg) inibiu o efeito hipernociceptivo 5 e 7 hs após a injeção de mBSA (30 µg) quando comparado ao grupo tratado com um anticorpo isotipo controle (IgG de rato normal) (Fig. 7A). O efeito antinociceptivo do anticorpo anti-IL-17 terminou 24 hs após sua administração. Neste momento, os camundongos foram tratados novamente com a mesma dose de anticorpo e a resposta nociceptiva foi avaliada 3 hs após. Foi observado, um significativo efeito antinociceptivo após a segunda administração do anticorpo (Fig. 7A). Com o intuito de confirmar o envolvimento da IL-17 na AIA, foi administrado mBSA 30 µg na articulação fêmur-tibial direita de camundongos balb/c e após 3 e 12 hs do desafio a produção de IL-17 na articulação foi avaliada. Observamos que a injeção de mBSA induziu um aumento significativo nos níveis de IL-17 quando comparados ao grupo salina 3 e 12 hs após o desafio com o estímulo (Fig. 7B).

Uma vez que determinamos que a IL-17 participa do modelo, fomos verificar se a citocina era capaz de induzir uma resposta pró-nociceptiva. Os camundongos imunizados previamente com mBSA foram desafiados i.a. com IL-17 (3-30 ng/articulação) e a hipernocicepção mecânica articular foi avaliada durante um período de 7 hs após a injeção do estímulo. A administração de IL-17 na articulação fêmur-tibial dos animais induziu hipernocicepção de maneira dose e tempo dependentes (Fig. 8). A diminuição do limiar nociceptivo foi observada 1 h após o desafio de IL-17 nas doses de 10 e 30 ng/articulação, a qual aumentou progressivamente 7 h após o

desafio. A dose de 30ng de IL-17 por articulação foi escolhida para os experimentos seguintes.

Avaliamos também a participação da IL-17 na gênese da hipernocicepção articular em outro modelo de artrite, o modelo de artrite induzida por zimosan (AIZ). O tratamento dos camundongos com anticorpo anti-IL-17 (α -IL-17, 2,25 μ g/ articulação) não inibiu a hipernocicepção articular induzida pela administração i.a. de zimosan (30 μ g/ articulação) quando comparados com o grupo tratado com anticorpo isotipo controle (α -CTL) avaliada em um período de 1-7 hs após a administração do zimosan (Fig. 9).

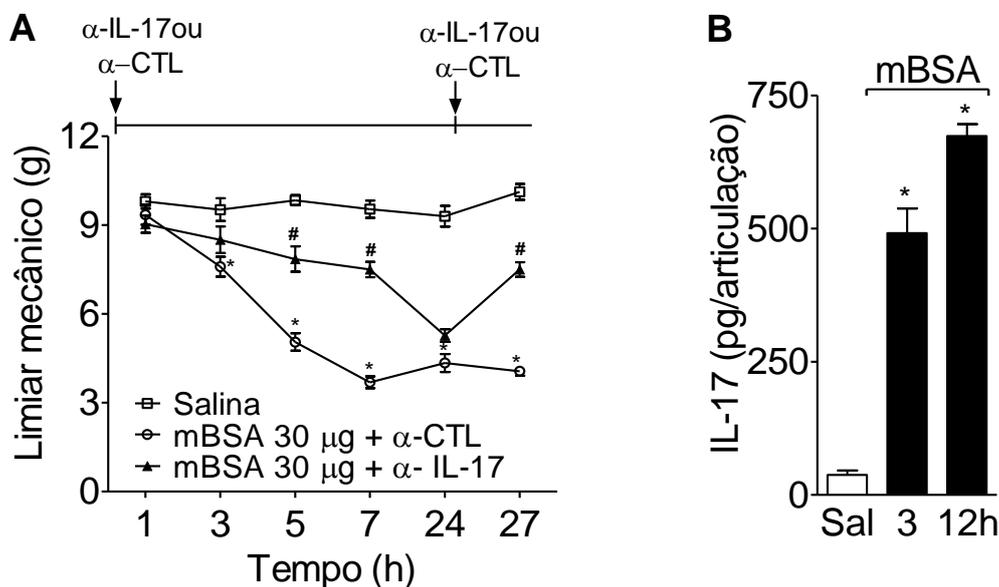


Figura 7- Papel da IL-17 na hipernociceção mecânica articular induzida pelo desafio com mBSA em animais previamente imunizados. Painel A: A hipernociceção articular foi avaliada 1-24 h após a injeção i.a. de mBSA (30 µg) ou salina em camundongos balb/c previamente imunizados com mBSA tratados com uma co-injeção de anticorpos IgG controle (α -CTL) ou α -IL-17 (2,25 µg/cavidade). Na 24^a h os camundongos foram tratados novamente com uma segunda dose dos anticorpos. **Painel B:** Camundongos balb/c imunizados com mBSA foram desafiados i.a. com mBSA (30 µg) ou salina e a concentração de IL-17 foi determinada 3 e 12 h após o desafio. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina e, # $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo que recebeu mBSA + α - CTL.

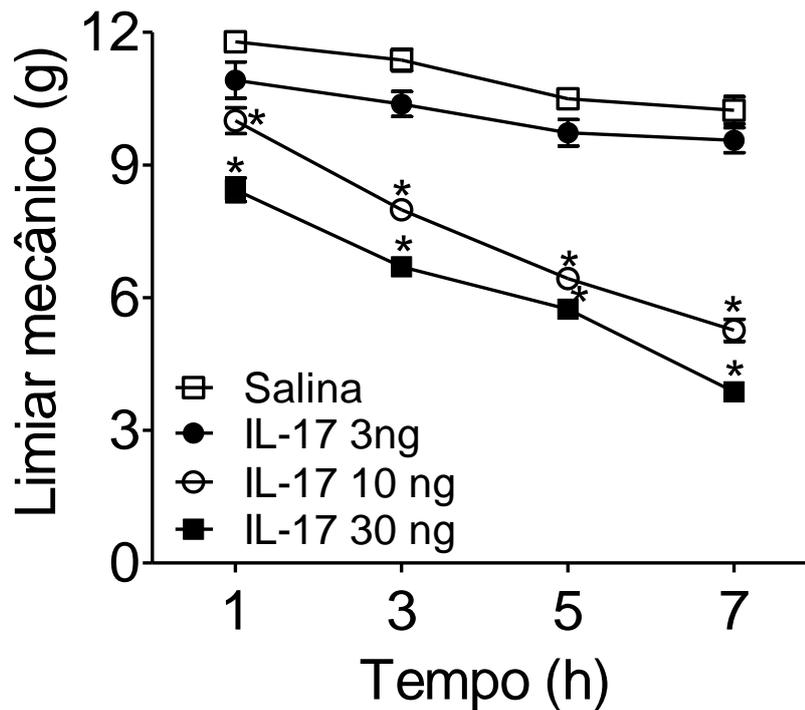


Figura 8- IL-17 induz hipernocicepção mecânica articular em camundongos previamente imunizados. Curvas dose e tempo resposta de hipernocicepção articular induzida pelo desafio i.a. de IL-17 (3, 10, 30 ng) ou salina em camundongos balb/c imunizados com mBSA. Os efeitos hipernociceptivos foram avaliados durante um período de 7 h. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina.

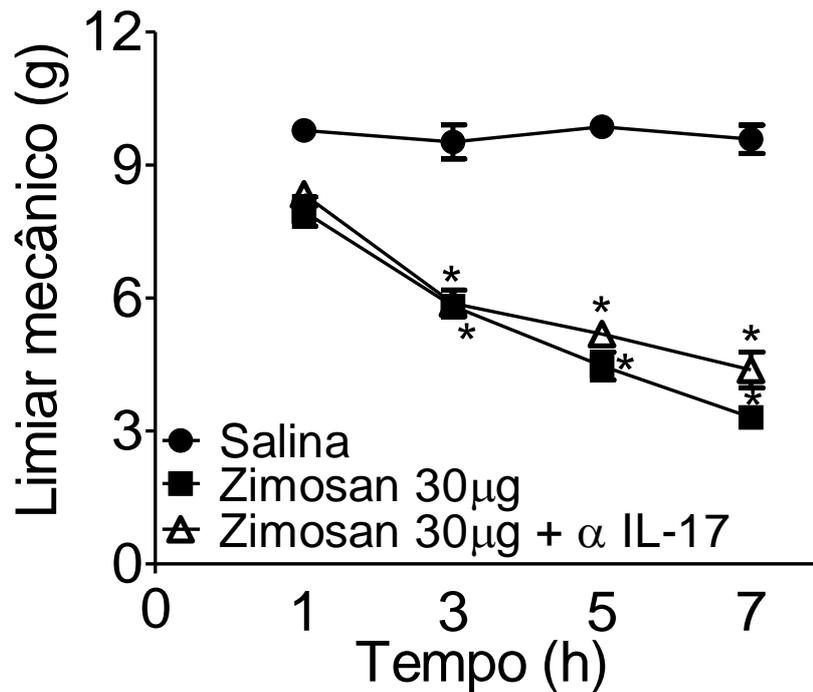


Figura 9- Tratamento com anticorpo anti-IL-17 não inibe a hipernocicepção mecânica articular induzida pelo zimosan. Curva tempo resposta de hipernocicepção articular induzida em camundongos balb/c pelo desafio i.a. de salina ou zimosan (30 µg) tratados com uma co-injeção de anticorpos IgG controle (α -CTL) ou α -IL-17 (2,25 µg/cavidade). Os efeitos hipernociceptivos foram avaliados durante um período de 7 h. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significante quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina.

4.3. Envolvimento das citocinas e quimiocinas no efeito hipernociceptivo da IL-17

Uma vez que determinamos que a IL-17 participa da gênese da hipernocicepção articular em um modelo de AIA, a próxima etapa foi investigar quais os mediadores inflamatórios estariam envolvidos neste efeito. Em um primeiro momento avaliamos a participação das citocinas e quimiocinas, que são considerados mediadores intermediários da hipernocicepção, no efeito pró-nociceptivo da IL-17. O efeito hipernociceptivo articular da IL-17 foi inibido parcialmente em camundongos deficientes para o receptor tipo I do TNF- α quando comparados aos camundongos selvagens C57BL/6 previamente imunizados com mBSA (Fig. 10A). Além disso, o tratamento dos camundongos balb/c imunizados com infliximabe (anticorpo anti-TNF) reduziu a hipernocicepção induzida pela IL-17 (Fig. 10B). Com o intuito de confirmar o envolvimento do TNF- α na hipernocicepção articular induzida pela IL-17, o nível de TNF- α foi determinado na articulação dos animais 0,5, 1, 2 e 4 hs após a injeção i.a. de IL-17 (30 ng/ cavidade). De fato, a IL-17 induziu um aumento na produção de TNF- α 1, 2 e 4 hs após o desafio (Fig. 11).

Outra citocina importante na gênese da hipernocicepção é a IL-1 β (Ferreira et al., 1988; Cunha et al., 2005). Assim fomos avaliar o envolvimento desta citocina no efeito hipernociceptivo articular induzido pela IL-17. O tratamento dos animais previamente imunizados com antagonista do receptor da IL-1, IL-1ra, foi capaz de reduzir parcialmente a hipernocicepção induzida pela IL-17 (Fig. 12). Além disso, a administração de IL-17 na cavidade articular dos camundongos induziu um aumento na produção de IL-1 β 1, 2 e 4 hs após o estímulo (Fig. 13).

As quimiocinas também são consideradas mediadores intermediários da hipernocicepção (Cunha et al., 2005). Neste sentido, fomos avaliar o efeito de um antagonista dos receptores de quimiocina do tipo CXCR1/CXCR2 na hipernocicepção causada pela IL-17. O tratamento de animais previamente imunizados com DF-2156 (antagonista CXCR1/2) reduziu significativamente o efeito pró-nociceptivo da IL-17 (Fig. 14). Confirmando a participação das quimiocinas na hipernocicepção articular induzida pela IL-17, foi realizada a quantificação de KC/CXCL1 na articulação dos animais. De fato, a injeção i.a. de IL-17 aumentou os níveis da quimiocina KC/CXCL1 na cavidade articular dos camundongos 1, 2 e 4hs após a administração do estímulo (Fig. 15).

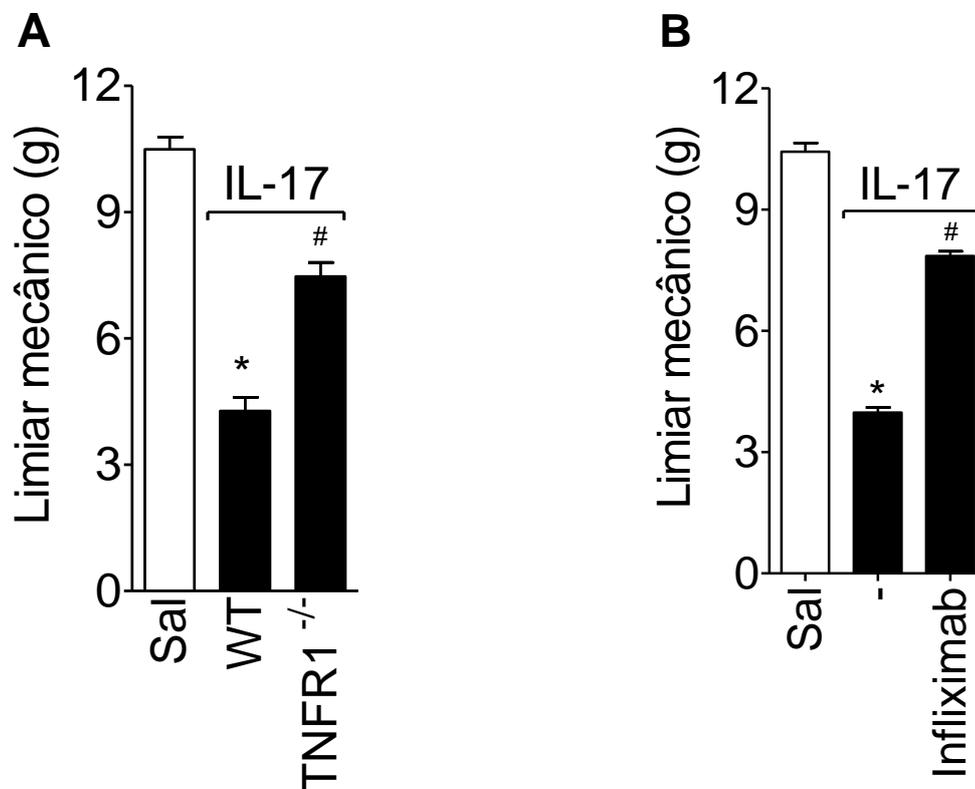


Figura 10- Efeito do tratamento com infliximabe e animais deficientes para o receptor p55 da citocina TNF- α sobre o efeito hipernociceptivo articular da IL-17. Painel A: Camundongos selvagens (WT) ou TNFR1^{-/-} imunizados previamente com mBSA foram desafiados i.a. com IL-17 (30 ng) ou salina e a hipernocicepção articular foi avaliada 7 h após a injeção do estímulo. **Painel B:** A IL-17 (30 ng por articulação) foi injetada na articulação fêmur-tibial de camundongos balb/c imunizados com mBSA os quais foram pré-tratados com infliximabe (10 mg/kg, i.p. 48 h e 60 min antes da injeção do estímulo). A hipernocicepção articular foi avaliada 7 h após o desafio. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina e, # $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo animais selvagens (WT) ou grupo tratado com IL-17.

