



**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Mestrado em Biologia Celular e Molecular**

**ENVOLVIMENTO DAS ENDOTELINAS ENDÓGENAS  
NA ARTRITE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

**Fernando de Paiva Conte**

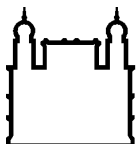
**Rio de Janeiro**

**2007**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

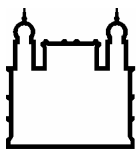
*Fernando de Paiva Conte*

**ENVOLVIMENTO DAS ENDOTELINAS ENDÓGENAS NA ARTRITE  
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

**Orientadoras:** Dra. Maria das Graças Müller de Oliveira Henriques  
Dra. Carmen Penido

**Rio de Janeiro**  
**2007**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**AUTOR:** *Fernando de Paiva Conte*

**ENVOLVIMENTO DAS ENDOTELINAS ENDÓGENAS NA ARTRITE  
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

**ORIENTADORAS:** Dra. Maria das Graças Müller de Oliveira Henriques  
Dra. Carmen Penido

**Aprovada em:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**EXAMINADORES:**

**Dra.** Adriana Ribeiro Silva – **Presidente**

**Dr.** Giles Alexander Rae

**Dr.** Claudio de Azevedo Canetti

Rio de Janeiro, 01 de agosto de 2007

Dedico este trabalho ao meu pai que mesmo ainda muito enfermo sobre um leito no hospital, ao saber que eu tinha sido aprovado no mestrado teve a coragem de, mesmo com as fortes dores causadas pela doença, reunir forças para me sorrir, me abraçar e logo em seguida chorar... coisa que eu como filho nunca havia presenciado...

Walter Conte *in memoriam*.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus familiares, em especial minha mãe, que após tamanha perda no início desta jornada encontrou forças para continuar me apoiando incondicionalmente, dando mais um exemplo de vida e superação, e que pretendo continuar empregando nas coisas que faço.

À minha orientadora Dra Maria das Graças Henriques, pela confiança em me aceitar como aluno de mestrado mesmo sem eu nunca ter trabalhado previamente na área, pela confiança, pelas risadas e, principalmente, pelas elegantes chamadas de atenção, pois admito que me orientar não deve ser a mais fácil das tarefas. Sou muito grato por tudo e dedico meu crescimento acadêmico às minhas duas orientadoras.

À Dra. Carmen Penido pela dedicação integral, na correção de relatórios, apresentações orais, projetos, discussão de resultados e artigos. Hoje ao olhar pra trás, vejo que um grande caminho foi percorrido e que você sem sombra de dúvidas é parte importante desse processo de aprendizagem e crescimento. Aprendi muito com meus erros e deixo aqui registrado meus agradecimentos por tudo o que tem feito por mim, pois mesmo na Europa nestes 3 meses finais de minha dissertação ainda foi capaz de me auxiliar por certas vezes, muito obrigado!

Ao André Candéa, um amigo inseparável que desde o início esteve sempre me apoiando em todos os momentos e em qualquer tipo de situação. Amigo de bancada, congressos, discussão de artigos, preparação de seminários mas também, futebol, basquete, churrasco, chopinho, buteco, etc etc. Além da conclusão deste trabalho fico feliz por ganhar um amigo, na verdade um casal de amigos, pois sua esposa Giselle agora também faz parte do meu círculo de amizades.

Ao Flávio Paixão por toda a sua irreverência, originalidade e por me mostrar que mesmo fazendo ciência as coisas podem ser bastante engraçadas. A alegria em pessoa do laboratório, sempre com suas frases, danças e trejeitos tem sido um grande amigo e contribuiu muito para dividir o peso da responsabilidade de concluir esta caminhada.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Farmacologia Aplicada, nominalmente: Fabíola Brito, Fausto Klabund, Isabela da Hora, Maria Fernanda Silva, Maria do Socorro Chagas, Márcia Vidal, Daniela Pacheco, Fátima Vergara, Carlos Bizarro, Simone Machado, Elaine Rosas, Mariana, Octávio, Patrícia L'amour, Sejane L'amour, Kátia Novelino, Jurema,

Antônio e Seu Betinho. Somos hoje um grupo muito unido e espero, além do sucesso coletivo, a realização pessoal de cada um de vocês! Muito obrigado por tudo, por segurarem minha mão durante os momentos difíceis, principalmente quando o meu pai faleceu, vocês são amigos pra-toda-hora!

Aos amigos feitos no Laboratório de Farmacologia, que por uma razão ou outra não se encontram mais lá, são eles: Ismael Gomes, Karina Costa, Leonardo Alves, Cláudia Stutz, Hellen Padilha, Juliane Silva. Muito obrigado pela ajuda de vocês e parabéns pelo sucesso em suas carreiras, vocês merecem.

À Flavia Werneck por compartilhar absolutamente todos esses momentos ao meu lado, dedico grande parte desta história a você e agradeço muito por me ensinar a ser uma pessoa melhor a cada dia que passa. As coisas que aprendo ao seu lado com certeza se refletem em meu caráter e no meu jeito de agir, por essas e outras você é parte importante neste processo e registro aqui meus eternos agradecimentos.

À Dra Christianne Bandeira de Melo pelas orientações e sugestões dadas, inicialmente durante avaliação no seminário discente, e mais recentemente como revisora da dissertação.

A todos da secretaria de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, especialmente Daniele, Fabíola e Cleide. Vocês além de sempre muito solícitas e simpáticas são exemplos de trabalho e dedicação, nunca me deixaram na mão. Meus sinceros elogios, e parabéns pelo trabalho realizado por vocês!

Ao Departamento de Patologia/IOC por colaborar no processamento do material de histologia

Ao Laboratório de Farmacologia e Bioquímica Celular (UERJ), chefiado pela Dra Thereza Christina Barja-Fidalgo, e em especial à aluna de doutorado Cristiane Pereira que auxiliou diretamente na realização do *western blotting*.

Ao auxílio financeiro recebido do CNPq

## LISTAS DE ABREVIACOES

°C	Graus Celsius
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
AR	Artrite reumatóide
Asn	Asparagina
Asp	cido aspártico
bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblasto
BQ123	ciclo[DTrp-DAsp-Pro-DVal-Leu]
BQ788	<i>N-cis-2,6-dimetilpiperidinocarbonil-L-?-metileucil-D-1-metoxicarboil-D-norleucina</i>
BSA	Albumina sérica bovina
cav	Cavidade
CCL	Ligante de quimiocinas CC
CD	do inglês, <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	DNA complementar
Cis	Cisteína
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxygenase
CXCL	Ligante de quimiocinas CXC
DNA	cido desoxirribonucléico
ECE	Enzima conversora de endotelina
EDTA	cido etileno diamino tetra acético
EGF	Fator de crescimento derivado da epiderme
EGTA	cido etileno glicol tetra acético
ELISA	do inglês, <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EPM	Erro padrão da média
ET	Endotelina
ET <sub>A</sub>	Receptor do subtipo A da endotelina
ET <sub>B</sub>	Receptor do subtipo B da endotelina
Fen	Fenilalanina
fmol	Fentomol
G	Gauss
<i>g</i>	Gravidade
Gln	Glutamina
Glu	cido glutâmico



h	Horas
HBSS	Solução salina tamponada de Hanks
HCl	Ácido clorídrico
His	Histidina
i.a.	Intra-articular
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
Ile	Isoleucina
I-TAC	do ingles, <i>IFN-<math>\gamma</math>-inducible T-cell <math>\alpha</math>-chemoattractant</i>
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodalton
Leu	Leucina
Lis	Lisina
LT	Leucotrieno
MCP-1	Proteína quimioatraente para monócitos -1
Met	Metionina
mg	Miligrama
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
NF $\kappa$ B	Fator nuclear $\kappa$ B
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
NO	Óxido nítrico
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato em solução salina
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PG	Prostaglandina
pH	Potencial hidrogênico
PKC	Proteína quinase C

PMA	Acetato de forbol miristato
pmol	Picomol
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SFB	Soro fetal bovino
TGF- $\beta$	Fator transformador de crescimento $\beta$
Tir	Tirosina
TLR	do inglês, <i>Toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
Tre	Treonina
Trp	Triptofano
Val	Valina
VSMC	Célula muscular lisa vascular
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ m	Micrômetro
$\mu$ M	Micromolar

# ÍNDICE ANALÍTICO

<b>RESUMO</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xvii</b>
<b>1 – Introdução</b>	<b>1</b>
<b>1.1 - Endotelinas</b>	<b>2</b>
1.1.1 - Histórico	2
1.1.2 - Biossíntese das endotelinas	2
1.1.3 - Vias alternativas para síntese de endotelinas	3
1.1.4 - Estrutura protéica das endotelinas	4
1.1.5 - Expressão gênica de endotelinas	5
1.1.6 - Isoformas de endotelina	7
1.1.6.1 - Endotelina-1 (ET-1)	7
1.1.6.2 - Endotelina-2 (ET-2)	8
1.1.6.3 - Endotelina-3 (ET-3)	8
1.1.7 - Sarafotoxinas	8
<b>1.2 - Receptores de endotelina</b>	<b>9</b>
<b>1.3 - Antagonistas dos receptores de endotelina</b>	<b>11</b>
1.3.1.1 - Antagonistas do receptor ET <sub>A</sub>	11
1.3.1.2 - Antagonistas do receptor ET <sub>B</sub>	13
<b>1.4 - Endotelinas na inflamação</b>	<b>14</b>
1.4.5.1 - Artrite Reumatóide	16
1.4.5.2 - Modelos experimentais de inflamação articular	18
<b>2 – Objetivo</b>	<b>20</b>
<b>2.1 – Geral</b>	<b>21</b>
2.1.1 – Específicos	21
<b>3 – Material e Métodos</b>	<b>22</b>
<b>3.1 – Animais</b>	<b>23</b>
<b>3.2 – Tratamentos</b>	<b>23</b>
<b>3.3 – Indução da Artrite por Zimosan</b>	<b>23</b>
<b>3.4 – Agonistas dos receptores de endotelina</b>	<b>24</b>

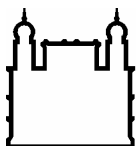
3.5 – Avaliação do edema articular	24
3.6 – Contagem total e diferencial das células recolhidas do lavado articular	24
3.7 – Histologia	25
3.8 – Preparação do extrato da articulação fêmuro-tibial	25
3.9 – Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	26
3.10 – Isolamento da cápsula articular do joelho de camundongos e preparo do extrato celular total para Western Blotting	26
3.11 – Western Blotting	26
3.12 – Análise Estatística	27
<b>4 – Resultados</b>	<b>28</b>
4.1 – Análise do efeito de diferentes doses de ET-1 sobre a formação de edema na articulação fêmuro-tibial de camundongos.	29
4.2 – Análise do efeito de diferentes doses de ET-1 sobre o influxo de leucócitos para a cavidade articular de camundongos.	31
4.3 – Cinética da injeção intra-articular de ET-1 (10 pmol/cavidade) sobre a formação de edema na articulação fêmuro-tibial de camundongos.	33
4.4 – Cinética da migração de leucócitos para o lavado articular de camundongos induzida pela injeção intra-articular de ET-1 (10 pmol/cavidade).	35
4.5 – Efeito dose-resposta da injeção intra-articular de sarafotoxina S6c sobre a formação de edema na articulação fêmuro-tibial de camundongos.	37
4.6 – Efeito da injeção intra-articular de sarafotoxina S6c sobre o acúmulo de leucócitos na cavidade articular de camundongos.	39
4.7 – Influência dos antagonistas seletivos de receptores de endotelina sobre a formação de edema na articulação fêmuro-tibial no modelo murino de artrite induzida por zimosan.	41
4.8 – Influência dos antagonistas seletivos de receptores de endotelina sobre o acúmulo de leucócitos na cavidade articular no modelo murino de artrite induzida por zimosan.	43

<b>4.9 – Análise histológica do efeito dos antagonistas seletivos de receptores de endotelina sobre o influxo de neutrófilos induzido por zimosan para o tecido da articulação fêmuro-tibial.</b>	<b>48</b>
<b>4.10 – Efeito dos antagonistas seletivos de receptores de endotelina sobre a produção de citocinas e quimiocinas em camundongos submetidos ao modelo experimental de artrite induzida por zimosan.</b>	<b>50</b>
<b>4.11 – Análise da expressão dos receptores de endotelina no tecido sinovial após inflamação articular induzida por zimosan.</b>	<b>52</b>
<b>5 – Discussão dos Resultados</b>	<b>54</b>
<b>6 – Conclusão</b>	<b>64</b>
<b>7 – Referências Bibliográficas</b>	<b>66</b>
<b>8 – Anexo</b>	<b>74</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

<i>Figura 1.1</i> – Seqüência de aminoácidos e a estrutura secundária, inclusive as 2 ligações de pontes dissulfeto, das três isoformas da endotelina (ET-1, -2 e -3). _____	5
<i>Figura 1.2</i> – Esquema representativo da biossíntese e dos fatores que modulam a expressão gênica da ET-1 em células endoteliais. _____	6
<i>Figura 1.3</i> – Seqüência de resíduos de aminoácidos da ET-1 e da sarafotoxina S6c. _____	9
<i>Tabela 1.1</i> – Propriedades dos receptores ET <sub>A</sub> , agonistas e antagonistas. _____	12
<i>Tabela 1.2</i> – Propriedades dos receptores ET <sub>B</sub> , agonistas e antagonistas. _____	13
<i>Figura 1.4</i> – Diagrama resumindo os principais efeitos pró-inflamatórios das ETs. _____	15
<i>Figura 1.5</i> – Desenho esquemático da articulação fêmuro-tibial e a ação das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ sobre seus constituintes celulares. _____	17
<i>Figura 4.1</i> – Indução da formação de edema articular em camundongos C57BL/6 submetidos à injeção i.a. com ET-1 (1, 10 e 30 pmol/cavidade; 25 $\mu$ L). _____	30
<i>Figura 4.2</i> – Indução do influxo de leucócitos para o lavado articular de camundongos C57BL/6 após injeção i.a. de ET-1 exógena (1, 10 e 30 pmol/cavidade; 25 $\mu$ L). _____	32
<i>Figura 4.3</i> – Cinética da formação de edema na articulação fêmuro-tibial de camundongos C57BL/6 após injeção i.a. de ET-1 exógena (10 pmol/cavidade; 25 $\mu$ L). _____	34
<i>Figura 4.4</i> – Cinética do acúmulo de leucócitos no lavado articular de camundongos C57BL/6 após injeção i.a. de ET-1 exógena (10 pmol/cavidade; 25 $\mu$ L). _____	36
<i>Figura 4.5</i> – Indução da formação de edema na articulação fêmuro-tibial de camundongos C57BL/6 após estimulação i.a. com S6c (0,1 – 30 pmol/cavidade; 25 $\mu$ L). _____	38
<i>Figura 4.6</i> – Influência do tratamento i.a. com S6c (0,1 – 30 pmol/cavidade; 25 $\mu$ L) sobre o número de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares recolhidos do lavado articular de camundongos C57BL/6 após 6 h estímulo. _____	40

<i>Figura 4.7 – Redução da formação de edema induzida por zimosan em camundongos C57BL/6 após bloqueio farmacológico dos receptores ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> (BQ123 e BQ788, respectivamente).</i>	42
<i>Figura 4.8.1 – Efeito dose-resposta do pré-tratamento com o antagonista seletivo do receptor ET<sub>A</sub> (BQ123) sobre o influxo de leucócitos induzido pela injeção i.a. com zimosan (500 µg/cavidade) em camundongos C57BL/6.</i>	45
<i>Figura 4.8.2 – Efeito dose-resposta do pré-tratamento com o antagonista seletivo do receptor ET<sub>B</sub> (BQ788) sobre o influxo de leucócitos induzido pela injeção i.a. com zimosan (500 µg/cavidade) em camundongos C57BL/6.</i>	46
<i>Figura 4.8.3 – Inibição do influxo de leucócitos para o lavado articular 24 h após o tratamento com antagonistas seletivos de receptores ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub>.</i>	47
<i>Figura 4.9 – Histopatologia representativa do efeito do antagonista seletivo do receptor ET<sub>A</sub> (BQ123) ou ET<sub>B</sub> (BQ788) sobre a inflamação articular induzida por zimosan (500 µg/joelho).</i>	49
<i>Figura 4.10 – Efeito do bloqueio seletivo dos receptores ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> (BQ123 e BQ788, respectivamente; 15 pmol/cavidade; i.a.; 5 min antes do estímulo) sobre os níveis de citocinas e quimiocinas do extrato articular de camundongos C57BL/6 submetidos à artrite induzida por zimosan.</i>	51
<i>Figura 4.11 – Análise da expressão dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> no extrato total do tecido sinovial de camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo experimental de artrite induzida por zimosan.</i>	53
<i>Figura 6.1 – Modelo hipotético do envolvimento das ETs durante a artrite induzida por zimosan.</i>	65



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

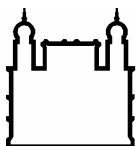
### **ENVOLVIMENTO DAS ENDOTELINAS ENDÓGENAS NA ARTRITE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

#### **RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

As endotelinas (ETs) são peptídeos, sintetizados por diversos tipos celulares, que exercem seus efeitos através da ligação a dois receptores celulares específicos, ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>. Níveis aumentados de ET-1 foram encontrados no plasma e no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide, uma doença autoimune inflamatória crônica caracterizada pelo influxo celular, formação de edema e destruição da articulação. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel das ETs na inflamação articular no modelo de artrite induzida por zimosan. Inicialmente, camundongos C57BL/6 receberam injeção intra-articular (i.a.) de ET-1 (10 pmol/cav) que, nas primeiras 6 h, induziu a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos (sal  $0,25 \pm 0,005 \times$  ET-1  $0,93 \pm 0,007 \times 10^5$  células/cav), a formação de edema (sal  $0,12 \pm 0,04 \times$  ET-1  $0,47 \pm 0,09 \text{ ? mm/joelho}$ ) que atingiu o pico em 6 h e retornou aos níveis basais em 24 h. A sarafotoxina S6c, agonista seletivo do receptor ET<sub>B</sub>, induziu em 6 h o recrutamento celular, predominantemente neutrófilos (sal  $0,13 \pm 0,018 \times$  S6c  $0,661 \pm 0,134 \times 10^5$  células/cav) e a formação de edema (sal  $0,14 \pm 0,04 \times$  S6c  $0,37 \pm 0,05 \text{ ? mm/joelho}$ ). Em seguida, camundongos C57BL/6 foram pré-tratados i.a. com antagonistas de receptor ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> (BQ123 e BQ788, 0,15-150 pmol/cav, respectivamente) 5 min antes da indução da artrite por zimosan. O pré-tratamento com BQ123 ou BQ788 (15 pmol/cav) reduziu, nas 6 primeiras horas, o acúmulo de neutrófilos (64 e 73 % respectivamente), a formação de edema (40 e 61 % respectivamente) e a produção de TNF-a (39 e 51 % respectivamente) induzida por zimosan. Vinte e quatro horas após, ambos pré-tratamentos reduziram o acúmulo de neutrófilos (65 e 61 % respectivamente), a formação de edema (43 e 52 % respectivamente) e a produção de CXCL1 (12 e 11 % respectivamente). Mais ainda, o estímulo i.a. com zimosan reduziu significativamente a intensidade de expressão de ET<sub>B</sub> (6 e 24 h) e ET<sub>A</sub> (24 h). Tomados em conjunto, esses dados apontam para a participação das ETs, atuando através de seus dois receptores, na inflamação articular.





Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **INVOLVEMENT OF ENDOGENOUS ENDOTHELINS ON EXPERIMENTAL ARTHRITIS IN MICE**

#### **ABSTRACT**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Endothelins (ETs) are peptides produced by a wide variety of cells that exert their functions through ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors. Increased ET-1 levels were found in plasma and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis, an autoimmune disease characterized by cell influx, edema formation and joint destruction. The aim of this study was to evaluate the role of ETs in knee joint inflammation induced by zymosan. We evaluated in C57BL/6 mice the effect of intra-articular (i.a.) injection of ET-1 (10 pmol/cav) in C57BL/6 mice induced at 6 h an increase on cellular migration, mainly due to neutrophil accumulation (sal  $0.25 \pm 0.005$  x ET-1  $0.93 \pm 0.007$  x  $10^5$  cells/knee) and on edema formation (sal  $0.12 \pm 0.04$  x ET-1  $0.47 \pm 0.09$  ? mm/knee), that peaked within 6 h and returned to basal levels at 24 h. A selective ET<sub>B</sub> receptor agonist, sarafotoxin S6c (S6c; 30 pmol/cav; i.a.), induced at 6 h a significant increase on cellular recruitment, mainly by neutrophil accumulation (sal  $0.13 \pm 0.018$  x S6c  $0.661 \pm 0.134$  x  $10^5$  cells/knee) and on edema formation (sal  $0.14 \pm 0.04$  x S6c  $0.37 \pm 0.05$  ? mm/knee). Next, we evaluated the effect of i.a. injection of ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptor antagonists (BQ-123 and BQ-788, 0,15-150 pmol/cav, respectively) on zymosan-induced arthritis in C57BL/6 mice. Pre-treatment with BQ-123 and BQ-788 (15 pmol/cav) reduced 6 h zymosan-induced accumulation of neutrophil (64 and 73 % respectively) edema formation (40 and 61 % respectively) and TNF- $\alpha$  levels (39 and 51 % respectively); as well as 24 h zymosan induced neutrophil influx (65 and 61 % respectively), edema formation (43 and 52 % respectively) and CXCL1 levels (12 and 11 % respectively). Moreover, 6 and 24 h after zymosan stimulation we observed a significant decrease on ET<sub>B</sub> receptor expression when compared to control group, whereas ET<sub>A</sub> receptor expression was reduced only within 24 h after stimulation. Taken together, this results point to a participation of ETs on knee joint inflammation.