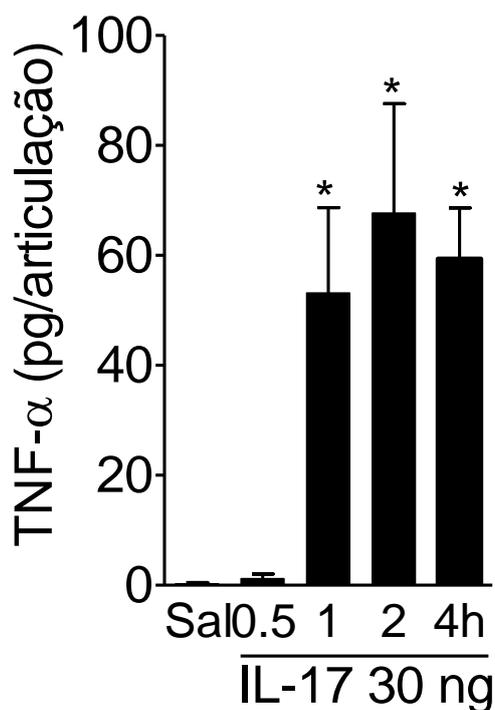


Figura 11- Efeito da administração i.a. de IL-17 sobre a produção de TNF- α na articulação de camundongos imunizados com mBSA. A concentração da citocina TNF- α na articulação fêmur-tibial dos camundongos balb/c imunizados com mBSA após a administração i.a. de IL-17 (30 ng) ou salina foi determinada 0,5, 1, 2 e 4 hs após o desafio. Os camundongos foram sacrificados e amostras das articulações foram retiradas para determinar o nível da citocina por ELISA. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. de 4 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significante quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina.

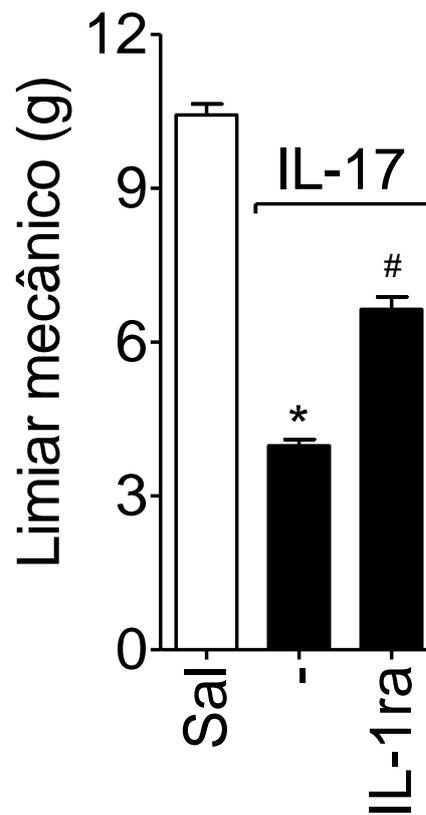


Figura 12- Efeito antinociceptivo do tratamento com IL-1ra sobre a hipernocicepção articular da IL-17. A IL-17 (30 ng por articulação) foi injetada na articulação fêmur-tibial de camundongos balb/c imunizados com mBSA os quais foram pré-tratados com IL-1ra (50 mg/kg, i.v. 30 min antes e 3,5 h depois da injeção do estímulo). A hipernocicepção articular foi avaliada 7 h após o desafio. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina e, # $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo tratado com IL-17.

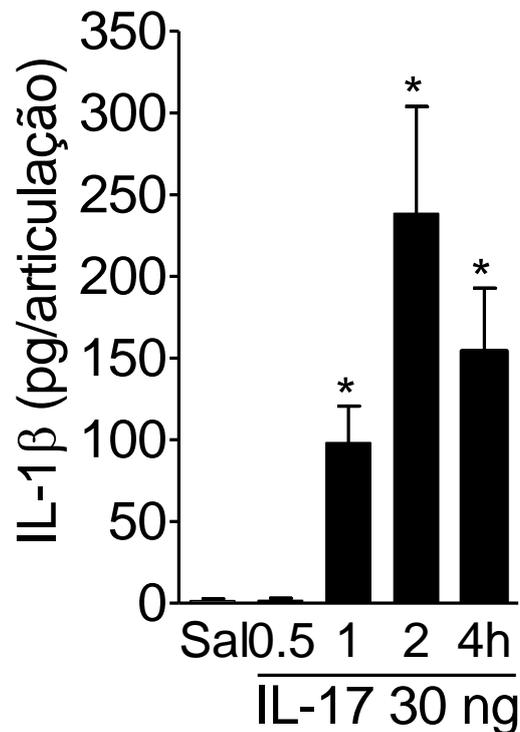


Figura 13- Efeito da administração i.a. de IL-17 sobre a produção de IL-1 β na articulação de camundongos imunizados com mBSA. A concentração da citocina IL-1 β na articulação fêmur-tibial dos camundongos balb/c imunizados com mBSA após a administração i.a. de IL-17 (30 ng) ou salina foi determinada 0,5, 1, 2 e 4 hs após o desafio. Os camundongos foram sacrificados e amostras das articulações foram retiradas para determinar o nível da citocina por ELISA. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. de 4 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significante quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina.

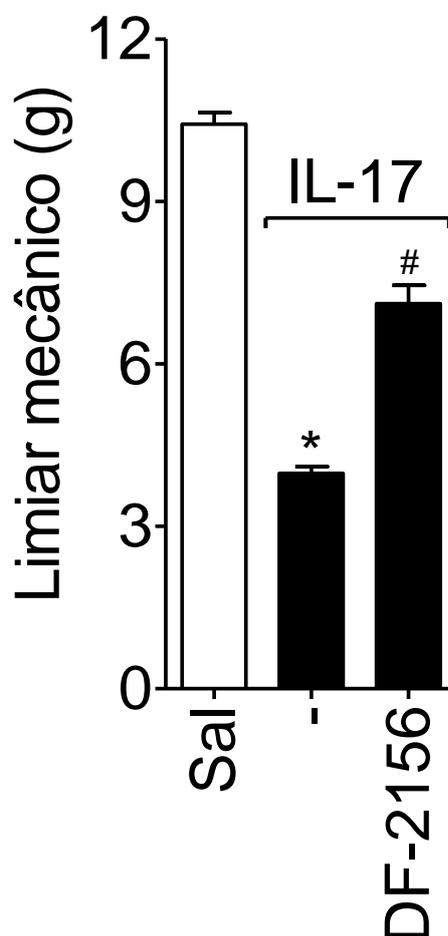


Figura 14- Efeito do DF-2156 sobre a hipernocicepção articular da IL-17. A IL-17 (30 ng por articulação) foi injetada na articulação fêmur-tibial de camundongos balb/c imunizados com mBSA os quais foram pré-tratados com DF-2156 (30 mg/kg, i.v. 20 min antes da injeção do estímulo). A hipernocicepção articular foi avaliada 7 h após o desafio. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina e, # $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo tratado com IL-17.

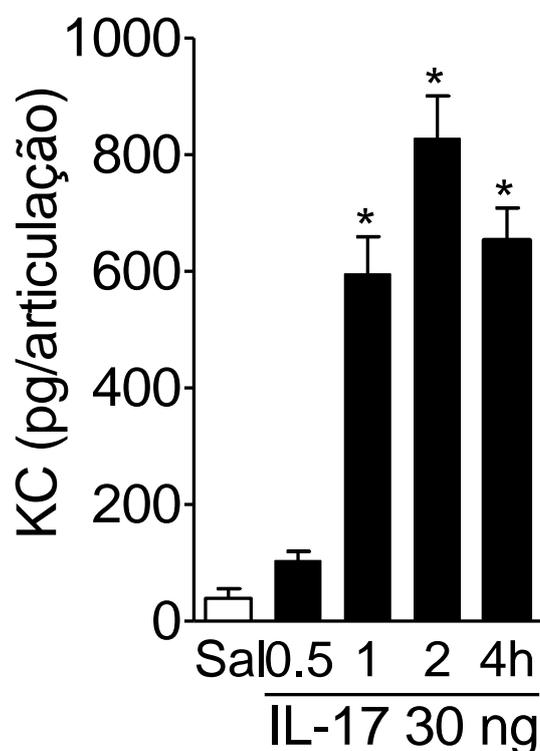


Figura 15- Efeito da administração i.a. de IL-17 sobre a produção de KC na articulação de camundongos imunizados com mBSA. A concentração da citocina KC na articulação fêmur-tibial dos camundongos balb/c imunizados com mBSA após a administração i.a. de IL-17 (30 ng) ou salina foi determinada 0,5, 1, 2 e 4 hs após o desafio. Os camundongos foram sacrificados e amostras das articulações foram retiradas para determinar o nível da citocina por ELISA. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. de 4 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significante quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina.

4.4. Relação entre a hipernocicepção mecânica articular induzida pela IL-17 e a migração de neutrófilos para a cavidade articular

A próxima etapa foi investigar a participação dos neutrófilos no efeito pró-nociceptivo da IL-17 no modelo de AIA. Primeiramente, foi observado que a administração de mBSA (10-90 µg) na cavidade articular de camundongos previamente imunizados induziu um aumento no recrutamento de neutrófilos para a articulação de modo dose dependente 7 hs após o desafio, os quais retornaram aos níveis normais 96 hs após a injeção do estímulo (Fig. 16).

Posteriormente, fomos investigar se o tratamento dos animais imunizados com anticorpo anti-IL-17 inibia a migração de neutrófilos induzida pelo desafio com mBSA. De fato, a co-injeção de mBSA (30 µg) mais α-IL-17 (2,25 µg) inibiu o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular 7 hs após a injeção do estímulo em relação ao grupo tratado com anticorpo α-CTL (Fig 17A). Ainda, a administração de uma segunda dose do anticorpo anti-IL-17 (0 e 24 hs após a injeção i.a. de mBSA) também reduziu a migração de neutrófilos para a articulação 27 hs após o desafio (Fig. 17B).

Uma vez que o tratamento com anti-IL-17 inibiu o recrutamento de neutrófilos no modelo de artrite induzida por antígeno, fomos verificar qual seria o papel da IL-17 na migração de neutrófilos em outro modelo de artrite, na artrite induzida por zimosan. Ao contrario do que foi observado na AIA, a migração de neutrófilos induzida pela injeção i.a. de zimosan (30 µg) após 7 hs não foi inibida pelo tratamento com anticorpo anti-IL-17 (neutrófilos $\times 10^4$ / cavidade articular: salina- $0,04 \pm 0,02$; zimosan + anticorpo controle- $4,56 \pm 0,94^*$; zimosan + anticorpo anti-IL-17-

5,22 ± 0,95. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M de 5 animais por grupo experimental, * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina. ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni).

Verificamos ainda que a administração i.a. de IL-17 em camundongos balb/c imunizados induziu migração de neutrófilos para a cavidade articular de maneira dose dependente 7 hs após o desafio (Fig. 18). Nos próximos experimentos a dose de 30 ng de IL-17 foi utilizada para avaliar o efeito dos diferentes tratamentos no recrutamento de neutrófilos.

O próximo passo foi determinar a interdependência entre a resposta pró-nociceptiva e a migração de neutrófilos. Para tanto, camundongos imunizados com mBSA foram tratados com fucoidina, um inibidor da adesão leucocitária, e o recrutamento de neutrófilos e a resposta hipernociceptiva foram avaliadas 7 hs após a injeção dos estímulos. O tratamento com fucoidina inibiu a hipernocicepção articular induzida pela IL-17 e pelo mBSA (Fig. 19A), que foi acompanhada pela concomitante redução da migração de neutrófilos para a cavidade articular (Fig. 19B).

Com o intuito de reforçar a relação entre hipernocicepção e migração celular fomos avaliar o efeito dos tratamentos com inibidores de citocinas e quimiocinas na migração de neutrófilos induzida pela IL-17. De fato, o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular foi reduzido em camundongos deficientes para o receptor do tipo I do TNF- α em relação aos animais WT desafiados com IL-17 (Fig. 20A). Além disso, o tratamento com infliximabe, IL-1ra e DF-2156 inibiram a migração de neutrófilos induzida pela IL-17 7hs após o desafio (Fig. 20B).