## ***1.1 - Endotelinas***

### *1.1.1 - Histórico*

A descoberta da endotelina aconteceu de forma inesperada, isto porque durante a década de oitenta, diversas equipes de pesquisadores tentavam caracterizar aquilo que eles mesmos chamavam de “fator relaxante derivado do endotélio” (do inglês, *endothelium-derived relaxing factor*). Inesperadamente, durante estes esforços para caracterizar este fator (atualmente conhecido como óxido nítrico), Hickey *et al.* (1985) publicaram um artigo no qual descreviam a descoberta e o isolamento de um fator contrátil sensível à tripsina, derivado de células endoteliais bovinas em cultura, ao qual deram o nome de “fator contrátil derivado do endotélio”. Alguns anos depois, em 1988, Yanagisawa *et al.* isolaram, purificaram e determinaram a estrutura do peptídeo, a partir do meio de cultura de células endoteliais da aorta de suínos, e a ele deram o nome de endotelina (ET).

A ET-1 foi inicialmente descrita como um potente peptídeo vasoconstritor composto por 21 resíduos de aminoácidos que apresenta um potente e duradouro efeito contrátil tanto sobre leitos vasculares isolados quanto sobre a pressão arterial sistêmica após infusão em ratos (Yanagisawa *et al.*, 1988). Estudos envolvendo o cDNA correspondente à proteína foram conduzidos e o resultado do seqüenciamento revelou que o peptídeo biologicamente ativo é sintetizado na forma de uma pré-pró-proteína precursora (com aproximadamente 200 resíduos de aminoácidos) e que então deve necessariamente sofrer processamento bioquímico pós traducional. Após esta descoberta, Inoue *et al.* (1989) ao analisarem o código genético da ET-1 revelaram a existência de dois outros genes distintos que codificavam isoformas de ET. As seqüências de resíduos de aminoácidos destes peptídeos são bastante similares à primeira ET identificada, havendo apenas discretas alterações na seqüência primária de aminoácidos, encontradas basicamente na região da alça (*loop*) do peptídeo na sua forma biologicamente ativa. Dessa forma, os peptídeos que compõem a família das endotelinas são estruturalmente relacionados e todas as isoformas apresentam 21 resíduos de aminoácidos.

### *1.1.2 - Biossíntese das endotelinas*

Os membros desta família incluem três isopeptídeos estruturalmente similares (denominados ET-1, -2 e -3) e diversas toxinas encontradas no veneno de cobra, as chamadas sarafotoxinas (revisto por Motte *et al.*, 2006).

A ET-1 humana, o peptídeo biologicamente ativo, é na maioria das vezes produzido intracelularmente através de um processo catalítico de 2 etapas que se inicia com o processamento de um grande precursor peptídico de 212 aminoácidos, a pré-pró-ET-1. Após a

remoção do peptídeo-sinal, o precursor é seletivamente processado por uma enzima (uma endopeptidase neutra semelhante à furina) gerando um precursor de 38 aminoácidos, a big ET-1 (ou pró-ET-1). A big ET-1 é posteriormente convertida em ET-1, através da clivagem por enzimas conversoras de endotelina (ECEs). Até o momento já foram descritas 4 isoformas de ECE-1, e estas enzimas estão presentes em diferentes compartimentos subcelulares incluindo vesículas secretórias intracelulares (ECE-1a), vesículas associadas à rede trans-Golgi (ECE-1b) ou presentes na superfície celular atuando como ectoenzimas (revisto por Masaki, 2004). Esta conversão é fisiologicamente importante, pois a ET-1 é um vasoconstritor muito mais potente (cerca de 140 vezes) do que a big ET-1 (revisto por Motte *et al.*, 2006).

As ET-2 e -3 também são processadas a partir dos seus próprios precursores, no entanto, os detalhes dos mecanismos de processamento ainda precisam ser determinados (revisto por Motte *et al.*, 2006).

### 1.1.3 - Vias alternativas para síntese de endotelinas

As isoformas das ECEs não são as únicas enzimas responsáveis pela síntese de ET-1. A enzima quimase em humanos (*human chymase*), uma serino protease semelhante à quimiotripsina, é capaz de clivar a big ET-1 e gerar um novo peptídeo com 31 aminoácidos, a ET-1<sub>1-31</sub> (Nakano *et al.*, 1997). Já foi demonstrado experimentalmente que a ET-1<sub>1-31</sub> em concentrações fisiológicas não é capaz de se ligar aos receptores de endotelina, ao invés disso, ela precisa sofrer uma nova conversão enzimática para gerar ET-1 e então causar vasoconstrição. O bloqueio farmacológico das ECEs, que impede a conversão de big ET-1 a ET-1, não surtiu nenhum efeito sobre a vasoconstrição mediada pela ET-1<sub>1-31</sub>. Logo, concluiu-se que a vasoconstrição observada ocorreu devido à existência de uma via alternativa para a síntese de endotelinas. Assim sendo, a big ET-1 pode ser convertida diretamente a ET-1 pelas ECEs ou a ET-1<sub>1-31</sub> pela quimase, esta última forma pode ainda ser subsequente convertida a ET-1 por enzimas ainda não caracterizadas (que podem incluir endopeptidases neutras) (revisto por Davenport & Maguire, 2006).

Até o momento não existem inibidores específicos de quimase que comprovem definitivamente que a enzima sensível à quimostatina seja a quimase e não uma outra serino protease, como por exemplo a catepsina G. Sabe-se apenas que os mastócitos são as principais fontes desta enzima e a conversão extracelular de big ET-1 a ET-1 pela quimase liberada de mastócitos já foi demonstrada em pulmão perfundido de rato (*perfused rat lung*) e utilizando quimase humana *in vitro*. Além disso, os mastócitos são encontrados sempre em grande proximidade aos vasos sanguíneos e são particularmente responsivos à big ET-1 (revisto por Hültner & Ehrenreich, 2005). Caso a hipótese da quimase como enzima alternativa na

produção de ET-1 se confirme, esta pode ser uma nova estratégia terapêutica para o tratamento de doenças nas quais níveis elevados de ET são encontrados.

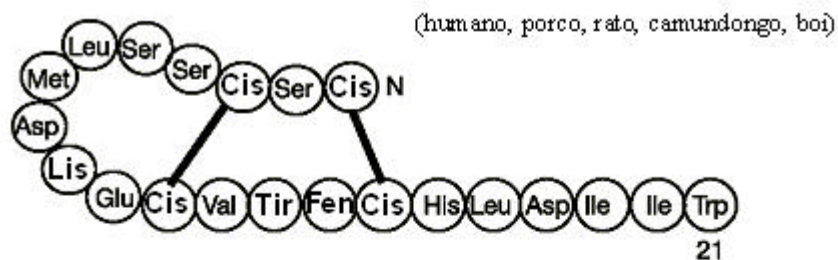
#### *1.1.4 - Estrutura protéica das endotelinas*

A estrutura da ET é única entre os peptídeos bioativos encontrados em mamíferos. Isso se deve às 2 ligações pontes dissulfeto intramoleculares entre os resíduos de cisteína situados na posição 1-15 e 3-11. Sabe-se que os resíduos da ET-1 pertencentes às posições 10, 17, 18 e 21 são cruciais para a sua ligação aos seus receptores (revisado por Davenport & Maguire, 2006).

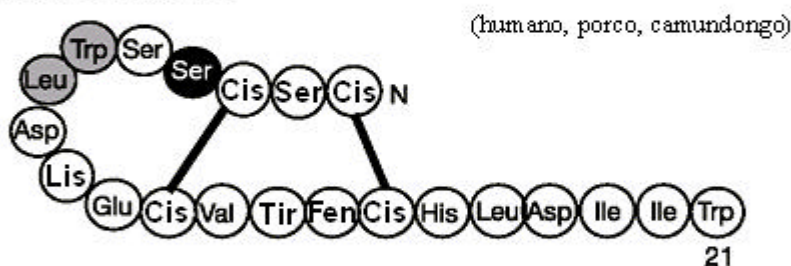
A seqüência de resíduos de aminoácidos e a estrutura secundária, inclusive as 2 ligações de pontes dissulfeto, das três isoformas da endotelina estão demonstradas na **Figura 1.1** A ET-1 humana e a suína apresentam seqüências idênticas de aminoácidos. Em contrapartida, a ET-2 humana e a murina diferem em suas seqüências por apenas 1 aminoácido e possuem ainda uma diferença de 2 e 3 aminoácidos (respectivamente) quando comparados à ET-1 humana. A ET-3 humana e de rato apresentam seqüências idênticas entre si, mas diferem da ET-1 humana em 6 aminoácidos (revisado por Masaki, 2004).

Como era de se esperar, as seqüências de aminoácidos das 3 isoformas do precursor biológico imediato à endotelina, (pró-endotelina ou big ET), também variam entre as espécies. A diferença mais interessante entre as seqüências das isoformas de big ET está relacionada ao sítio de clivagem e processamento, em que a big ET-3 possui um sítio dipeptídico de processamento Trp<sup>21</sup>-Ile<sup>22</sup> *versus* Trp<sup>21</sup>-Val<sup>22</sup> encontrado nas outras isoformas (revisado por Rubanyi & Botelho, 1991).

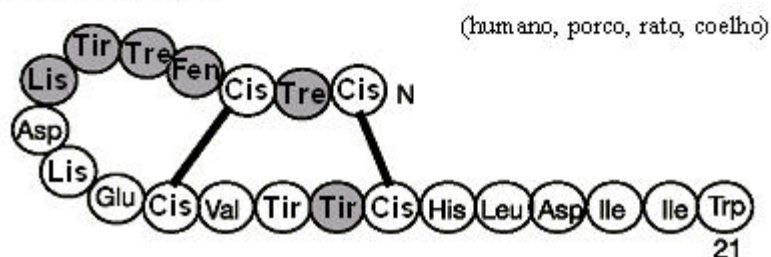
## Endotelina-1



## Endotelina-2



## Endotelina-3

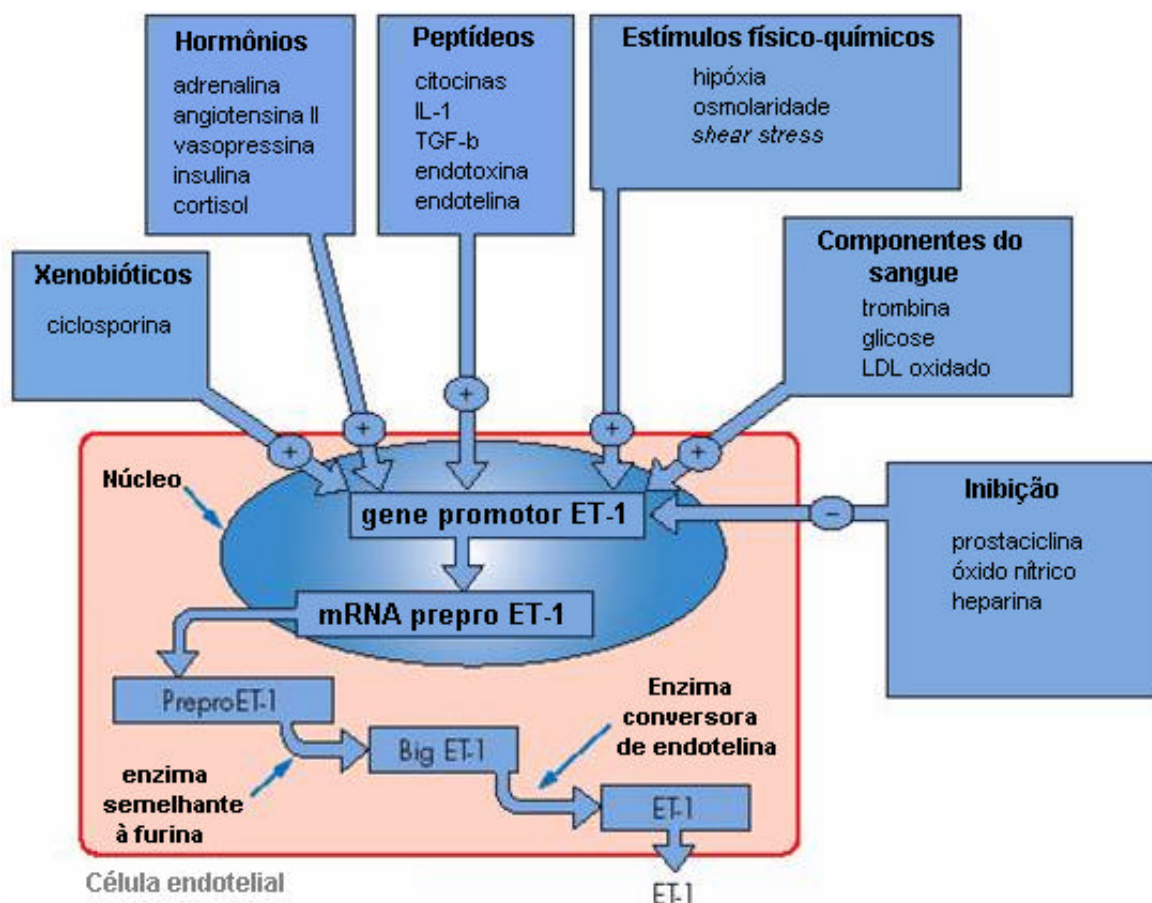


**Figura 1.1** – Sequência de aminoácidos e a estrutura secundária, inclusive as 2 ligações de pontes dissulfeto, das três isoformas da endotelina (ET-1, -2 e -3). As ligações de pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína, nas posições 1-15 e 3-11, estão representadas (—). A ET-1 humana possui homologia estrutural entre diferentes espécies (camundongo, rato, porco e boi). Quando comparados à ET-1 humana, as outras isoformas apresentam diferenças nos resíduos de aminoácido que as compõem (representados em cinza). No caso específico da ET-2, o peptídeo em camundongos difere de um resíduo de aminoácido quando comparado à isoforma humana (possui uma substituição da Ser4 por Asn4, representado em preto na figura). Adaptado de Masaki (2004).

### 1.1.5 - Expressão gênica de endotelinas

Uma vez que as células endoteliais não são capazes de armazenar endotelinas, a biossíntese destes peptídeos sofre regulação transcricional, por diversos fatores. A expressão e a liberação de ET-1 está associada à proteína quinase C (PKC) dependente de cálcio e é estimulada por uma série de fatores fisiológicos, físicos e químicos (**Figura 1.2**), incluindo: hipóxia, exposição ao frio, diminuição do fluxo sanguíneo (baixo estresse/força de

cisalhamento), trombina, angiotensina II, catecolaminas, cardiotropina-1, radicais livres, insulina, endotoxina, ésteres de forbol, ionóforos de cálcio, fatores de crescimento (TGF- $\beta$ , PDGF, EGF) e citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) (revisto por Mayes, 2003; Wanecek *et al.*, 2000; Motte *et al.*, 2006). Dentre os fatores que reduzem a expressão gênica das endotelinas, destacam-se: óxido nítrico, prostaciclina, prostaglandinas, heparina, peptídeos natriuréticos, aumento do fluxo sanguíneo entre outros (revisto por Mayes, 2003; Wanecek, 2000; Motte *et al.*, 2006).



**Figura 1.2** – Esquema representativo da biossíntese e dos fatores que modulam a expressão gênica da ET-1 em células endoteliais. IL, interleucina; TGF- $\beta$ , fator transformador de crescimento  $\beta$ ; LDL, lipoproteína de baixa densidade. Adaptado de Attina *et al.* (2005).

A presença destes peptídeos já foi demonstrada em diversos sistemas, incluindo: respiratório, cardiovascular, gastrointestinal, endócrino, urogenital e sistema nervoso central; bem como nos rins (revisto por Rubanyi *et al.*, 1994). Alguns estudos apontam para a função e a expressão tecidual específica entre as diferentes isoformas, sendo a ET-1 o peptídeo majoritariamente produzido pelo endotélio vascular enquanto que a ET-2 seria encontrada

principalmente no intestino, enquanto a ET-3 seria encontrada principalmente no pulmão, no sistema nervoso central e no intestino (revisto por Wanecek *et al.*, 2000).

### 1.1.6 - Isoformas de endotelina

#### 1.1.6.1 - Endotelina-1 (ET-1)

A ET-1 é a isoforma predominante e de maior significância encontrada no plasma e nos tecidos em seres humanos, com importante ação sobre o sistema cardiovascular, sendo inclusive considerada como um dos mais potentes peptídeos vasoconstritores já descoberto. A liberação da ET-1 pode se dar de duas maneiras distintas: constitutivamente, quando a liberação do peptídeo ocorre continuamente a partir de células endoteliais vasculares (levando à constrição intensa da musculatura lisa subjacente mantendo assim o tônus vascular) ou de forma induzida, na qual o peptídeo é liberado de grânulos específicos das células endoteliais (corpúsculos de Weibel-Palade) em resposta a estímulos externos, levando a uma vasoconstrição ainda maior (revisto por Davenport & Maguire, 2006).

Em humanos, a ET-1 geralmente apresenta uma baixa concentração plasmática (1 fmol/mL) e uma meia-vida plasmática entre 1 a 2 minutos. A remoção da ET-1 da circulação é bastante rápida e a circulação pulmonar é em grande parte a maior responsável por esse fenômeno. Após uma única passagem pelo pulmão, aproximadamente 50 % da ET-1 é retirada da circulação, um processo mediado pelo receptor B da endotelina (revisto por Motte *et al.*, 2006). Os rins e o fígado também parecem participar deste processo, mas em menor escala. Dessa forma, sob condições normais, a ET-1 não atua como um hormônio endócrino circulante, mas como um hormônio local com ações parácrinas e/ou autócrinas se ligando aos seus receptores presentes na membrana plasmática das células-alvo (revisto por Wanecek *et al.*, 2000).

A principal fonte *in vivo* de ET-1 são as células endoteliais, no entanto, a síntese de ET-1 não está limitada somente ao endotélio. Hoje em dia já se sabe que diversos tipos celulares são capazes de produzir ET-1, incluindo: macrófagos, mastócitos, células de Kupffer (revisto por Wanecek *et al.*, 2000), leucócitos polimorfonucleares, fibroblastos (revisto por Mayes, 2003), sinoviócitos humanos (Yoshida *et al.*, 1998) e condrócitos articulares (Khatib *et al.*, 1997).



#### 1.1.6.2 - Endotelina-2 (ET-2)

Embora a ET-2 seja um vasoconstritor tão potente quanto a ET-1, este peptídeo tem sido muito pouco estudado. A alteração em 2 aminoácidos na estrutura deste peptídeo, em comparação à ET-1, tem pouca ou nenhuma influência sobre a afinidade de ligação aos seus receptores. De modo interessante, tanto o RNAm quanto a própria ET-2 já foram detectados no sistema cardiovascular humano. Além disso, o precursor da ET-2 (big ET-2) e o RNA mensageiro para ET-2 já foram detectados no citoplasma de células endoteliais, o que sugere que a ET-2 também pode ser liberada localmente pelas células endoteliais e contribuir para a manutenção do tônus vascular. Apoiando esta hipótese, níveis plasmáticos de big ET-2 são maiores do que big ET-1 em indivíduos saudáveis. Em humanos sadios, os níveis plasmáticos de ET-2 estão próximos a 1 pmol/L (revisto por Davenport & Maguire, 2006). Até o momento não se sabe precisamente qual o papel fisiológico ou patofisiológico desta isoforma em seres humanos.

#### 1.1.6.3 - Endotelina-3 (ET-3)

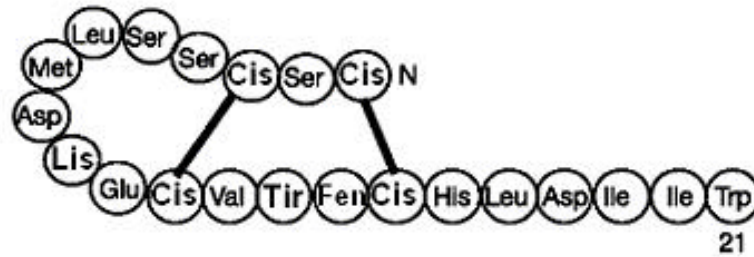
É sabido que células endoteliais não sintetizam ET-3, mas em contrapartida o peptídeo maduro e a big ET-3 são encontrados no plasma e em outros tecidos, incluindo: coração, cérebro (revisto por Davenport & Maguire, 2006), pulmão e intestino (revisto por Wanecek *et al.*, 2000). A síntese deste peptídeo já foi demonstrada em células neuronais, células epiteliais tubulares dos rins e células epiteliais intestinais (revisto por Kedzierski & Yanagisawa, 2001)

A ET-3 é a única isoforma endógena capaz de se ligar com afinidade distinta aos dois receptores de endotelina. A ET-3 possui a mesma afinidade de ligação pelo receptor ET<sub>B</sub> do que a ET-1, mas possui baixa afinidade de ligação pelo receptor ET<sub>A</sub> (revisto por Davenport & Maguire, 2006).