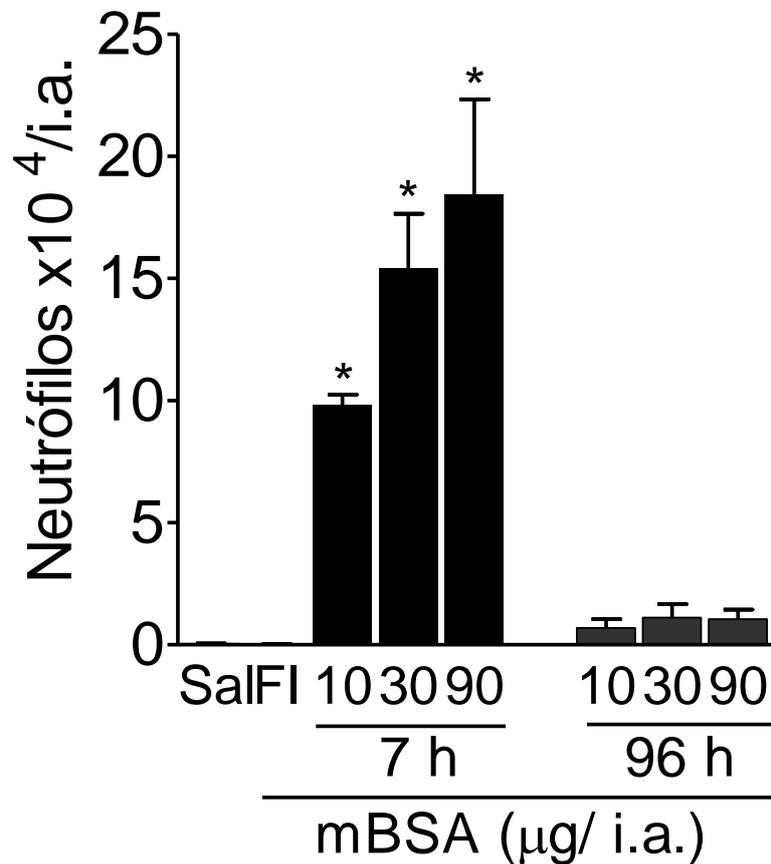
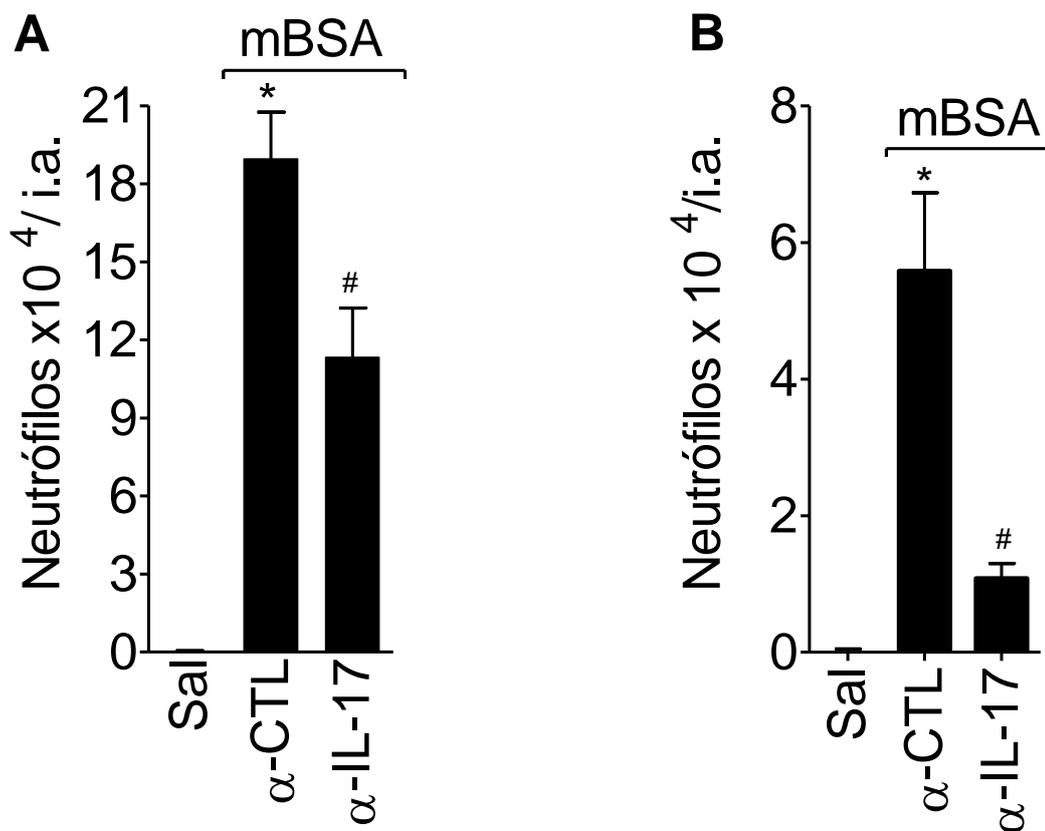


Figura 16- mBSA induz migração de neutrófilos para a cavidade articular de camundongos previamente imunizados. O recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular foi determinado 7 e 96 hs após a injeção i.a. de mBSA (10, 30, 90 µg) ou 10 µl de salina em camundongos balb/c imunizados com mBSA ou falso imunizados. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. de 5 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina.



*Figura 17- Efeito do tratamento com anticorpo anti-IL-17 sobre a migraç3o de neutr3filos para a cavidade articular induzida pelo desafio com mBSA em camundongos previamente imunizados. Pain3is A e B: Camundongos balb/c previamente imunizados com mBSA foram desafiados i.a. com mBSA (30 μ g) ou salina e tratados com uma co-injeç3o de anticorpos IgG controle (α -CTL) ou anti-IL-17 (2,25 μ g/cavidade). **Pain3el A:** A migraç3o de neutr3filos para a cavidade articular foi avaliada 7 h ap3s o desafio. **Pain3el B:** Os camundongos balb/c foram tratados uma segunda vez com os anticorpos (24 h ap3s a primeira administraç3o) e o recrutamento de neutr3filos foi avaliado 3 h ap3s o tratamento com o anticorpo (27 h). Os resultados s3o expressos pela m3dia \pm E.P.M. de 5 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferenç3a estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina e, # $P < 0,05$ indica diferenç3a estatisticamente significativa quando comparado ao grupo que recebeu mBSA + α - CTL.*

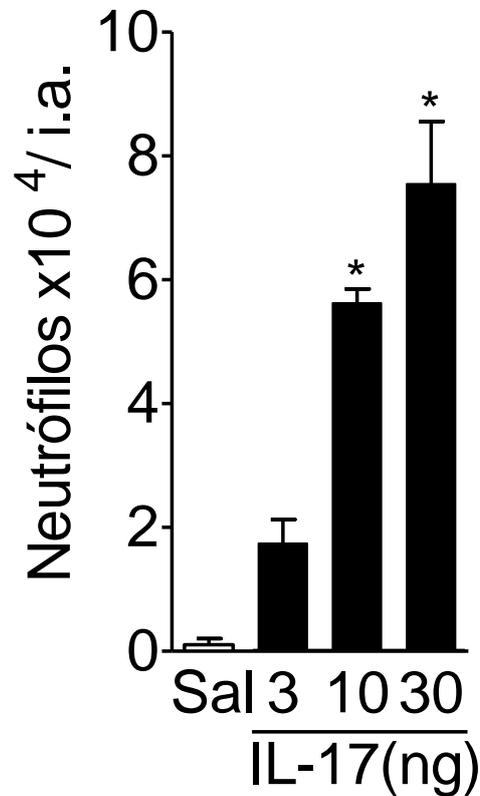
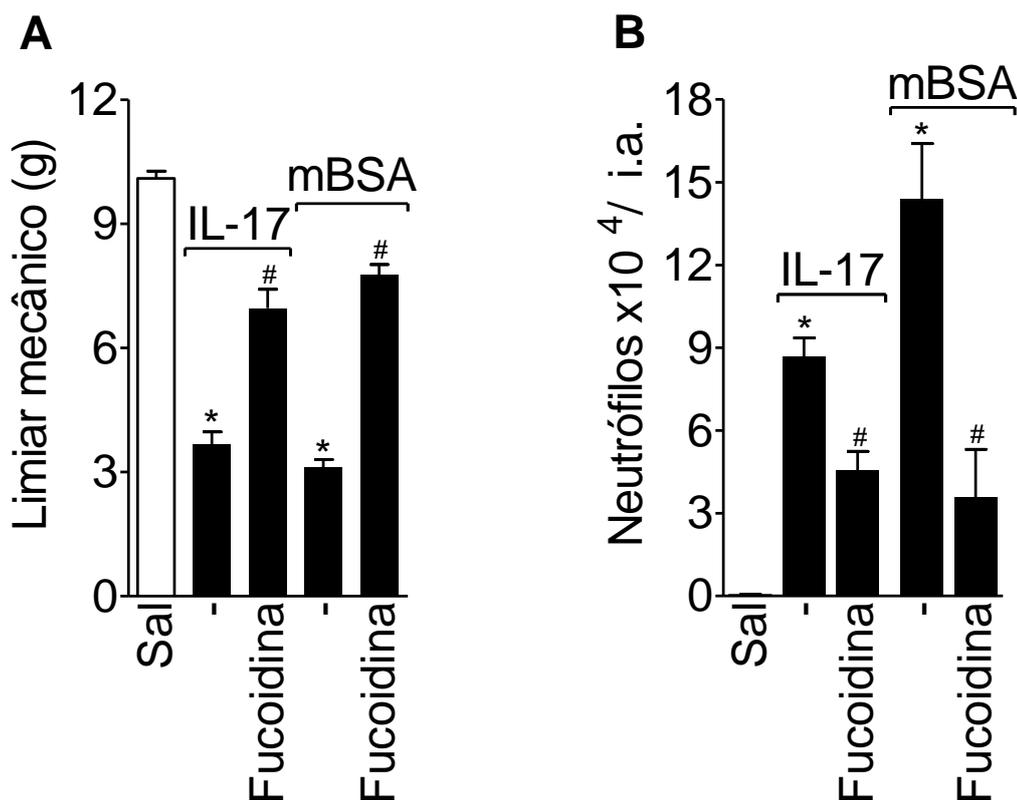


Figura 18- Migração de neutrófilos para a cavidade articular de camundongos previamente imunizados induzida pela IL-17. O recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular foi determinado 7 h após a injeção i.a. de IL-17 (3, 10, 30 ng) ou 10 μ l de salina em camundongos balb/c previamente imunizados com mBSA. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina.



*Figura 19- Efeito do tratamento com fucoxantina sobre a migração de neutrófilos e a hipernocicepção articular induzidas pelo mBSA e pela IL-17. A hipernocicepção articular (Painel A) e a migração de neutrófilos (Painel B) em camundongos balb/c desafiados com IL-17 (30 ng por articulação) ou mBSA (30 µg por articulação) e pré-tratados com fucoxantina (20 mg/kg, i.v. 15 min antes e 3,5 h após a injeção do estímulo) foram avaliadas 7 h depois do desafio. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. de 5 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina e, # $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu mBSA ou IL-17.*

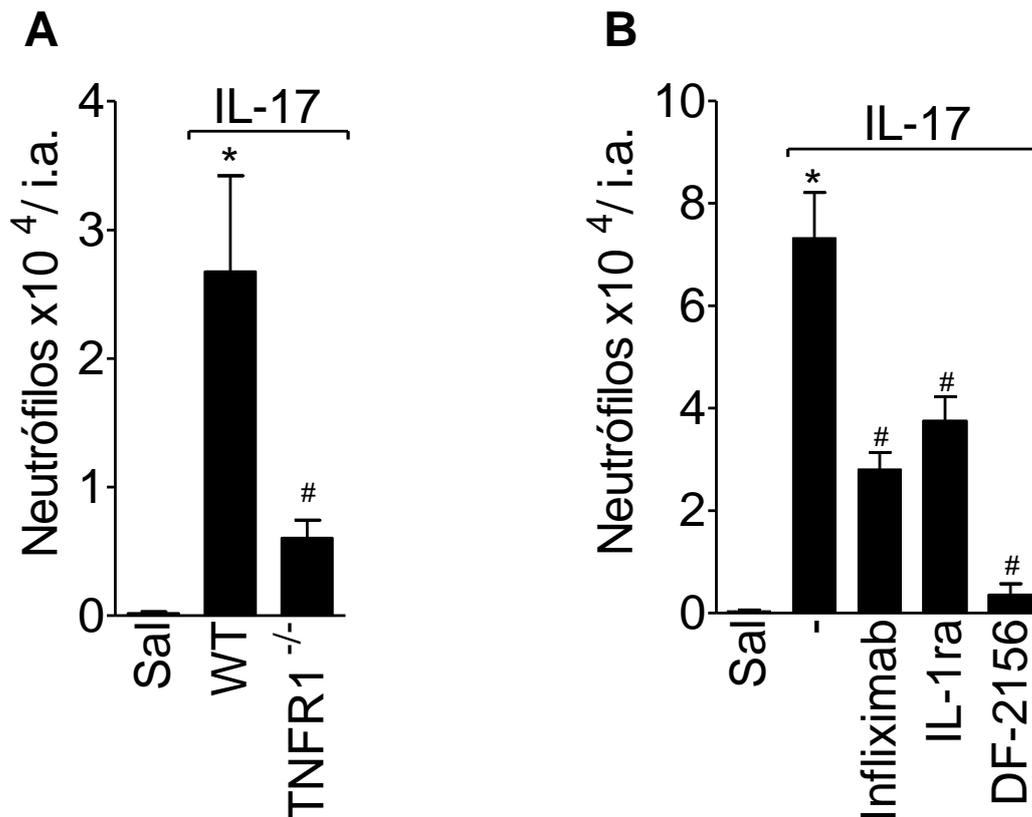


Figura 20- Papel das citocinas e quimiocinas na migração de neutrófilos induzidas pela IL-17. Painel A: Camundongos selvagens (WT) ou TNFR1^{-/-} imunizados previamente com mBSA foram desafiados i.a. com IL-17 (30 ng) ou salina e o recrutamento de neutrófilos foi avaliado 7 h após a injeção do estímulo. **Painel B:** A IL-17 (30 ng por articulação) foi injetada na articulação fêmur-tibial de camundongos balb/c imunizados com mBSA os quais foram pré-tratados com infliximabe (10 mg/kg, i.p. 48h e 60 min antes da injeção do estímulo), IL-1ra (50 mg/kg, i.v. 30 min antes e 3,5 h depois da injeção do estímulo) ou DF-2156 (30 mg/kg, i.v. 20 min antes da injeção do estímulo). A migração de neutrófilos foi avaliada 7 h após o desafio. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. de 5 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina e, # $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo animais selvagens (WT) ou com o grupo tratado com IL-17.

4.5. Papel das MMPs no efeito hipernociceptivo causado pela IL-17

Nossa próxima etapa foi avaliar o efeito do tratamento dos animais previamente imunizados com doxiciclina, um inibidor inespecífico de metaloproteinases. Primeiramente, realizamos uma curva dose resposta para a doxiciclina (3-30 mg/kg) em camundongos imunizados e desafiados com mBSA (30 µg). O pré-tratamento com doxiciclina inibiu de modo dose dependente a hipernocicepção articular induzida pelo desafio com mBSA (Fig. 21 A). Após, verificamos que o pré-tratamento com doxiciclina na dose de 30 mg/kg inibiu o efeito pró-nociceptivo da IL-17 (Fig. 21B).

Consistentemente, o tratamento com doxiciclina reduziu de maneira dose dependente a migração de neutrófilos induzida pela injeção i.a. de mBSA (Fig. 22A). Além disso, o aumento no recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular induzido pela IL-17 foi inibido pelo pré-tratamento com doxiciclina (Fig. 22B).

Uma vez que determinamos que as metaloproteinases medeiam o efeito pró-nociceptivo da IL-17, nosso próximo passo foi avaliar quais eram as metaloproteinases envolvidas neste efeito. Nesse sentido, utilizamos as técnicas de RT-PCR em tempo real e zimografia. A injeção i.a. de IL-17 (30 ng/ cavidade) induziu um significativo aumento na expressão de RNAm para MMP-9 (gelatinase B) na membrana sinovial 1,5 hs após o desafio. No entanto, a expressão de RNAm para MMP-2 (gelatinase A) não foi alterada em relação ao grupo controle (Fig. 23A). Corroborando com estes resultados a atividade enzimática da MMP-9, mas não da MMP-2, estava aumentada no tecido sinovial 7hs após o desafio (Fig. 23B).

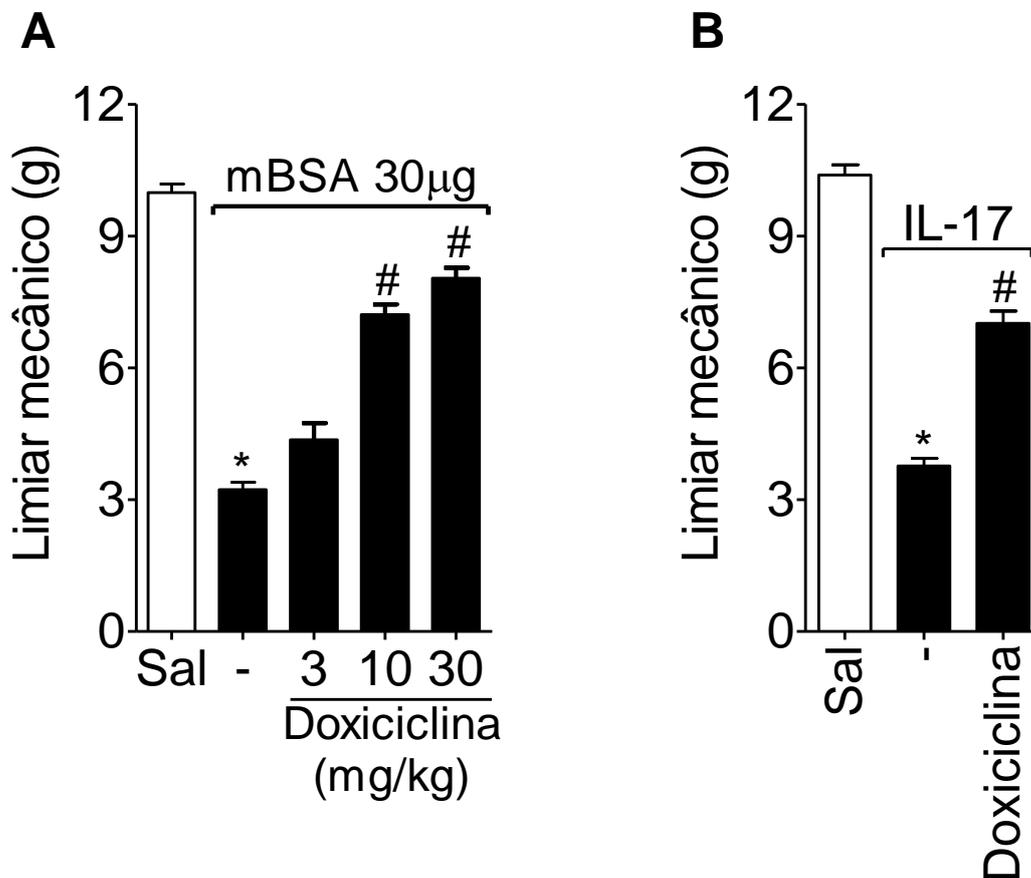


Figura 21- Efeito do tratamento com doxiciclina na hipernociceção articular induzida pelo mBSA e pela IL-17. Painel A: A hipernociceção articular em camundongos balb/c desafiados com mBSA (30 μ g por articulação) e pré-tratados com doxiciclina (3, 10 ou 30 mg/kg, v.o. 30 min antes da injeção do estímulo) foi avaliada 7 h após o desafio. *Painel B:* Camundongos balb/c imunizados com mBSA foram pré-tratados com doxiciclina (30 mg/kg, v.o. 30 min antes da injeção do estímulo) e desafiados i.a. com IL-17 (30 ng por articulação). A hipernociceção articular foi avaliada 7 h depois do desafio. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina e, # $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu mBSA ou IL-17.

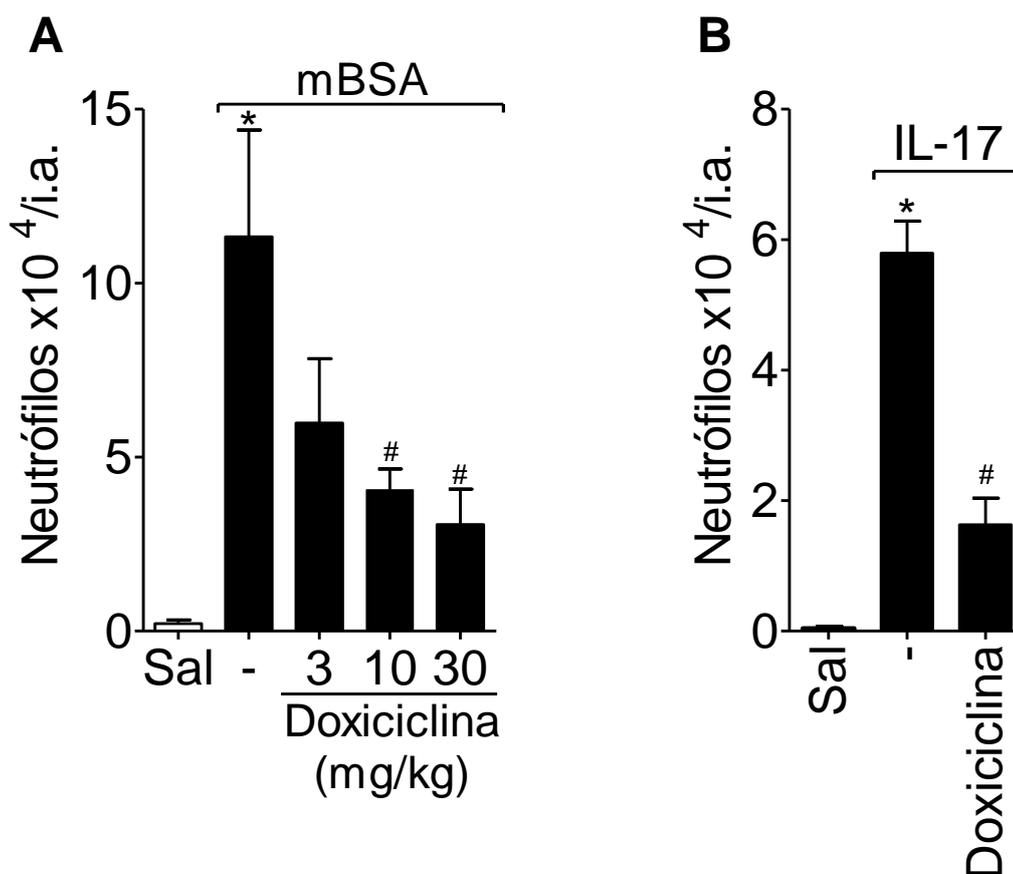


Figura 22- Efeito do tratamento com doxiciclina na migração de neutrófilos para a cavidade articular induzida pelo mBSA e pela IL-17. Painel A: O recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular em camundongos balb/c desafiados com mBSA (30 μ g por articulação) e pré-tratados com doxiciclina (3, 10 ou 30 mg/kg, v.o. 30 min antes da injeção do estímulo) foi avaliada 7 h após o desafio. **Painel B:** Camundongos balb/c imunizados com mBSA foram pré-tratados com doxiciclina (30 mg/kg, v.o. 30 min antes da injeção do estímulo) e desafiados i.a. com IL-17 (30 ng por articulação). A migração de neutrófilos para a articulação foi avaliada 7 h depois do desafio. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina e, # $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu mBSA ou IL-17.

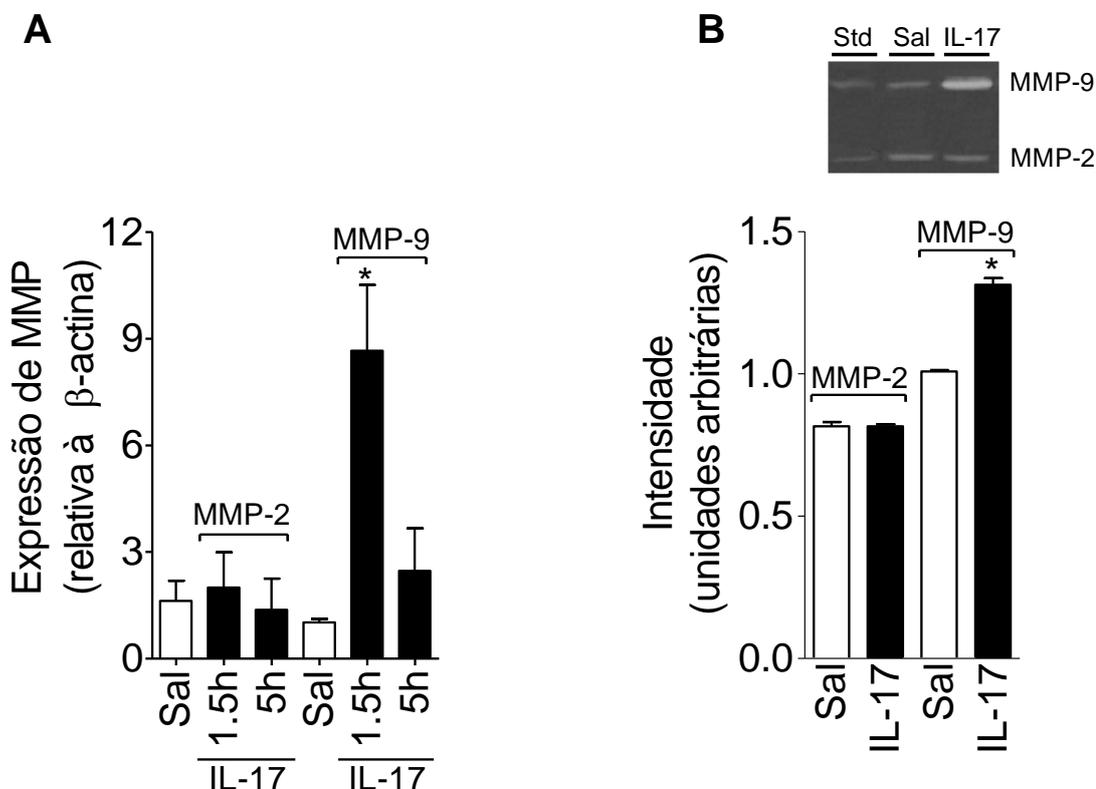


Figura 23- Efeito da administração i.a. de IL-17 sobre a expressão de RNAm e a atividade das MMPs. Painel A: Camundongos balb/c imunizados com mBSA foram desafiados i.a. com salina ou IL-17 (30 ng). Após 1.5 e 5 h, as membranas sinoviais foram coletadas e a expressão de RNAm para MMP-2 e MMP-9 foram analisadas por PCR. A expressão do gene foi normalizada em relação à expressão de β -actina. **Painel B:** Imagem representativa de um zimograma de gelatina SDS-PAGE das membranas sinoviais. Os pesos moleculares das bandas de MMP-2 e MMP-9 foram identificados após eletroforese em SDS-PAGE 10%. *Std*, standard (padrão, 2 μ l de soro fetal bovino). Na parte superior, a intensidade das bandas específicas de MMP. Os valores de 72 kDa para MMP-2 e 92 kDa para MMP-9. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina.