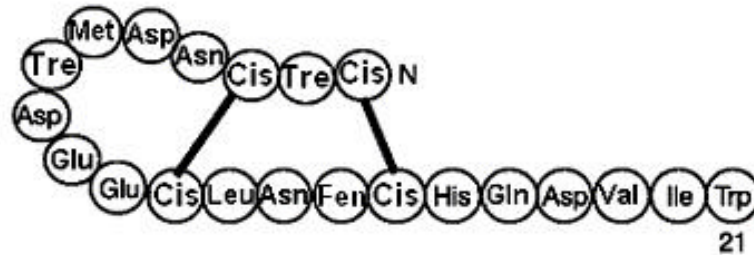
#### 1.1.7 - Sarafotoxinas

Os únicos peptídeos com alto grau de similaridade em sua seqüência às endotelinas são as sarafotoxinas (**Figura 1.3**), uma família de 4 peptídeos compostos por 21 aminoácidos cada (S6a, S6b, S6c e S6d) e que foi descoberta a partir do veneno da cobra *Atractaspis engaddensis*. Em humanos, os sintomas do envenenamento incluem um rápido aumento na pressão arterial devido a vasoconstrição sistêmica, com alterações no ecocardiograma consistente com a vasoconstrição coronária ou ações ionotrópicas diretas sobre o coração. A qarafotoxina S6c é utilizada como um agonista seletivo do receptor ET<sub>B</sub> (revisto por Davenport & Maguire, 2006).

## Endotelina-1



## Sarafotoxina S6c



**Figura 1.3** – Seqüência de resíduos de aminoácidos da ET-1 e da sarafotoxina S6c. As ligações de pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína estão representadas na figura. Adaptado de Johnstrom *et al.* (2002).

### 1.2 - Receptores de endotelina

As endotelinas exercem seus efeitos através da ligação a dois receptores de superfície presentes na membrana plasmática, isolados e clonados a partir de tecidos de mamíferos, denominados ET<sub>A</sub> (Arai *et al.*, 1990) e ET<sub>B</sub> (Sakurai *et al.*, 1990). Ambos pertencem à classe 1 (família A ou semelhante à rodopsina), a mais numerosa da família de receptores que apresentam sete domínios transmembranares acoplados a proteínas G, possuem entre 45 a 50 kDa e são codificados por genes distintos localizados nos cromossomos 4 e 13, respectivamente. Além disso, ambos receptores compartilham 60 % da identidade de aminoácidos entre si e cada tipo é altamente conservado entre diferentes espécies de mamíferos (85-90 %) (revisto por Motte *et al.*, 2006).

Cada receptor consiste de um longo domínio amino-terminal extracelular, e após os sete domínios transmembranares, apresenta uma extremidade carboxi-terminal intracelular. A cauda C-terminal e a terceira alça citoplasmática apresentam diversos resíduos possíveis de sofrer fosforilação (revisto por Motte *et al.*, 2006). Existem ainda, dois sub-domínios distintos de interações com ligantes em cada receptor de endotelina. As alças extracelulares, particularmente entre os domínios transmembranares 4 a 6, é que determinam a seletividade de interação aos ligantes (revisto por Davenport & Maguire, 2006). Enquanto o receptor ET<sub>B</sub> possui igual afinidade de ligação pelas três isoformas de endotelina, o receptor ET<sub>A</sub> é mais

seletivo para ET-1 e ET-2. Em humanos, já foi descrito que a afinidade de ligação é 1000 vezes maior do receptor ET<sub>A</sub> para ET-1 do que para ET-3 (revisto por Mayes, 2003).

A regulação da síntese de receptores de endotelina (ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>) é semelhante à regulação da própria endotelina. Dentre os fatores que induzem a expressão dos receptores ET<sub>A</sub> em alguns tecidos podemos citar: a hipóxia, AMPc, EGF e bFGF. Outros fatores como endotelinas, PDGF e TGF- $\beta$  são responsáveis pela redução da expressão deste tipo de receptor. Em contrapartida, os fatores que levam ao aumento da expressão do receptor ET<sub>B</sub> destacam-se o ATH e o bFGF, enquanto as catecolaminas e o AMPc são responsáveis pela redução da expressão destes receptores (revisto por Rubanyi *et al.*, 1994).

As membranas celulares podem conter um ou ambos os subtipos de receptores, com padrões específicos de expressão em tecidos e entre espécies. Até o momento, os receptores de endotelina já foram encontrados em diversos tecidos, incluindo: pulmões, coração, rins, intestino, glândula adrenal, olhos e cérebro. A densidade dos sítios de ligação é particularmente alta nos pulmões e no coração (revisto por Motte *et al.*, 2006).

Tem sido descrito que os dois receptores de endotelina podem produzir efeitos distintos ou até mesmo antagônicos. Por exemplo, em vasos sanguíneos sistêmicos e pulmonares os receptores ET<sub>A</sub> são principalmente encontrados sobre células musculares lisas vasculares (VSMC; *vascular smooth muscle cells*) enquanto os receptores ET<sub>B</sub> estão expressos tanto em VSMC quanto em células endoteliais. Ambos receptores de endotelina expressos sobre as VSMC medeiam vasoconstrição e proliferação celular. Em contrapartida, os receptores ET<sub>B</sub> expressos em células endoteliais são responsáveis pela ativação da liberação de fatores vasodilatadores e anti-proliferativos derivados do endotélio (prostaciclina ou óxido nítrico) (revisto por Motte *et al.*, 2006). Dessa forma, o perfil de expressão dos receptores de endotelina pode ser distinto entre diferentes tipos celulares assim como o efeito resultante desencadeado após ligação ao receptor. De modo geral, em indivíduos saudáveis, as ações das endotelinas resultam de um balanço entre os efeitos mediados pelos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> que levam a uma complexa modulação do tônus vascular, diferenciação tecidual e proliferação celular.

No entanto, o receptor ET<sub>B</sub> apresenta diversas propriedades singulares, as quais não são compartilhadas com os receptores ET<sub>A</sub> ou outros membros pertencentes à família dos receptores associados à proteína G. Por exemplo, os receptores ET<sub>B</sub> se ligam à ET-1, seu ligante, de forma quase irreversível (Waggoner *et al.*, 1992), e o complexo ligante-receptor é tão estável que resiste à lavagens com ácidos e SDS 2 % (Akiyama *et al.*, 1992). Em células vivas, o complexo internalizado receptor ET<sub>B</sub>-ET-1 permanece estável por mais de 2 horas e,

de forma interessante, já foi demonstrado que o complexo ligante-receptor é transportado para vesículas tardias de transporte endossomal/lisossomal dentro de apenas 30 minutos. A forte ligação da ET-1 ao receptor ET<sub>B</sub> parece permanecer conservada durante a evolução, uma vez que esse fenômeno já foi observado em outras espécies como cachorro, camundongo, bezerro e cobaia (Takasuka *et al.*, 1994). Também já foi demonstrado que o receptor ET<sub>B</sub> está envolvido na regulação dos níveis plasmáticos circulantes de ET-1, isto porque o bloqueio deste receptor induz o aumento significativo nos níveis plasmáticos de ET-1. Dessa forma, a forte ligação à ET-1 e o conseqüente transporte do complexo receptor-ligante às vesículas lisossomais pode constituir a base molecular para a remoção eficiente da ET-1 da circulação.

Um terceiro receptor de endotelina, denominado ET<sub>C</sub>, já foi clonado e caracterizado apenas em répteis e anfíbios (Karne *et al.*, 1993), mas não em humanos, e é específica para ET-3.

### ***1.3 - Antagonistas dos receptores de endotelina***

Evidências experimentais sugerem que, em estados patológicos, a expressão dos receptores e da própria endotelina encontram-se diferencialmente regulados sugerindo um envolvimento destas proteínas na patologia de diversas doenças. Assim, os antagonistas dos receptores de endotelina surgiram como ferramentas para elucidação do papel destes peptídeos, bem como a participação específica de cada receptor, durante processos fisiológicos e fisiopatológicos.

Os antagonistas de receptores de endotelina são classificados de acordo com a seletividade ao subtipo de receptor de endotelina ao qual se ligam, desse modo são classificados como: antagonista seletivo para o receptor ET<sub>A</sub>, seletivo para o receptor ET<sub>B</sub> ou antagonista dual (ET<sub>A/B</sub>), que possui afinidade de ligação similar aos dois subtipos de receptores.

#### ***1.3.1.1 - Antagonistas do receptor ET<sub>A</sub>***

Dentre os antagonistas do receptor ET<sub>A</sub> da endotelina, o antagonista peptídico mais seletivo (4 a 5 ordens de magnitude de potência) é o pentapeptídeo cíclico BQ123 (Ihara *et al.*, 1992). Além disso, o análogo do tetrapeptídeo linear FR139317 se liga com afinidade sub-nanomolar ao receptor ET<sub>A</sub> e possui uma seletividade aproximada de 10.000 vezes para esse subtipo em tecidos humanos e animais (revisto por Davenport & Maguire, 2006). No entanto, devido à sua estrutura protéica, seu potencial uso na clínica se torna bastante limitado, por

estarem sujeitos à hidrólise e subsequente inativação por peptidases encontradas tanto na circulação sistêmica quanto no trato gastrointestinal.

De importância clínica, um grande número de antagonistas do receptor ET<sub>A</sub> não-peptídicos vem sendo desenvolvidos e alguns já se encontram em fase de estudo clínico em seres humanos, apresentando boa biodisponibilidade oral enquanto alguns são capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica (revisto por Motte *et al.*, 2006). De maneira geral, a maioria dos antagonistas não-peptídicos são mais potentes, com valores de pA<sub>2</sub> maiores que 10 em comparação ao pA<sub>2</sub> 7 do peptídeo BQ123, no entanto são menos seletivos para o receptor ET<sub>A</sub> *versus* ET<sub>B</sub> (**Tabela 1.1**). Até o momento, nenhum agonista seletivo do receptor ET<sub>A</sub> com potência comparável à ET-1 foi descoberto.

Receptor	ET <sub>A</sub>
Informação estrutural	7TM Humano, 427 aa Rato, 426 aa Camundongo, 427 aa
Agonistas seletivos	nenhum
Potência dos agonistas	ET-1 = ET-2 > S6b >> ET-3
Potência dos antagonistas	BQ123 (6,9-7,4) FR139317 (7,3-7,9) PD156707 (8-8,7) [Cl1020] SB234551 (9) L754142 (7,7-8,7) BMS182874 (6,2) A127722 (9-10,5) [Atrasentan] TBC11251 (8) [Sitaxsentan] LU127043 (7,3) LU135252 [Darusentan]

**Tabela 1.1** – Propriedades dos receptores ET<sub>A</sub>, agonistas e antagonistas. Os antagonistas em fase clínica de desenvolvimento estão com seus nomes comerciais escritos entre colchetes. Os valores conhecidos da potência dos antagonistas (pA<sub>2</sub>) estão representados na tabela pelos valores entre parênteses. Adaptado de Davenport & Maguire (2006).