4.6. Endotelina medeia a hipernocicepção articular induzida pela IL-17

As endotelinas são importantes mediadores da hipernocicepção podendo agir na sensibilização dos nociceptores direta ou indiretamente (Ferreira et al., 1989; Verri et al., 2004; 2006; 2007). Neste sentido, fomo avaliar o efeito do pré-tratamento com bosentan, um antagonista dos receptores de endotelina ET_A/ET_B na hipernocicepção induzida pela IL-17. O efeito pró-nociceptivo da IL-17 foi reduzido significativamente pelo pré-tratamento dos camundongos balb/c com bosentan 7 hs após o desafio i.a. com IL-17 (Fig. 24A). Corroborando com esse resultado, a injeção i.a. de IL-17 aumentou a expressão de RNAm para PPET-1 no tecido sinovial 1,5 hs após o desafio (Fig. 24B). Além disso, a administração na articulação fêmur-tibial de ET-1 em camundongos previamente imunizados induziu uma resposta hipernociceptiva dose e tempo dependente (Fig. 24C).

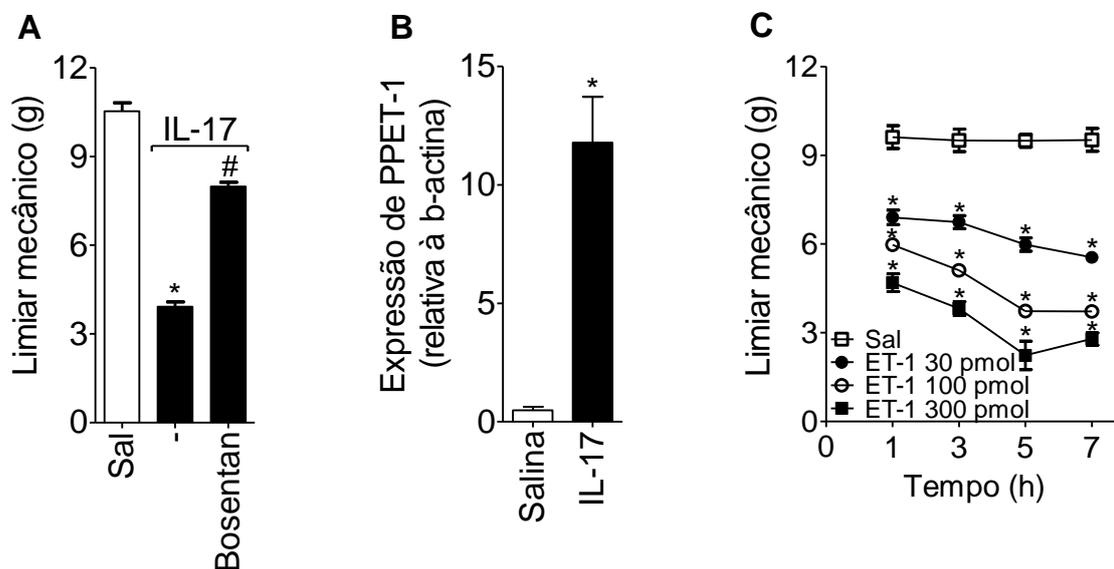


Figura 24- Papel da ET-1 no efeito pró-nociceptivo produzido pela administração i.a. da IL-17. Painel A: A hipernocicepção articular em camundongos balb/c desafiados com IL-17 (30 ng por articulação) e pré-tratados com bosentan (100 mg/kg, v.o. 60 min antes da injeção do estímulo) foi avaliada 7 h após o desafio. **Painel B:** As membranas sinoviais de camundongos balb/c previamente imunizados com mBSA foram coletadas 1,5 h após a injeção i.a. de IL-17 ou salina e analisadas para expressão de RNAm para PPET-1 por PCR. A expressão do gene foi normalizada em relação a expressão de β -actina. **Painel C:** Curvas dose e tempo resposta da hipernocicepção articular induzida pela injeção i.a. de ET-1 (30-300 pmol/ cavidade) em camundongos balb/c imunizados com mBSA. As respostas hipernociceptivas foram avaliadas 1, 3, 5 e 7 h após a injeção do estímulo. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina e, # $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu IL-17.

4.7. O efeito hipernociceptivo da IL-17 é dependente de prostanóides e aminas simpáticas

A próxima etapa foi determinar a participação dos mediadores inflamatórios que sensibilizam diretamente os nociceptores, as prostaglandinas e as aminas simpáticas na hipernocicepção induzida pela IL-17. Neste sentido, os camundongos previamente imunizados foram tratados com indometacina, guanetidina ou pela associação das duas drogas. Observamos que a hipernocicepção articular causada pela IL-17 foi reduzida pelo pré-tratamento com guanetidina e indometacina (Fig. 25A). Além disso, a associação de indometacina e guanetidina aboliu o efeito hipernociceptivo da IL-17 (Fig. 25A). O desafio i.a. de PGE₂ e dopamina em camundongos balb/c imunizados induziu uma diminuição do limiar nociceptivo de modo dose e tempo dependente (Fig, 25 B e C). De acordo com estes resultados, o tratamento com anticorpo anti-IL-17 diminuiu a expressão de RNAm para COX-2 induzida pela injeção de mBSA em camundongos imunizados, enquanto que o desafio i.a. com IL-17 promoveu um aumento na expressão de RNAm para COX-2 na membrana sinovial 1,5 h após a administração do estímulo (Fig. 26A). Além disso, a administração de IL-17 na cavidade articular aumentou os níveis de PGE₂ na articulação fêmur-tibial 2 e 6 hs após o desafio (Fig. 26B).

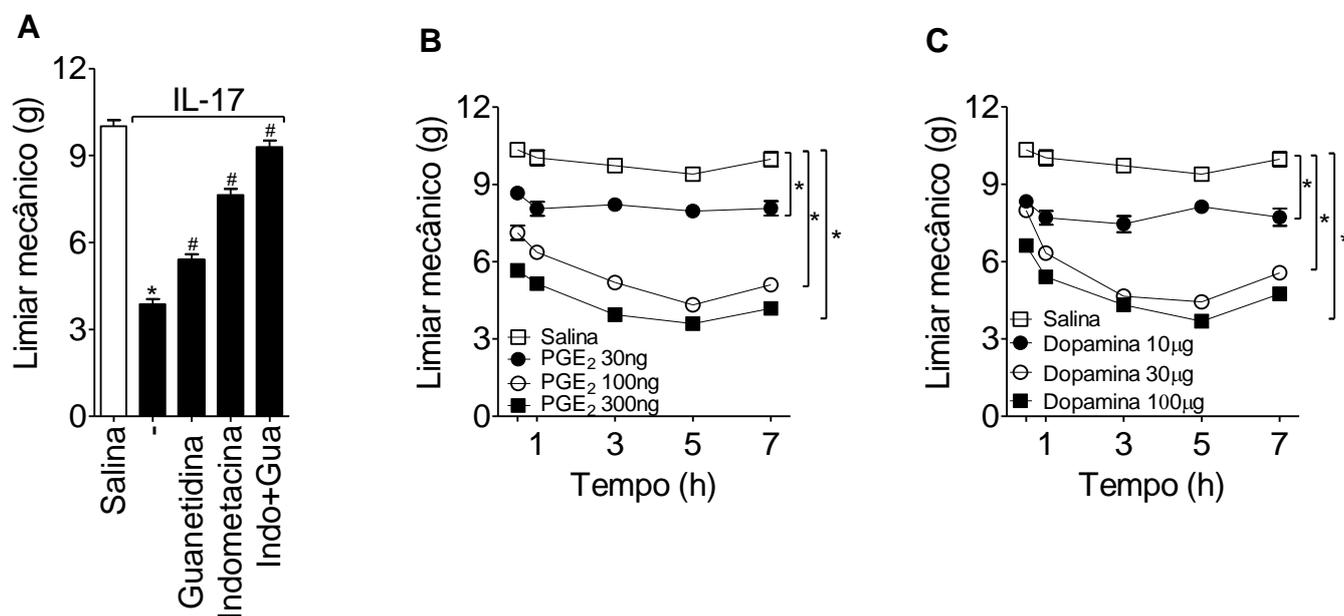


Figura 25- Papel dos prostanóides e das aminas simpatomiméticas na hipernociceção articular induzida pela IL-17. Painel A: A hipernociceção articular em camundongos balb/c desafiados com IL-17 (30 ng por articulação) e pré-tratados com guanetidina (30 mg/kg, s.c. 60 min antes da injeção do estímulo), indometacina (5 mg/kg, i.p. 30 min antes da injeção do estímulo) ou pela associação indometacina + guanetidina foi avaliada 7 h após o desafio. **Painéis B e C:** Curvas dose e tempo resposta da hipernociceção articular induzida pelas injeções i.a. de PGE₂ (30-300 ng/ cavidade) (**Painel B**) e dopamina (10-100 µg/ cavidade) (**Painel C**) em camundongos balb/c imunizados com mBSA. As respostas hipernociceptivas foram avaliadas 0,5, 1, 3, 5 e 7 h após a injeção do estímulo. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. de 5 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina e, # $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu IL-17.

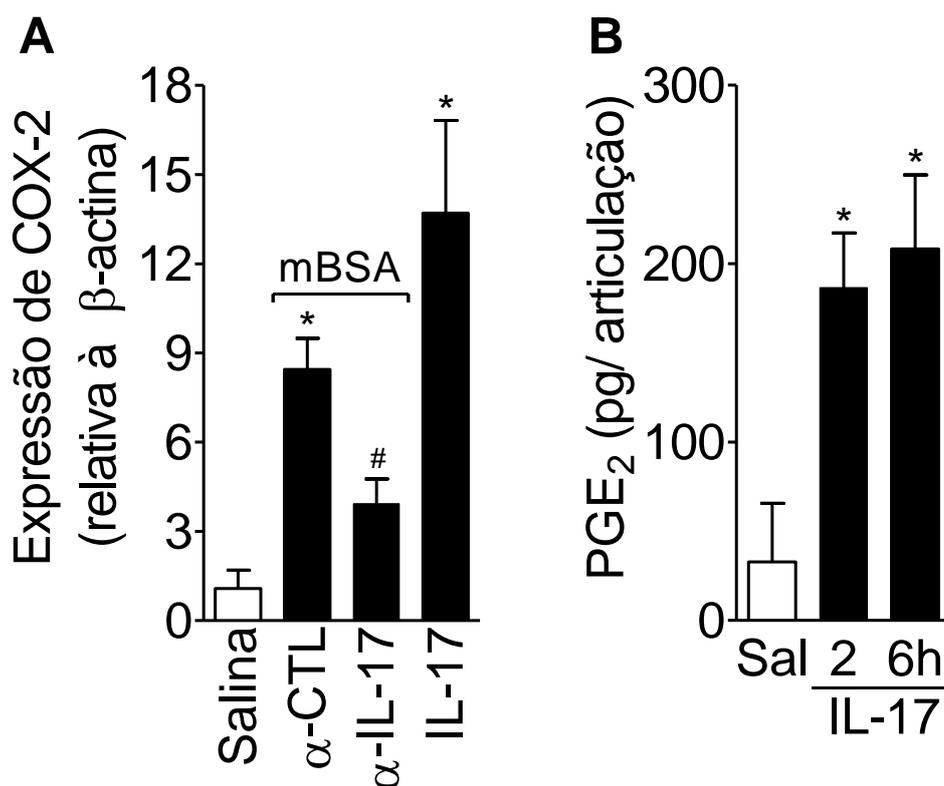


Figura 26- Efeito do desafio i.a. com IL-17 sobre a expressão de RNAm para COX-2 e a produção de PGE₂ na sinóvia. Painel A: Camundongos balb/c imunizados com mBSA foram desafiados i.a. com salina, IL-17 (30 ng) ou mBSA (30 μ g) e tratados com uma co-injeção de anticorpos IgG controle (α -CTL) ou anti-IL-17 (2,25 μ g/cavidade). Após 1,5 h, as membranas sinoviais foram coletadas e a expressão de RNAm para COX-2 foi analisada por PCR. A expressão do gene foi normalizada em relação à expressão de β -actina. **Painel B:** As articulações de camundongos balb/c imunizados com mBSA foram coletadas 2 e 6 h após o desafio i.a. com IL-17 e os níveis de PGE₂ foram determinados. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo e representa dois experimentos independentes. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu salina e, # $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo que recebeu mBSA.

5. Discussão

A IL-17 é uma família de citocinas constituída por seis membros, sendo a IL-17A o membro protótipo dessa família. A IL-17A foi descrita pela primeira vez em 1995 como uma citocina pró-inflamatória produzida por células T (Yao et al., 1995). Desde sua descoberta vários estudos têm demonstrado diferentes papéis para esta citocina, tanto na proteção contra infecções por diferentes microorganismos como na indução e manutenção de doenças inflamatórias crônicas. Em doenças auto-imunes, incluindo a AR, a IL-17A parece ter um papel mais importante no desenvolvimento e na progressão da auto-imunidade do que os outros constituintes desta família de citocinas (Gaffen, 2009). De fato, diversos trabalhos têm demonstrado a participação da IL-17 nos múltiplos eventos inflamatórios durante a AR, como na liberação de vários mediadores inflamatórios, os quais estão envolvidos com a migração neutrofílica, erosão óssea e destruição tecidual (Witowski et al. 2004). No entanto, o papel da IL-17 na gênese da dor que é um dos sintomas mais importantes da AR uma vez que provoca prejuízos para a vida do paciente (McDougall, 2006), ainda não havia sido elucidado. Neste estudo, demonstramos pela primeira vez o papel pró-nociceptivo da IL-17 em um modelo de AIA em camundongos. Os resultados obtidos sugerem que a IL-17 pode ser um potencial alvo terapêutico para o controle da dor inflamatória durante a AR.

Com o intuito de estudar os mecanismos desencadeantes da dor na AR, a escolha de um modelo experimental que se aproxima dos eventos fisiopatológicos da AR é importante. O modelo de artrite induzida por mBSA, um antígeno proteico, em camundongos, é um modelo experimental adequado e reproduzível que apresenta várias características semelhantes as observadas na AR humana, incluindo no que se refere a dor (Brackertz et al., 1977). Trabalhos prévios do nosso

laboratório demonstraram que a administração de mBSA intraplantar e na articulação tíbio-tarsal de camundongos imunizados produz diminuição do limiar nociceptivo mecânico de forma dose e tempo dependente (Cunha et al., 2008b; Verri et al., 2008). No presente estudo, observamos que a administração de mBSA na articulação fêmur-tibial também produziu um efeito hipernociceptivo com um perfil semelhante ao observado após o desafio na pata ou na articulação tíbio-tarsal, com a vantagem que na articulação fêmur-tibial pode ser realizada uma quantificação direta do influxo de células para a articulação, ao contrário dos outros tecidos onde a migração de neutrófilos é avaliada indiretamente pela atividade mieloperoxidase devido a dificuldade técnica de se realizar um lavado da articulação tíbio-tarsal.

Primeiramente, avaliamos o envolvimento da IL-17 na hipernocicepção articular no modelo de AIA. Nossos dados demonstraram que a IL-17 participa da cascata de eventos envolvidos na gênese da hipernocicepção observada durante a artrite induzida por antígeno em camundongos. De fato, o uso de um anticorpo neutralizante específico para IL-17 reduziu a hipernocicepção induzida pelo mBSA. Corroborando com este dado, foi encontrado um aumento dos níveis de IL-17 no exsudato articular após a injeção de mBSA, e além disso a administração direta de IL-17 recombinante diminuiu o limiar nociceptivo dos camundongos.

De acordo com nossos dados, um recente estudo demonstrou que existe uma relação entre a IL-17 e o estabelecimento da dor. Kleinschnitz et al. (2006) demonstraram que após a injúria por constrição crônica do nervo ciático em camundongos (o qual é um modelo de dor neuropática), as células Th17 infiltram o local da lesão e ocorre a liberação de IL-17. Assim, drogas que tenham como alvo a IL-17 poderiam ser uma estratégia eficaz no tratamento da dor neuropática.

No entanto, no modelo de artrite induzida por zimosan, um modelo de inflamação inata, a IL-17 não participa da hipernocicepção observada. O zimosan é um polissacarídeo da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* que se liga ao receptor tipo Toll 2 induzindo uma hipernocicepção persistente, mediada pelo infiltrado de neutrófilos, com participação de prostaglandinas, citocinas e LTB₄ (Frasnelli et al., 2005; Guerrero et al., 2008). Embora a AIZ seja caracterizada como um modelo de inflamação inata, existem evidências que em uma fase mais tardia esteja associada com o desenvolvimento de respostas imune específicas para o zimosan, havendo participação de componente humoral e celular. Deste modo, é provável que durante a fase crônica, onde observa-se a presença de linfócitos T no tecido inflamado, a participação da IL-17 na hipernocicepção articular induzida pelo zimosan seja observada.

O papel da IL-17 na inflamação e destruição articular já foi demonstrado em diferentes modelos experimentais de artrite. A neutralização da IL-17 durante a artrite induzida por colágeno (CIA) demonstrou que a IL-17 possui um importante papel nos estágios iniciais e finais da CIA (Lubberts et al., 2004). Além disso, a participação da IL-17 na artrite foi demonstrada em outro modelo de artrite, na artrite induzida por parede celular de *Streptococcus* (SCW- streptococcal cell wall). Neste modelo experimental de artrite, a sinalização via IL-17R não possui um papel significativo na inflamação articular aguda induzida por uma única injeção de fragmentos de SCW na articulação. No entanto, repetidas administrações de fragmentos de SCW na articulação de camundongos IL-17R^{-/-} resultaram em menor infiltrado celular na articulação fêmur-tibial comparado aos animais controle (Koenders et al., 2005). Embora os autores não tenham investigado uma possível participação da IL-17 na gênese da hipernocicepção articular neste modelo, com

base nos dados relatados acima, poderíamos supor um possível papel pró-nociceptivo da IL-17 durante a fase mais crônica da doença, quando células Th17 possivelmente estão envolvidas.

Uma vez determinado que a IL-17 participa da gênese da hipernocicepção articular em um modelo de artrite induzida por antígeno, fomos avaliar os mecanismos pelos quais a IL-17 produz esse efeito. Estudos prévios têm demonstrado que o papel da IL-17 na patogênese da AR é secundário a indução de vários mediadores inflamatórios, incluindo TNF- α , IL-1 β e ligantes dos receptores de quimiocinas CXCR1/2 (Arend et al., 1995; Lemos et al., 2009; Ruddy et al., 2004a). Por exemplo, a IL-17 estimula a expressão de RNAm e a síntese de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β em vários tipos de células (Jovanovic et al., 1998). Além disso, a IL-17 pode agir com estas citocinas promovendo um efeito sinérgico. Isto tem sido demonstrado em estudos realizados em modelos animais de AR, uma vez que o bloqueio de IL-17, TNF- α e IL-1 β foram mais efetivos no controle da inflamação sinovial e na reabsorção óssea do que o bloqueio destas citocinas individualmente (Chabaud & Miossec, 2001). Em relação às quimiocinas, diversos trabalhos realizados em modelos experimentais de artrite têm evidenciado a importância das quimiocinas CXC nesta patologia. De fato, Grespan et al. (2008) e Cunha et al., (2008a) demonstraram que o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular, a hipernocicepção e a lesão tissular nos modelos de artrite induzida por mBSA e CIA são mediados pelas quimiocinas KC/CXCL1 e LIX/CXCL5, as quais são ligantes dos receptores CXCR1/2. Deste modo, uma vez que as citocinas e as quimiocinas possuem um importante papel na gênese da resposta hipernociceptiva a qual é desencadeada por uma resposta inflamatória inata ou adaptativa, nós testamos a hipótese de que estas citocinas e quimiocinas também

estariam mediando a hipernocicepção articular induzida pela IL-17. Confirmando nossa hipótese, foi observado que tanto a inibição farmacológica quanto genética do TNF- α , IL-1 β e dos ligantes CXCR1/2 preveniram o efeito hipernociceptivo causado pela IL-17.

Em um recente estudo, nós demonstramos que a hipernocicepção mecânica induzida pelo desafio com mBSA em camundongos imunizados foi dependente da liberação inicial de TNF- α , a qual induziu a liberação subsequente de IL-1 β e KC/CXCL1 (Cunha et al., 2008b). Portanto, nesta cascata de eventos hierárquicos da hipernocicepção durante a artrite induzida por antígeno, a IL-17 pode ter um papel fundamental antecedendo a liberação dos mediadores mencionados acima. Outra citocina que está envolvida no efeito hipernociceptivo na artrite induzida por antígeno é a IL-33 (Verri et al., 2008). A ação hipernociceptiva da IL-33 depende da liberação inicial de TNF- α e IL-1 β . Assim, é possível que a IL-33 possa desencadear a hipernocicepção induzida pela IL-17. Esta hipótese é consistente com dados recentes que mostram que o bloqueio da sinalização IL-33/ST2 inibiu o eixo IL-17 na artrite experimental (Palmer et al., 2009; Xu et al., 2008).

Os neutrófilos desempenham um papel importante nos distúrbios inflamatórios, como na AR, contribuindo para o dano tecidual associado a estas doenças (Kitsis et al., 1991). De fato, Hollingsworth et al. (1967) relataram que em torno de 90% das células encontradas no fluido sinovial de pacientes com AR são neutrófilos. No presente estudo, observou-se que a diminuição do limiar nociceptivo produzido pelo mBSA na artrite induzida por antígeno ocorre concomitantemente com um aumento no número de neutrófilos que infiltraram a articulação, sugerindo uma associação entre esses dois eventos. Realmente, foi detectado que o tratamento dos camundongos com fucoïdina, a qual diminuiu o acúmulo de

neutrófilos nas articulações por inibir as selectinas (Ley et al., 1993), reduziu a hipernocicepção induzida pelo mBSA. Estes resultados são coerentes com trabalhos anteriores do nosso grupo, que mostraram que a inibição do acúmulo de neutrófilos inibiu a resposta hipernociceptiva induzida por inflamação imune inata ou adquirida (Cunha et al., 2008 a; b; Guerrero et al., 2008; Ting et al., 2008; Verri et al., 2009). A participação dos neutrófilos na gênese da hipernocicepção durante a artrite induzida por mBSA parece ser desencadeada pela IL-17. Esta associação é suportada pela constatação de que a hipernocicepção articular induzida pela IL-17 foi acompanhada pelo acúmulo de neutrófilos nas articulações, sendo reduzida pela inibição do recrutamento de neutrófilos pelo tratamento com fucoidina.

É importante salientar que os mecanismos pelos quais a IL-17 medeia à migração de neutrófilos podem ser secundários a sua capacidade de produzir mediadores quimiotáticos clássicos, como o TNF- α e os ligantes CXCR1/2, que também medeiam a hipernocicepção induzida pela IL-17 (Albanesi et al., 1999; Lemos et al., 2009). Neste contexto, com o objetivo de esclarecer a relação entre hipernocicepção e migração celular, avaliamos a interferência dos tratamentos que inibiram a hipernocicepção induzida pela IL-17 sobre o recrutamento de neutrófilos. Realmente, a inibição genética ou farmacológica do TNF- α , IL-1 β e dos ligantes CXCR1/2, diminuíram a migração de leucócitos para a articulação, demonstrando uma interdependência entre estes dois processos. Embora o papel dos neutrófilos na hipernocicepção induzida pela IL-17 seja totalmente compreendido, pode resultar de vários mecanismos: a) os neutrófilos são fonte de citocinas pró-nociceptivas e quimiocinas (Cunha et al., 2008c); b) os neutrófilos desempenham um papel na gênese da hipernocicepção inflamatória, desencadeando a produção de PGE₂ e LTB₄ (Guerrero et al., 2008); c) os neutrófilos podem também ser uma fonte de

radicais livres (superóxido, peroxinitrito) e MMPs, que contribuem para a gênese da hipernocicepção (Bezerra et al., 2007).

As metaloproteinases da matriz extracelular são uma família de enzimas proteolíticas zinco-dependentes as quais possuem um importante papel na degeneração da cartilagem articular. Chabaud et al. (2000) demonstraram que a IL-17 induz MMPs as quais estão envolvidas no dano tecidual na AR. Neste sentido, estudo realizado com animais nocaute para o receptor da IL-17 demonstrou uma redução da expressão sinovial de MMPs 3, 9 e 13 levando a um menor dano na cartilagem e erosão óssea (Koenders et al., 2005). No presente estudo, nós demonstramos que a MMP-9, mas não a MMP-2, parece participar do efeito hipernociceptivo da IL-17. A MMP-2 e a MMP-9 (gelatinases A e B, respectivamente) são produzidas em grandes quantidades no fluido sinovial reumatóide (Tchetverikov et al., 2004; Yoshihara et al., 2000). Recentemente, foi demonstrado que a MMP-2 e a MMP-9 estão envolvidas no desenvolvimento da dor neuropática (Kawasaki et al., 2008). Neste trabalho, os autores relataram que existe uma regulação temporal e localização celular diferentes da MMP-2 e da MMP-9 durante o desenvolvimento da dor neuropática. Na fase inicial, ocorre um aumento da expressão e da liberação de MMP-9 nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) após a lesão do nervo. Essa MMP atua como um dos fatores desencadeantes da ativação da micróglia espinhal e no desenvolvimento da dor neuropática através da indução da clivagem da IL-1 β e ativação de p38 microglial. Enquanto, em uma fase mais tardia, a MMP-2 está envolvida na manutenção da dor neuropática através da clivagem da IL-1 β e ativação de astrócitos. Além disso, a inibição local da MMP-9 e da MMP-2 suprimiu a fase inicial e tardia da dor neuropática, respectivamente (Kawasaki et al., 2008). Assim, nossos resultados corroboram com esses achados, uma vez que

observamos que a IL-17 induz um aumento da expressão de MMP-9, mas não de MMP-2 na sinóvia durante um estágio inicial da artrite. No entanto, é provável que durante uma fase crônica um aumento na expressão de MMP-2 seja observado. Ao contrário da MMP-2, que é constitutivamente expressa em diversos tipos de células, a expressão de MMP-9 é principalmente induzida nos leucócitos durante o processo inflamatório (Parks et al., 1998). Além disso, a IL-17 induz a produção de MMP-9 pelos leucócitos humanos (Jovanovic et al., 2000). Assim, é razoável sugerir que durante a artrite induzida por mBSA, a IL-17 é capaz de induzir a liberação de MMP-9 pelos neutrófilos que migram para o foco inflamatório, contribuindo assim para a resposta hipernociceptiva. Embora os mecanismos pelos quais a MMP-9 participa da hipernocicepção induzida pela IL-17 não tenham sido esclarecidos neste estudo, existem evidências de que as MMPs podem agir como uma enzima no processamento de diferentes precursores de mediadores inflamatórios incluindo a Pró-IL-1 e a Big ET-1 (Fernandez-Patron et al., 1999; 2001; Schönbeck et al., 1998). De fato, foi demonstrado por Fernandez-Patron et al. (2001), que MMP-9 é capaz de converter Big ET-1 em ET-1 nos neutrófilos.