### 1.3.1.2 - Antagonistas do receptor ET<sub>B</sub>

O desenvolvimento de ferramentas farmacológicas para o estudo do papel específico do receptor ET<sub>B</sub> tem recebido menor atenção dos pesquisadores durante essa última década. Em comparação à quantidade de antagonistas de receptor ET<sub>A</sub> disponíveis, existe apenas um número reduzido de antagonistas peptídicos, como o BQ788 (Ishikawa *et al.*, 1994), e não-peptídicos do receptor ET<sub>B</sub>. Além disso, os antagonistas do receptor ET<sub>B</sub> apresentam menor potência e menor seletividade (1 a 2 ordens de magnitude) de ligação para o receptor ET<sub>B</sub> em comparação à alta potência e seletividade dos antagonistas do receptor ET<sub>A</sub> (**Tabela 1.2**). Assim, pouca importância clínica tem sido associada a este receptor (revisto por Motte *et al.*, 2006).

Os receptores ET<sub>B</sub> possuem o agonista seletivo, a sarafotoxina S6c, que é amplamente utilizado e possui uma seletividade de mais de 200.000 vezes em tecidos de rato, mas é muito menos seletivo em tecidos humanos, refletindo as diferenças dos receptores entre as espécies (revisto por Davenport & Maguire, 2006).

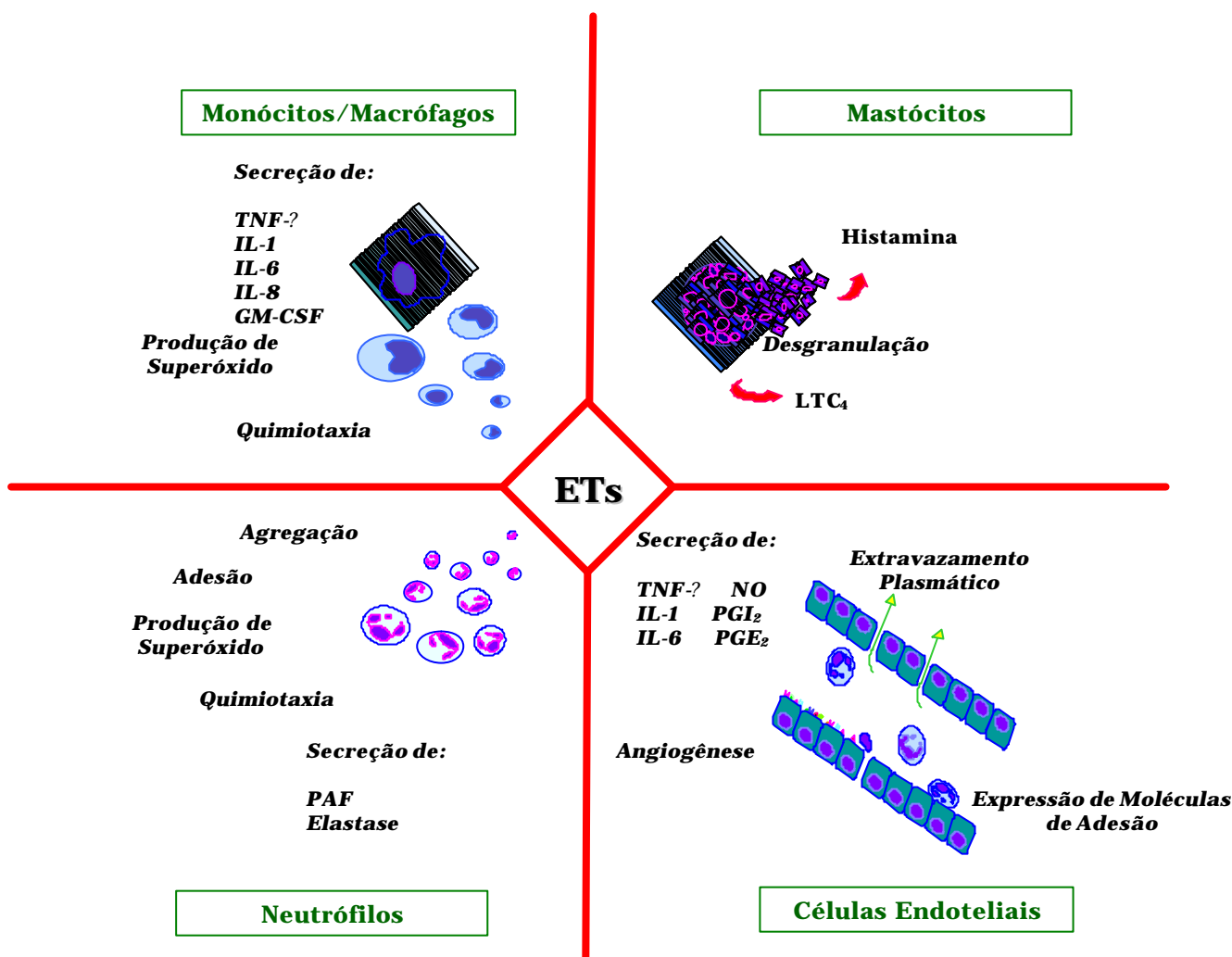
Receptor	ET <sub>B</sub>
Informação estrutural	7TM Humano, 442 aa Rato, 441 aa Camundongo, 442 aa
Agonistas seletivos	[Ala <sup>1,3,11,15</sup> ]ET-1 BQ3020 IRL1620 S6c
Potência dos agonistas	ET-1 = ET-2 = ET-3 = S6b
Potência dos antagonistas	IRL2500 (7,8) RES7011 (6) BQ788 (6,9) Ro468443 (8,1) A192621 (8,1)

**Tabela 1.2** – Propriedades dos receptores ET<sub>B</sub>, agonistas e antagonistas. A potência dos antagonistas (pA<sub>2</sub>) está representada na tabela pelos valores entre parênteses. Adaptado de Davenport & Maguire (2006).

#### ***1.4 - Endotelinas na inflamação***

A maioria dos estudos sobre a função e expressão das ETs têm sido associados à capacidade inerente destes peptídeos em promover vasoconstrição e regulação do tônus vascular mediados através dos seus receptores celulares de superfície presentes nas células vasculares do músculo liso. No entanto, da sua descoberta até os dias de hoje, estudos demonstraram que as ETs podem ser produzidas por uma grande quantidade de tecidos e tipos celulares tanto sob condições fisiológicas quanto fisiopatológicas. Níveis aumentados de ET-1 já foram descritos em diversas condições patológicas e, somado às suas propriedades vasoconstritoras, a ET-1 pode contribuir para a exacerbação do processo inflamatório por modular a expressão de moléculas de adesão de células endoteliais, promover o recrutamento de outros tipos celulares (quimiotaxia), além de modular a imunidade celular (revisto por Kedzierski & Yanagisawa, 2001).

Dentre as patologias associadas ao aumento dos níveis de expressão de endotelinas, destacam-se: asma brônquica, hipertensão arterial pulmonar, falência renal, aterosclerose e sepse. É sabido que as endotelinas desempenham um importante papel como mediadores pró-inflamatórios (**Figura 1.4**) capazes de regular diferentes funções leucocitárias. Associado a isto, altos níveis de produção destes peptídeos podem estar diretamente associados ao agravamento do quadro clínico de doenças inflamatórias. Tem sido descrito que a ET-1 induz o aumento da ativação (Halim *et al.*, 1995; Toffoli *et al.*, 2007) e adesão de neutrófilos ao endotélio (Zouki *et al.*, 1999) além de atuar como estímulo quimiotático para monócitos e macrófagos. Nestes últimos, a ET-1 induz a liberação do ânion superóxido e a produção de diversos mediadores inflamatórios, como: TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8, MCP-1 e PGE<sub>2</sub> (revisto por Rae & Henriques, 1998). Aliado aos efeitos pró-inflamatórios sobre leucócitos, a ET-1 também atua induzindo a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, células sinoviais semelhantes a fibroblastos (Schwartzing *et al.*, 1996) e neutrófilos (Fernandez-Patron *et al.*, 2001), e ainda parece estar associada à indução de extravasamento protéico (Filep *et al.*, 1993).



**Figura 1.4** – Diagrama resumindo os principais efeitos pró-inflamatórios das ETs. Adaptado de Rae & Henriques (1998).

Além das doenças inflamatórias, a associação entre o aumento da expressão de ET e a patogênese de doenças reumáticas também já foi observada e está intimamente associada ao papel mitogênico, fibrótico e pró-inflamatório exercido pelas endotelinas (revisto por Mayes, 2003). Já foi descrito que as endotelinas estão envolvidas na proliferação celular de fibroblastos, células do músculo liso e miócitos e exercem também sua atividade mitogênica através da potenciação dos efeitos de fatores de crescimento (revisto por Mayes, 2003). Ademais, as endotelinas estão intimamente associadas à atividade pró-fibrótica (Xu *et al.*, 1998), uma vez que são capazes de induzir a produção e a liberação de fibronectina por células epiteliais, estimular a quimiotaxia de fibroblastos assim como induzir o aumento na produção de colágeno por este tipo celular. Aliado a isso, as ETs têm estreita relação com diversas doenças reumáticas por estar associada a dor e a hiperalgesia, tanto em animais quanto em seres humanos. Estudos envolvendo voluntários humanos relataram que a injeção



intra-dérmica de ET-1 induziu dor (ardência) e alodinia (Ferreira *et al.*, 1989). Em roedores, este peptídeo foi capaz de induzir contorções abdominais (via receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>) quando administrado intra-peritonealmente, enquanto que a injeção na pata traseira de camundongos induziu à nocicepção bem como a hiperalgesia a estímulos químicos e térmicos (Raffa *et al.*, 1996; Piovezan *et al.*, 2000; Menendez *et al.*, 2003, Baamonde *et al.*, 2004).

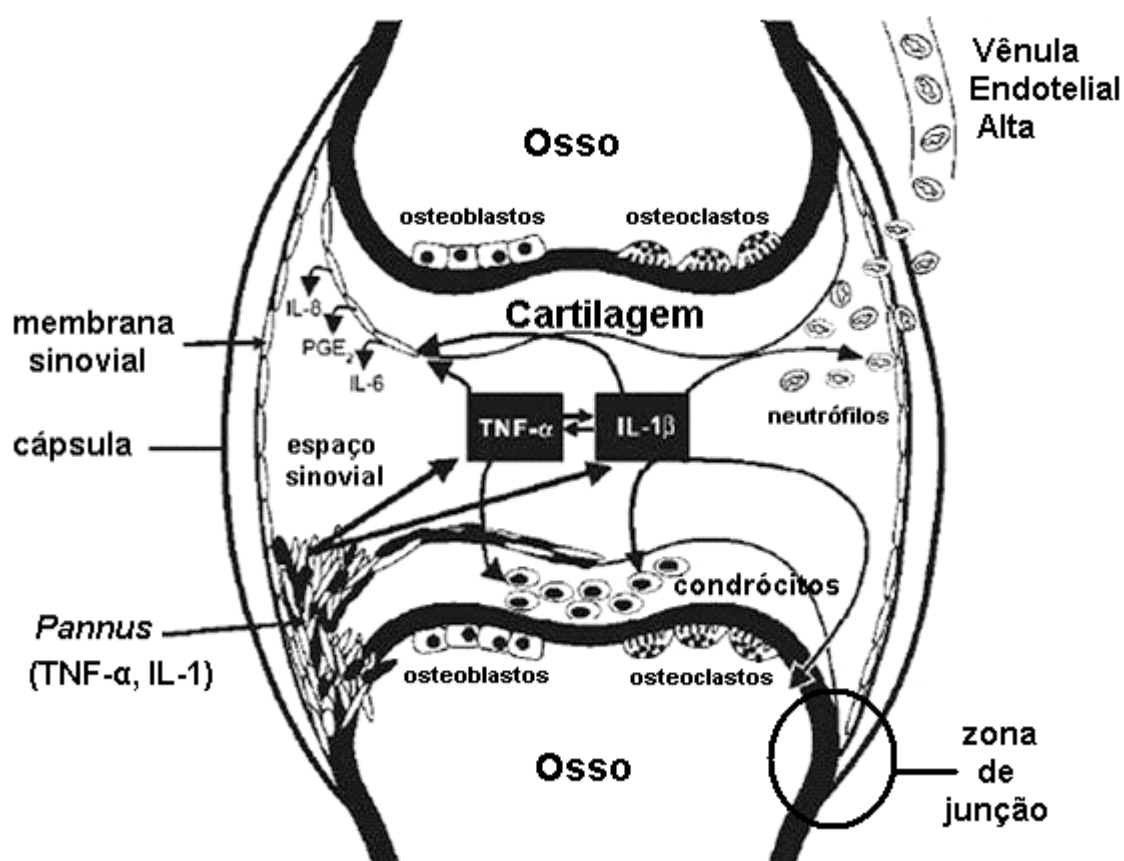
Dentre as doenças reumáticas, a artrite reumatóide (AR) figura entre as principais doenças articulares inflamatórias, e mais recentemente, níveis elevados de ET-1 foram encontrados em amostras de soro (Kuryliszyn-Moskal *et al.*, 2006; Haq *et al.*, 1999) e líquido sinovial (Vaudo *et al.*, 2004; Nahir *et al.*, 1991) de pacientes com AR. De forma interessante, pacientes com AR com manifestações sistêmicas da doença apresentaram elevadas concentrações sorológicas de ET-1 quando comparados a pacientes que ainda não apresentaram sintomas sistêmicos da doença (Kuryliszyn-Moskal *et al.*, 2006), reforçando o envolvimento destes peptídeos na patogênese da doença. Em paralelo, dados experimentais demonstraram o aumento nos níveis de ET-1 nos tecidos periarticulares após a indução do modelo de artrite induzida por antígeno em ratos (Andersson *et al.*, 1999).

#### 1.4.5.1 - Artrite Reumatóide

A artrite reumatóide (AR) é uma doença autoimune caracterizada por um processo inflamatório crônico da membrana sinovial que leva à destruição articular progressiva. A membrana sinovial, a parte mais interna da cápsula articular, é normalmente composta de fina (1-3) camada(s) de células. Ela faz a conexão entre dois ossos e se insere na região do periósteo, próximo à cartilagem articular. O local de inserção, a interseção entre a cartilagem articular, periósteo e membrana sinovial é chamado de zona de junção. Na AR, a membrana sinovial é transformada em um tecido inflamatório hipertrófico, em consequência do influxo de células inflamatórias, incluindo: monócitos, células T e B oriundas da circulação sanguínea e células sinoviais residentes hiperplásicas (revisto por Jimenez-Boj, *et al.*, 2005).

Uma importante característica do tecido inflamatório sinovial é a sua capacidade de invadir estruturas adjacentes, como cartilagem e osso. Esse tecido sinovial invasivo, composto majoritariamente por macrófagos e células sinoviais semelhantes a fibroblastos, é chamado de “*pannus*”. A formação do *pannus* sinovial é causada por diferentes processos, dentre eles: a proliferação de células sinoviais semelhantes a fibroblastos e sinoviócitos, angiogênese, acúmulo de macrófagos, linfócitos e migração de células polimorfonucleares para o tecido sinovial (revisto por Dayer, 2003). Além disso, as interações célula-célula entre sinoviócitos, linfócitos e monócitos leva à produção de diversos mediadores inflamatórios e à produção de grandes quantidades de colagenase.

Citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e IL-1 desempenham um papel relevante na inflamação articular atuando sobre células endoteliais, sinoviócitos e condrócitos induzindo a produção de collagenase, citocinas (ex.:IL-6), quimiocinas (ex.:IL-8) e diversos prostanóides (ex.:PGE<sub>2</sub>) (**Figura 1.5**) (revisto por Dayer, 2003). Atualmente acredita-se que exista uma complexa rede interdependente de citocinas, nas quais o TNF- $\alpha$  e a IL-1, são capazes de mediar os principais processos patofisiológicos que culminam na inflamação e destruição articular durante a AR. Esta hipótese inicial culminou no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que visaram o bloqueio dos efeitos produzidos por estas citocinas (ex: desenvolvimento de receptores solúveis, anticorpos monoclonais), e que inicialmente foram testadas em diferentes modelos experimentais de artrite e há algum tempo vem sendo utilizado com bastante sucesso na terapêutica de pacientes humanos.



**Figura 1.5** – Desenho esquemático da articulação fêmuro-tibial e a ação das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  sobre seus constituintes celulares. TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são produzidos por células do *pannus* sinovial e atuam sinergicamente na articulação reumática aumentando a produção de outros mediadores inflamatórios, como IL-6, IL-8 e PGE<sub>2</sub>. Além disso, induzem a expressão de moléculas de adesão no endotélio das vênulas endoteliais altas permitindo o acúmulo de células inflamatórias no interior do espaço sinovial. Somado a isso, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  ativam osteoclastos e estimulam os condrócitos a produzirem collagenase. Adaptado de Dayer (2003).

#### 1.4.5.2 - Modelos experimentais de inflamação articular

Atualmente a utilização de modelos animais experimentais tem sido de grande valia, funcionando como ferramentas indispensáveis para a compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese de diversos processos fisiopatológicos, bem como para o estudo farmacológico de novos alvos terapêuticos.

No caso específico da AR, atualmente existem diversos modelos experimentais, cada qual com suas peculiaridades. Modelos experimentais de AR não autoimunes têm sido utilizados com o objetivo de caracterizar o processo inflamatório associado às articulações, incluindo a formação de edema articular, migração de leucócitos (Penido *et al.*, 2006), incapacitação articular (da Rocha *et al.*, 2004), dentre outros. A maioria dos modelos de artrite experimental utiliza formas indiretas de monitoramento e avaliação global da severidade da artrite, lançando mão de índices ou *scores* histopatológicos caracterizados por observadores humanos. Nestes ensaios, além das diferenças entre observadores, o edema articular ou o influxo celular para a membrana sinovial são decorrentes de um processo maior ao qual o animal foi submetido (i.e. decorrente do processo de imunização), não apenas de uma resposta inflamatória articular específica. Neste estudo, nós utilizamos o modelo de artrite induzida por zimosan, que é caracterizado por uma reação inflamatória articular restrita à articulação estimulada com zimosan (monoartrite). As partículas de zimosan atuam como ativadores locais da via alternativa do complemento, disparando a ativação local do sistema imune inato, levando à secreção de enzimas lisossomais no interior da cavidade sinovial. Ao ser fagocitado preferencialmente por monócitos e macrófagos, ligando-se aos receptores TLR2 (do inglês, *toll-like receptor 2*), o zimosan leva, dentre outros: à ativação celular, liberação de hidrolases lisossomais, espécies reativas de oxigênio e produção de citocinas (ex.:TNF- $\alpha$ ). Em consequência disso, a injeção de zimosan na articulação produz um quadro de sinovite erosiva grave, que durante a fase aguda é caracterizado por um aumento significativo da permeabilidade vascular e do influxo celular, predominantemente neutrófilos, para a cavidade estimulada (da Rocha *et al.*, 2004; Penido *et al.*, 2006). Posteriormente, em fases mais tardias, ocorre uma sinovite progressiva caracterizada pelo acúmulo predominante de células mononucleares e intensa proliferação de fibroblastos (Rocha *et al.*, 1999) assemelhando-se ao *pannus* reumatóide característico do quadro degenerativo de sinovite crônica reumatóide de pacientes com AR (Gegout *et al.*, 1994, Ledón *et al.*, 2007).

Diversos modelos experimentais murinos mais complexos nos quais a resposta das células T, em decorrência do processo de imunização experimental, resulta no desenvolvimento da sinovite reumatóide já foram desenvolvidos e têm sido amplamente

utilizados. Dentre eles destacam-se o modelo de artrite induzida por antígeno, que consiste em uma resposta imune adaptativa mediada por células T contra antígenos de micobactéria altamente imunogênicos, e o modelo de artrite induzida por colágeno, no qual a imunização com colágeno do tipo II induz à poliartrite. Mais recentemente, alguns modelos experimentais utilizam cepas de camundongos geneticamente modificados, tomando como exemplo o camundongo SKG (Sakaguchi *et al.*, 2003), que é capaz de desenvolver um quadro de poliartrite espontânea.

A artrite induzida por zimosan muito embora seja um modelo experimental animal que possui diversas similaridades com a AR em humanos, apresenta uma menor dependência da resposta imune mediada por linfócitos, especialmente quando comparado à artrite induzida por colágeno ou por antígeno. Entretanto, já foi previamente demonstrado que a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  bem como o influxo de neutrófilos, monócitos/macrófagos são indispensáveis, assim como na AR, na patogênese da inflamação articular induzida por zimosan (Van de Loo, 1998; Pettipher & Salt, 1996). Neste estudo nós utilizamos o modelo de artrite induzida por zimosan como ferramenta para estudar o efeito do bloqueio farmacológico dos receptores de endotelina sobre o influxo celular e a formação de edema articular induzida por este modelo murino.

Assim sendo, neste estudo nós pretendemos comprovar a hipótese de que as endotelinas endógenas participam diretamente da resposta inflamatória articular.

## **2 – OBJETIVO**

## **2.1 – Geral**

Avaliar a participação das endotelinas endógenas no desenvolvimento da resposta inflamatória articular aguda no modelo murino de artrite experimental induzida por zimosan.