A endotelina-1 é um potente peptídeo vasoconstritor que atua através da ativação de dois tipos de receptores de endotelina, ET_A e ET_B (Sokolovsky et al., 1995, Yanagisawa et al., 1988). A ET-1 está envolvida em diversos eventos inflamatórios, incluindo a dor (Ferreira et al. 1989). Assim, baseado nestas evidências e estudos que mostraram que as endotelinas induzem hipernocicepção e medeiam a hipernocicepção induzida por antígeno e por várias citocinas, como IL-15, IL-18 e IL-33 em camundongos imunizados (Verri et al., 2006; 2007; 2008; 2009), a participação das endotelinas foi também avaliada no efeito hipernociceptivo da IL-17. De fato, nós demonstramos que o efeito hipernociceptivo da IL-17 também

é dependente de endotelinas, uma vez que o tratamento com bosentan (antagonista não-seletivo dos receptores ET_A e ET_B) inibiu esse efeito. O efeito hipernociceptivo da endotelina na sensibilização dos nociceptores pode ser direto ou indireto. Em 1989, Ferreira et al. demonstraram que a administração de ET-1 i.p. induz contorções abdominais em camundongos que é dependente de prostanóides. No entanto, no modelo de pressão constante na pata de ratos a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção de ET-1 independe de prostanóides e aminas simpáticas (Ferreira et al., 1989). Outros trabalhos do nosso grupo demonstraram que a hipernocicepção mecânica induzida pela administração das citocinas IL-18 e IL-12 na pata de ratos é independente de prostaglandinas e aminas simpáticas, e sim via ação da endotelina nos receptores ET_B (Verri et al., 2004; 2005). Como relatado anteriormente, a endotelina participa do efeito pró-nociceptivo articular induzido pela IL-15, IL-18 e IL-33 em modelo de AIA. A IL-15 e a IL-18 agem liberando de forma seqüencial IFN- γ , ET-1 (agindo nos receptores ET_A) e PGE₂, no entanto estas citocinas não agem em seqüência e sim sinergicamente mediando a hipernocicepção induzida por antígeno (Verri et al., 2006; 2007). Já a IL-33 medeia a hipernocicepção induzida por antígeno através de uma cascata de sinalização dependente da liberação de TNF- α , IL-1 β , INF- γ , ET-1 e PGE₂ (Verri et al., 2008). É provável que a IL-15, IL-18 e IL-33 atuem paralelamente e através de vias iniciais distintas, mas em conjunto transmitem o sinal hipernociceptivo através do IFN- γ , que por sua vez induz a produção de ET-1 e PGE₂. Com base nestes dados, é bem possível que a participação da endotelina na hipernocicepção articular induzida pela IL-17 deve ocorrer de forma indireta, através da indução da liberação de PGE₂.

Em geral, os efeitos hipernociceptivos das citocinas (TNF- α , IL-1 β), quimiocinas e também das endotelinas não resulta de uma ação direta nos

neurônios nociceptivos primários. Em vez disso, estas citocinas parecem induzir a liberação de mediadores que agem sensibilizando diretamente o nociceptor, como as prostaglandinas e as aminas simpáticas (Ferreira et al., 1978; 1989; Khasar et al., 1999). Realmente, Cunha et al. (2005) demonstraram em camundongos que a hipernocicepção mecânica depende da síntese e liberação de uma cascata de citocinas que precede a liberação dos mediadores finais. A cascata de citocinas inicia com o TNF- α e KC, os quais estimulam a liberação de IL-1 β . Os mediadores finais desta cascata são as prostaglandinas liberadas pela IL-1 β e as aminas simpáticas liberadas pelo KC (Cunha et al., 2005). O papel pró-nociceptivo da IL-17 foi também mediado pela produção e/ou liberação de prostaglandinas e aminas simpatomiméticas. Nossos dados sustentam esta hipótese desde que a administração de IL-17 *in vivo* induziu um aumento na expressão de RNAm para COX-2 e a produção de PGE₂ na membrana sinovial. Estes resultados corroboram com outros estudos nos quais a IL-17 induz a síntese de PGE₂ dependente de COX-2 nos sinoviócitos e osteoblastos (Fossiez et al., 1996; Kotake et al., 1999) e que as prostaglandinas estão envolvidas na gênese da hipernocicepção induzida por antígeno (Cunha et al., 2008b; Verri et al., 2008). Embora não tenha sido determinado, podemos supor que a produção de prostanóides pela IL-17 possa ser secundária à estimulação de IL-1 β , uma vez que a IL-1 β é um importante indutor da expressão de COX-2 e produção de PGE₂ (Angel et al., 1994; Jorgensen et al., 1991).

A estimulação do componente simpático na hipernocicepção articular induzida pela IL-17 também pode ser indireta, em um processo dependente de quimiocinas. Realmente, como mencionado acima, foi demonstrado que as quimiocinas estimulam o componente simpático da hipernocicepção inflamatória (Cunha et al.,

1991; Cunha et al., 2005). Outra possibilidade é que os neutrófilos recrutados pela ação da IL-17 possam produzir aminas simpáticas. Esta hipótese é baseada em achados que neutrófilos apresentam a maquinaria enzimática para produzir estas substâncias, e após ativação por uma variedade de estímulos inflamatórios, eles podem liberar aminas simpáticas (Flierl et al., 2007; 2009).

É importante ressaltar que nossos resultados não excluem a possibilidade que a IL-17 pode agir diretamente nos neurônios sensitivos induzindo sua sensibilização. Os efeitos “duais” (efeito direto e indireto nos neurônios nociceptivos) têm sido descritos para outras citocinas. De fato, um recente estudo demonstrou que a IL-6, uma citocina pró-inflamatória encontrada em níveis elevados no soro e fluido sinovial de pacientes com AR, pode agir diretamente nas fibras sensoriais não mielinizadas (fibras C) sugerindo um importante papel desta citocina na estimulação mecânica articular (Brenn et al., 2007). Além disso, outras duas citocinas que possuem um importante papel na artrite reumatóide, o TNF- α e a IL-1 β , também podem agir sensibilizando diretamente os nociceptores (Boettger et al., 2008; Copray et al., 2001).

6. *Conclusão*

O conjunto dos resultados apresentados demonstra que a IL-17 é uma citocina pró-nociceptiva no modelo de artrite induzida por antígeno. Além disso, nossos resultados sugerem que vários mediadores inflamatórios estão envolvidos neste efeito. Os mediadores que participam dos mecanismos pelos quais a IL-17 induz hipernocicepção são as citocinas TNF- α e IL-1 β , os ligantes dos receptores CXCR1/2, neutrófilos, metaloproteinases, endotelinas, prostaglandinas e aminas simpatomiméticas. Este estudo é de fundamental importância, pois sugere pela primeira vez a IL-17 como uma citocina com um papel hipernociceptivo, sendo um alvo terapêutico para o controle da dor durante a artrite reumatóide.

7. Referências

- Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 1999; 162: 494-502.
- Angel J, Berenbaum F, Le Denmat C, Nevalainen T, Masliah J, Fournier C. Interleukin-1-induced prostaglandin E2 biosynthesis in human synovial cells involves the activation of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2. *Eur J Biochem* 1994; 226: 125-31.
- Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 151-60.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009; 139: 267-84.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441: 235–38.
- Bezerra MM, Brain SD, Girao VC, Greenacre S, Keeble J, Rocha FA. Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2007; 374: 265-73.
- Boettger MK, Hensellek S, Richter F, Gajda M, Stöckigt R, von Banchet GS, Bräuer R, Schaible HG. Antinociceptive effects of tumor necrosis factor alpha neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: evidence of a neuronal target. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 2368-78.
- Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of

- arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 1977; 20: 841-50.
- Brenn D, Richter F, Schaible HG. Sensitization of unmyelinated sensory fibers of the joint nerve to mechanical stimuli by interleukin-6 in the rat: an inflammatory mechanism of joint pain. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 351-9.
- Brinder R, Kress A, Kirschfink M. Modulation of C5a-mediated effector functions of human polymorphonuclear leukocytes by tumor necrosis factor alpha and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Exp Clin Immunogenet* 1999; 16: 212-225.
- Burke-Gaffney A, Hellewell PG. Tumour necrosis factor-alpha-induced ICAM-1 expression in human vascular endothelial and lung epithelial cells: modulation by tyrosine kinase inhibitors. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 1149-58.
- Bush KA, Farmer KM, Walker JS, Kirkham BW. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 802-5.
- Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, Miossec P. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 963-70.
- Chabaud M, Garnero P, Dayer JM, Guerne PA, Fossiez F, Miossec P. Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. *Cytokine* 2000; 12:1092-9.
- Chabaud M, Miossec, P. The combination of tumor necrosis factor alpha blockade with interleukin-1 and interleukin-17 blockade is more effective for controlling synovial inflammation and bone resorption in an ex vivo model. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1293-303.
- Chabaud M, Page G, Miossec P. Enhancing effect of IL-1, IL-17, and TNF-alpha on

- macrophage inflammatory protein-3 α production in rheumatoid arthritis: regulation by soluble receptors and Th2 cytokines. *J Immunol* 2001; 167: 6015-20.
- Chua AO, Wilkinson VL, Presky DH, Gubler U. Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component. *J Immunol* 1995; 155: 4286-94.
- Cook CD, Nickerson MD. Nociceptive sensitivity and opioid antinociception and antihyperalgesia in Freund's adjuvant-induced arthritic male and female rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313: 449-59.
- Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med* 1997; 186: 39-45.
- Cousins MJ, Cohen ML. Physiology and Psychology of Acute Pain, In: *Acute Pain Management: Scientific Evidence* (Cousins MJ and Cohen ML eds) 2005; pp 1-19, Australian and New Zealand College of Anaesthetists, Melbourne.
- Copray JC, Mantingh I, Brouwer N, Biber K, Kust B M, Liem R S, Huitinga I, Tilders FJ, Van Dam AM, Boddeke HW. Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. *J Neuroimmunol* 2001; 118: 203–211.
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein R A, Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003; 6924: 744-8.
- Cunha FQ, Lorenzetti BB, Poole S, Ferreira SH. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. *Br J Pharmacol* 1991; 104: 765-7.
- Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. The pivotal role of tumour necrosis

- factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1992; 107: 660-4.
- Cunha JM, Sachs D, Canetti CA, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. The critical role of leukotriene B4 in antigen-induced mechanical hyperalgesia in immunised rats. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 1135-45.
- Cunha TM, Verri Jr WA, Vivancos GG, Moreira IF, Reis S, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 401-7.
- Cunha TM, Verri Jr WA, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 1755-60.
- Cunha TM, Verri JR WA, Poole S, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. Pain facilitation by proinflammatory cytokine actions at peripheral nerve terminals. *Immune and Glial Regulation of Pain*, Iasp Press, Seattle 2007; pp. 67–83.
- Cunha TM, Barsante MM, Guerrero AT, Verri Jr WA, Ferreira SH, Coelho FM, Bertini R, Di Giacinto C, Allegretti M, Cunha FQ, Teixeira MM. Treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, diminishes neutrophil influx and inflammatory hypernociception in mice. *Br J Pharmacol* 2008a; 154: 460-70.
- Cunha TM, Verri Jr WA, Valerio DA, Guerrero AT, Nogueira LG, Vieira SM, Souza DG, Teixeira MM, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. Role of cytokines in mediating mechanical hypernociception in a model of delayed-type hypersensitivity in mice. *Eur J Pain* 2008b; 12: 1059-68.
- Cunha TM, Verri Jr WA, Schivo IR, Napimoga MH, Parada CA, Poole S, Teixeira MM, Ferreira SH, Cunha FQ. Crucial role of neutrophils in the development of

- mechanical inflammatory hypernociception. *J Leukoc Biol* 2008c; 83: 824-32.
- Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MA Jr, O'Connor JV: Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1. *J Exp Med* 1986; 163: 1443-50.
- Feldmann M, Brennan FM, Chantry D, Haworth C, Turner M, Abney E, Buchan G, Barrett K, Barkley D, Chu A & et al. Cytokine production in the rheumatoid joint: implications for treatment. *Ann Rheum Dis* 1990, 49: 480-6.
- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996; 85: 307- 10.
- Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* 1999; 85: 906–911.
- Fernandez-Patron C, Zouki C, Whittal R, Chan JS, Davidge ST, Filep JG. Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1[1-32]. *FASEB J* 2001; 15: 2230-40.
- Ferreira SH, Nakamura M, de Abreu Castro MS. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. *Prostaglandins* 1978; 16: 31-7.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Bristow AF, Poole S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature* 1988; 334: 698-700.
- Ferreira SH, Romitelli M, de Nucci G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13: 220-2.
- Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003, 423: 356-61.
- Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Chen AJ, Sarma JV, Zetoune FS, McGuire SR, List RP, Day DE, Hoesel LM, Gao H, Van Rooijen N, Huber-Lang MS, Neubig

- RR, Ward PA. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature* 2007; 449: 721-5.
- Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Sarma JV, Day DE, Lentsch AB, Huber-Lang MS, Ward PA. Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response. *PLoS ONE* 2009; 4: 4414.
- Flórez J. Terapéutica Farmacológica del dolor, in *Dolor: mecanismos de transmission y control*. Flórez J ed, Madrid, 1993: 19-39.
- Fossiez F, Djossou O, Chomar P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996; 183: 2593-603.
- Frasnelli ME, Tarussio D, Chobaz-Péclat V, Busso N, So A. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: 370-9.
- Fricke D, Damerau B, Vogt W. Adhesion of Guinea Pig polymorphonuclear leukocytes to autologous aortic strips: Influence as chemotactic factors and of pharmacological agents wich affect arachidonic acid metabolism. *Int. Arhs Allergy Appl Immunol* 1985; 78: 429-437.
- Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature Reviews Immunology* 2009; 9: 556–67.
- Grespan R, Fukada SY, Lemos HP, Vieira SM, Napimoga MH, Teixeira MM, Fraser AR, Liew FY, McInnes IB, Cunha FQ. CXCR2-specific chemokines mediate leukotriene B4-dependent recruitment of neutrophils to inflamed joints in mice with antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:2030–40.

- Guerrero AT, Verri Jr WA, Cunha TM, Silva TA, Rocha FA, Ferreira SH, Cunha FQ, Parada CA. Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. *Pharmacol Biochem Behav* 2006; 84: 244-51.
- Guerrero AT, Verri Jr WA, Cunha TM, Silva TA, Schivo IR, Dal-Secco D, Canetti C, Rocha FA, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. Involvement of LTB₄ in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE₂. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 122-30.
- Gutierrez FR, Lalu MM, Mariano FS, Milanezi CM, Cena J, Gerlach RF, Santos JE, Torres-Dueñas D, Cunha FQ, Schulz R, Silva JS. Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Infect Dis* 2008; 197: 1468-76.
- Hardy JD, Wolff HG, Goodell H. Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. *J Clin Invest* 1950; 29: 115-40.
- Harris ED, Jr. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990; 322: 1277-89.
- Hentzen ER, Neelamegham S, Kansas GS, Benanti JA, McIntire LV, Smith CW, Simon SI. Sequential binding of CD11a/CD18 and CD11b/CD18 defines neutrophil capture and stable adhesion to intercellular adhesion molecule-1. *Blood* 2000; 95: 911-20.
- Hollingsworth JW, Siegel ER, Creasey WA. Granulocyte survival in synovial exudate of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory joint diseases. *Yale J Biol Med* 1967; 39: 289-96.

- Huttenlocher A, Sandborg RR, Horwitz AF. Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 697-706.
- Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992a; 69: 11-25.
- Hynes RO. Specificity of cell adhesion in development: the cadherin superfamily. *Curr Opin Genet Dev* 1992b; 2: 621-4.
- Inglis JJ, Nissim A, Lees DM, Hunt SP, Chernajovsky Y, Kidd BL. The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: 807-16.
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; 126: 1121–33.
- Jones DA, Abbassi O, McIntire LV, McEver RP, Smith CW. P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells. *Biophys J* 1993; 65: 1560-9.
- Jones CE, Chan K. Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26: 748-53.
- Jorgensen C, Angel J, Fournier C. Regulation of synovial cell proliferation and prostaglandin E2 production by combined action of cytokines. *Eur Cytokine Netw* 1991; 2: 207-15.
- Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 1998; 160: 3513-21.

- Jovanovic DV, Martel-Pelletier J, Di Battista JA, Mineau F, Jolicoeur FC, Benderdour M, Pelletier JP. Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:1134-44.
- Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001; 413: 203-210.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. The perception of pain. In: *Principles of neural science*, 4ª ed. EUA : MacGraw-Hill, cap. 24, 2000, p. 472-491.
- Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang SK. IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 1265-73.
- Kawasaki Y, Xu ZZ, Wang X, Park JY, Zhuang ZY, Tan PH, Gao YJ, Roy K, Corfas G, Lo EH, Ji RR. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. *Nat Med* 2008; 14: 331-6.
- Kellgren J.H. Some painful joint condition and their relation to osteoarthritis. *Clinical Science* 1939, 4: 193-205.
- Keystone EC, Schorlemmer HU, Pope C, Allison AC. Zymosan-induced arthritis: A model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. *Arthritis Rheum* 1977; 20: 1396-1401.
- Khasar SG, McCarter G, Levine JD. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. *J Neurophysiol* 1999; 81: 1104-12.
- Kitsis E, Weissmann G. The role of the neutrophil in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop Relat Res* 1991; 63-72.
- Kleinschnitz C, Hofstetter HH, Meuth SG, Braeuninger S, Sommer C, Stoll G. T cell infiltration after chronic constriction injury of mouse sciatic nerve is associated

- with interleukin-17 expression. *Exp Neurol* 2006; 200: 480-5.
- Koch AE, Kunkel SL, Burrows JC, Evanoff HL, Haines GK, Pope RM, Strieter RM. Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8. *J Immunol* 1991; 147: 2187-95.
- Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Mazarakis DD, Haines GK, Burdick MD, Pope RM, Strieter RM. Macrophage inflammatory protein-1 alpha. A novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1994; 93: 921-8.
- Koenders MI, Kolls JK, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Joosten LA, Schurr JR, Schwarzenberger P, van den Berg WB, Lubberts E. Interleukin-17 receptor deficiency results in impaired synovial expression of interleukin-1 and matrix metalloproteinases 3, 9, and 13 and prevents cartilage destruction during chronic reactivated streptococcal cell wall-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3239-47.
- Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature* 2007; 448: 484–87.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 485-517.
- Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 1999; 103: 1345-52.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell

- population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005; 201: 233-40.
- Lawrence M B, Springer TA. Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol* 1993; 151: 6338-46.
- Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME. Oxygen-independent bactericidal systems. Mechanisms and disorders. *Hematol Oncol Clin North Am* 1988; 2: 159-69.
- Lemos HP, Grespan R, Vieira SM, Cunha TM, Verri Jr WA, Fernandes KS, Souto FO, McInnes IB, Ferreira SH, Liew FY, Cunha FQ. Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFN γ production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 5954-9.
- Levine JD, Lau W, Kwiat G, Goetzl EJ. Leukotriene B₄ produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. *Science* 1984; 225: 743-5.
- Ley K, Linnemann G, Meinen M, Stoolman LM, Gaehtgens P. Fucoidin, but not yeast polyphosphomannan PPME, inhibits leukocyte rolling in venules of the rat mesentery. *Blood* 1993; 81: 177-85.
- Li MO, Flavell RA. TGF- β : a master of all T cell trades. *Cell* 2008; 134: 392-404.
- Liang SC, Long AJ, Bennett F, Whitters MJ, Karim R, Collins M, Goldman SJ, Dunussi-Joannopoulos K, Williams CM, Wright JF, Fouser LA. An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment. *J Immunol* 2007; 179: 7791-9.
- Liu H, Mantyh PW, Basbaum AI. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. *Nature* 1997; 386: 721-4.
- Loeser JD, Melzack R. Pain: an overview. *Lancet* 1999; 353: 1607-9.
- Lorenzetti BB, Veiga FH, Canetti CA, Poole S, Cunha FQ, & Ferreira SH: Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic

- component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. *Eur Cytokine Netw* 2002; 13: 456-61.
- Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Joosten LA, van den Berg WB. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 650-9.
- Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: 29-37.
- Macmillan RM, Foster SJ. Leukotriene B₄ and inflammatory disease. *Agents Actions* 1988; 24: 114-9.
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. *Nature* 2006; 441: 231–34.
- Mantovani A, Dejana E. Modulation of endothelial function by interleukin-1. *Biochem Pharmacol* 1998; 36: 301-5.
- Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 2005; 201: 1061-7.
- McDougall JJ. Arthritis and pain. Neurogenic origin of joint pain. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: 220.
- McInnes IB, Leung BP, Sturrock RD, Field M, Liew FY. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1997; 3: 189-95.

- Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 1999; 57: 1-164.
- Mills KH. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol* 2008; 38: 2636-49.
- Mitani Y, Honda A, Jasin HE. Polymorphonuclear leukocyte adhesion to articular cartilage is inhibited by cartilage surface macromolecules. *Rheumatol Int* 2001; 20: 180-5.
- Mohr W. Cartilage destruction via the synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995, 22: 1436-8.
- Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.
- Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003; 198: 1951-7.
- Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 2003; 171: 6173-7.
- Nakamura M, Ferreira SH. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* 1987; 135: 145-53.
- Noback CR, Strominger NL, Dmarest RJ. In: *The human nervous system: structure and function. Pain and temperature*, 5^a ed., Williams & Wilkins, New York, 1996: 123-137.

- Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 2007; 448: 480–83.
- Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000; 13: 715-25.
- Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008; 28: 454-67.
- Palmer G, Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Toy D, Seemayer CA, Viatte S, Finckh A, Smith DE, Gabay C. Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 738-49.
- Parks WC, Mecham RP. In: *Matrix metalloproteinases*. Academic Press, San Diego, 1998.
- Rexed B. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 1954; 100: 297-379.
- Rocha FA, Teixeira MM, Rocha JC, Girao VC, Bezerra MM, Ribeiro A R de, Cunha FQ. Blockade of leukotriene B4 prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. *Eur J Pharmacol* 2004; 497: 81-6.
- Ruddy MJ, Shen F, Smith JB, Sharma A, Gaffen SL. Interleukin-17 regulates expression of the CXC chemokine LIX/CXCL5 in osteoblasts: implications for inflammation and neutrophil recruitment. *J Leukoc Biol* 2004a; 76: 135-44.
- Ruddy MJ, Wong GC, Liu XK, Yamamoto H, Kasayama S, Kirkwood KL, Gaffen SL.

- Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor- α is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. *J Biol Chem* 2004b; 279: 2559-67.
- Sasai M, Saeki Y, Ohshima S, Nishioka K, Mima T, Tanaka T, Katada Y, Yoshizaki K, Suemura M, Kishimoto T. Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1635-43
- Savill J.: Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* 1997; 61: 375-80.
- Schaible HG, Schmidt RF. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. *J Neurophysiol* 1988; 60: 2180-95.
- Schaible HG, Ebersberger A, Von Banchet GS. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 343-54.
- Schneider SP, Perl ER. Synaptic mediation from cutaneous mechanical nociceptors. *J Neurophysiol* 1994; 72: 612-21.
- Schönbeck U, Mach F, Libby P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol* 1998; 161: 3340-6.
- Schweizer A, Feige U, Fontana A, Muller K, Dinarello CA. Interleukin-1 enhances pain reflexes. Mediation through increased prostaglandin E2 levels. *Agents Actions* 1988; 25: 246-51.
- Simon SI, Green CE. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu Rev Biomed Eng* 2005; 7: 151-85.

- Smith MJ, Berg EL, Lawrence MB. A direct comparison of selectin-mediated transient, adhesive events using high temporal resolution. *Biophys J* 1999; 77: 3371-83.
- Sokolovsky M. Endothelin receptor heterogeneity, G-proteins, and signaling via cAMP and cGMP cascades. *Cell Mol Neurobiol* 1995; 15:561-571.
- Tchetverikov I, Runday HK, Van El B, Kiers GH, Verzijl N, Tekoppele JM, Huizinga TW, DeGroot J, Hanemaaijer R. MMP profile in paired serum and synovial fluid samples of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 881–3.
- Ting E, Guerrero AT, Cunha TM, Verri Jr WA, Taylor SM, Woodruff TM, Cunha FQ, Ferreira SH. Role of complement C5a in mechanical inflammatory hypernociception: potential use of C5a receptor antagonists to control inflammatory pain. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 1043-53.
- Thwin MM, Douni E, Arjunan P, Kollias G, Kumar PV, Gopalakrishnakone P. Suppressive effect of secretory phospholipase A2 inhibitory peptide on interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase production in rheumatoid synovial fibroblasts, and its antiarthritic activity in hTNFtg mice. *Arthritis Res Ther* 2009 *in press*.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24: 179–89.
- Verri Jr WA, Schivo IR, Cunha TM, Liew FY, Ferreira SH, Cunha FQ. Interleukin-18 induces mechanical hypernociception in rats via endothelin acting on ETB receptors in a morphine-sensitive manner. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310: 710-7.

- Verri Jr WA, Molina RO, Schivo IR, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. Nociceptive effect of subcutaneously injected interleukin-12 is mediated by endothelin (ET) acting on ETB receptors in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 609-15.
- Verri Jr WA, Cunha TM, Parada CA, Wei XQ, Ferreira SH, Liew FY, Cunha FQ. IL-15 mediates immune inflammatory hypernociception by triggering a sequential release of IFN-gamma, endothelin, and prostaglandin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006a; 103: 9721-5.
- Verri Jr WA, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther* 2006b; 112: 116-38.
- Verri Jr WA, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Liew FY, Ferreira SH, Cunha FQ. Antigen-induced inflammatory mechanical hypernociception in mice is mediated by IL-18. *Brain Behav Immun* 2007; 21: 535-43.
- Verri Jr WA, Guerrero AT, Fukada SY, Valerio DA, Cunha TM, Xu D, Ferreira SH, Liew FY, Cunha FQ. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 2723-8.
- Verri Jr WA, Cunha TM, Magro DA, Guerrero AT, Vieira SM, Carregaro V, Souza GR, Henriques MG, Ferreira SH, Cunha FQ. Targeting endothelin ET(A) and ET (B) receptors inhibits antigen-induced neutrophil migration and mechanical hypernociception in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2009; 379: 271-9.
- Wall PD, Melzack R. In: *Textbook of pain*. 4^a ed.: Churchill Livingstone; 1999: 59-103.
- Watkins LR, Wiertelak EP, Goehler LE, Smith KP, Martin D, Maier SF.

- Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain Res* 1994; 654: 15-26.
- Watson ML, Kingsmore SF, Johnston GI, Siegelman MH, Le Beau MM, Lemons RS, Bora NS, Howard TA, Weissman IL, McEver RP, et al. Genomic organization of the selectin family of leukocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome 1. *J Exp Med* 1990; 172: 263-72.
- Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N England J Med* 1989, 320: 365-376.
- Weissmann G, Korchak H. Rheumatoid Arthritis: the role of neutrophil activation. *Inflammation* 1984, 8: S3-14.
- Witowski J, Ksiazek K, Jorres A. Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 567-79.
- Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 2000; 288: 1765-9.
- Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, Pitman N, Kurowska-Stolarska M, McKenzie AN, McInnes IB, Liew FY. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 10913-8.
- Yang J, Hirata T, Croce K, Merrill-Skoloff G, Tchernychev B, Williams E, Flaumenhaft R, Furie BC, Furie B. Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J Exp Med* 1999; 190: 1769-82.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-415.

- Yang XO, Chang SH, Park H, Nurieva R, Shah B, Acero L, Wang YH, Schluns KS, Broaddus RR, Zhu Z, Dong C. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med* 2008; 205: 1063-75.
- Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, Cohen JI, Spriggs MK. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 1995, 3: 811-21.
- Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 455-61.
- Zeilhofer HU, Zeilhofer UB. Spinal dis-inhibition in inflammatory pain. *Neurosci Lett* 2008; 437: 170-4.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16: 109-10.

8. Anexos

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](#)