### *2.1.1 – Específicos*

- a.** Estudar o efeito agudo da injeção de ET-1 e sarafotoxina S6c na cavidade articular, avaliando: 1) formação de edema; 2) acúmulo de leucócitos totais, de neutrófilos e células mononucleares.
- b.** Avaliar os efeitos produzidos pelo bloqueio farmacológico dos receptores de endotelina (ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub>) no modelo de artrite induzida por zimosan sobre diferentes parâmetros da resposta inflamatória articular aguda, incluindo: 1) formação de edema; 2) acúmulo de leucócitos totais, de neutrófilos e células mononucleares, recolhidos do lavado articular ou retidos no tecido da articulação fêmuro-tibial; 3) produção de mediadores inflamatórios (citocinas/quimiocinas).
- c.** Avaliar a expressão dos receptores de endotelina no tecido sinovial após a indução da resposta inflamatória articular aguda induzida por zimosan.

### **3 – MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 – Animais**

Neste estudo foram utilizados camundongos machos da linhagem isogênica C57BL/6, com peso médio variando entre 20 – 25 g, oriundos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL-FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Os camundongos foram mantidos no biotério experimental do laboratório de Farmacologia Aplicada (Farmanguinhos/FIOCRUZ) com temperatura controlada de 23°C ± 2°C e ciclo claro-escuro constante (período claro de 7 às 19 horas) e livre acesso a água e ração para roedores.

Os experimentos envolvendo animais foram conduzidos de acordo com as normas éticas internacionais, sendo o projeto devidamente aprovado no Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz sob o licença número 0050/00.

### **3.2 – Tratamentos**

Os antagonistas seletivos dos receptores ET<sub>A</sub> (BQ123) ou ET<sub>B</sub> (BQ788) da endotelina (ET) foram diluídos em PBS e injetados intra-articularmente (i.a.) em doses variando entre 0,15 a 150 pmol/cav, em um volume final de 25 µL por joelho, 5 minutos antes da indução da artrite por zimosan (500 µg/cav; i.a.). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de salina estéril (i.a.).

### **3.3 – Indução da Artrite por Zimosan**

A artrite experimental foi induzida através da injeção i.a. de zimosan (500 µg/cav em 25 µL de salina estéril), através do ligamento suprapatelar da articulação fêmuro-tibial do camundongo, visando acessar o interior da cavidade articular. Como controle, os animais do grupo controle receberam o mesmo volume i.a. de salina estéril.



### ***3.4 – Agonistas dos receptores de endotelina***

Neste estudo nós injetamos i.a. ET-1 (1-30 pmol/cav) e o agonista seletivo do receptor ET<sub>B</sub> da endotelina, a sarafotoxina S6c (0,1-30 pmol/cav), diluídos em PBS, em um volume final de 25 µL por animal. Os respectivos animais do grupo controle receberam o mesmo volume de salina estéril (25 µL/cav; i.a.).

### ***3.5 – Avaliação do edema articular***

A avaliação da formação de edema articular foi determinada através da medida do diâmetro transverso da articulação fêmuro-tibial, com o auxílio de um paquímetro digital (Digimatic Caliper, Mitutoyo Corporation, Japão), antes e depois do estímulo i.a. Os resultados foram expressos como a diferença (?) do diâmetro transverso da articulação fêmuro-tibial aferido após a injeção i.a. subtraído do valor aferido antes do estímulo, e foram expressos em milímetros (mm).

### ***3.6 – Contagem total e diferencial das células recolhidas do lavado articular***

Após a eutanásia dos animais, por excesso de inalação de CO<sub>2</sub>, a cavidade articular do joelho dos camundongos foi lavada com auxílio de uma seringa acoplada a uma agulha de 21G contendo 300 µL de uma solução de PBS/heparina (10 UI/mL). A agulha foi introduzida através do ligamento suprapatelar do joelho do camundongo, permitindo o acesso, a lavagem e a aspiração do líquido presente no interior da cavidade articular.

A contagem total de leucócitos do lavado articular foi efetuada em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico, após diluição em líquido de Türk (ácido acético 2 %). A contagem diferencial de células mononucleares e neutrófilos foi realizada sob objetiva de imersão em citoesfregaços (450 rpm, 5 minutos) (Cytospin 3, Shandon Inc., EUA), após serem fixados e corados pelo método de May Grünwald-Giemsa. De acordo com este método, as lâminas ficam imersas em May Grünwald por 3 minutos, para fixação e coloração de grânulos celulares, 2 minutos em água para retirada do excesso de corante e 15 minutos em Giemsa, para corar o núcleo. As contagens foram realizadas de acordo com o número de células por cavidade.

### 3.7 – *Histologia*

A articulação fêmuro-tibial de camundongos C57BL/6, 6 e 24 h após o estímulo i.a. com zimosan (500 µg/cav), foi removida, dissecada e fixada por 12 h em paraformaldeído 4 % (v/v). Logo após, a articulação foi descalcificada em solução tampão fosfato (0,1 M) / EDTA 10 % durante 14 dias, com trocas de tampão diárias, sendo posteriormente processada para histologia convencional, sofrendo inclusão em parafina e clivagem em micrótomo (Leica, Alemanha). Os blocos contendo as peças foram seccionados numa espessura de 5 µm e colocados em uma lâmina de vidro para posterior coloração pela técnica de hematoxilina e eosina. Resumidamente, as lâminas foram submetidas à desidratação em soluções hidroalcoólicas de concentrações crescentes, clarificação em xilol e, em seguida, coloração com hematoxilina e eosina. As lâminas foram montadas com lâminulas de vidro em meio próprio e analisadas ao microscópio óptico.

### 3.8 – *Preparação do extrato da articulação fêmuro-tibial*

O extrato da articulação fêmuro-tibial foi realizado como previamente descrito por Rosengren *et al.* (2003) e adaptado para uso em camundongos. Os camundongos foram eutanasiados 6 e 24 h após a injeção i.a. de zimosan (500 µg/cav), ou salina estéril (25 µL/cav; i.a.), e quase a totalidade do tecido adjacente à articulação fêmuro-tibial, incluindo tendões, osso e tecido muscular, foram removidos resultando em um espécime triangular bem definido e padronizado da articulação em estudo, como descrito por Van Meurs *et al.* (1997). Após a remoção e dissecação do espécime, o tecido foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, durante 5 minutos, sendo em seguida pulverizado com um martelo. O tecido pulverizado foi homogeneizado manualmente com auxílio de um pistilo de teflon em *potter* de vidro (Kontes Glass Company, New Jersey, EUA) contendo 1 mL de solução gelada de HBSS contendo 0,4 % de Triton-X e 0,2 % de inibidor completo de protease (Complete Mini, Roche Applied Science, Indianópolis, EUA), em uma proporção indicada pelo fabricante de 50 µL de inibidor para 10 mg de tecido. O homogenato foi então centrifugado (5.000 g por 10 minutos a 4 °C) e o sobrenadante filtrado (0,2 µm, Millipore) e armazenado a -20 °C até o momento do uso.

### **3.9 – Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Os níveis das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e das quimiocinas CXCL1/IL-8, CCL2/MCP-1 e CXCL11/I-TAC presentes no sobrenadante dos extratos da articulação fêmuro-tibial foram avaliados pelo método de ELISA sanduíche, utilizando pares de anticorpos específicos de acordo com as instruções do fabricante R&D Systems (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, EUA).

### **3.10 – Isolamento da cápsula articular do joelho de camundongos e preparo do extrato celular total para Western Blotting**

A cápsula articular do joelho de camundongos C57BL/6 foi isolada de maneira padronizada, como descrito por Van Meurs *et al.* (1997), com adaptações feitas por nós. Resumidamente, a cápsula sinovial, a patela (incluindo o ligamento patelar) e o tecido sinovial adjacente foram isolados da articulação fêmuro-tibial de camundongos C57BL/6, 6 e 24 h após o estímulo i.a. de zimosan (500  $\mu$ g/cav) ou salina estéril (25  $\mu$ L/cav; i.a.), e imediatamente congelado em nitrogênio líquido até o momento do uso. Em seguida, o tecido foi homogeneizado manualmente com auxílio de um pistilo de teflon em *potter* de vidro (Kontes Glass Company, Vineland, NJ), durante 15 minutos, em tampão gelado de lise (20 mM HEPES, 350mM NaCl, 20 % (v/v) Glicerol, 1 % (v/v) NP-40, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 0,5 mM ditiotreitól) suplementado com 0,5 mM PMSF; 1mM benzamidina, 1 $\mu$ M leupeptina e 1mM inibidor de tripsina (Sigma). O extrato foi centrifugado (10.000 g; 5 min a 4°C), o precipitado foi descartado enquanto o sobrenadante foi utilizado para quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976).

### **3.11 – Western Blotting**

Após o processamento do tecido e a quantificação de proteínas totais, o homogenato do tecido foi desnaturado em tampão de amostra (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1 % SDS; 5 %  $\beta$ -mercaptoetanol; 10 % glicerol; 0,001 % azul de bromofenol) e aquecido em banho-maria a 95 °C por 3 minutos. As amostras (40  $\mu$ g de proteína total/coluna) e o padrão de peso molecular (Rainbow, Amersham Biosciences, Quebec, Canada) foram aplicadas e resolvidas em gel descontínuo de poliacrilamida nas concentrações de 7 % (gel de empilhamento) e 10 % (gel de separação) para corrida eletroforética (1 gel: 150 V; 25 mA) por 1 h. Em seguida, as

proteínas foram eletroforéticamente transferidas (15 V; 328 mA) durante 1 h para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C Pure, Amersham Pharmacia Biotech, São Francisco, EUA). Logo após, a membrana foi então bloqueada durante 30 minutos com 0,5% Tween-20 em PBS contendo albumina sérica bovina a 2 %, e posteriormente incubadas por 12 h com anticorpo policlonal primário específico contra o receptor ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> da endotelina (1:200, Santa Cruz Biotechnology, California, EUA) ou actina (1:200, Santa Cruz Biotechnology, California, EUA). Após três lavagens com PBS/0,5% Tween-20, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-IgG específicos conjugado a biotina (1:10000; Santa Cruz Biotechnology, California, EUA) à temperatura ambiente sob agitação por 1 hora com subsequente incubação com estreptavidina conjugada a peroxidase (1:10000; Invitrogen, California, EUA). As proteínas imunorreativas foram visualizadas utilizando a metodologia de revelação por ECL (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate – Pierce Biotechnology) e em seguida as membranas foram expostas a um filme fotográfico (Kodak).

As amostras foram corridas em duplicata, com a primeira coluna referente à marcação desejada, neste caso o receptor ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> (54 KDa e 50 KDa respectivamente), e a outra referente ao padrão interno. Neste caso, o padrão utilizado para extrato celular total foi a actina (43 KDa). As bandas foram quantificadas por densitometria óptica, utilizando o programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Os resultados estão expressos como o quociente dos valores de densidade óptica entre a expressão do receptor de endotelina (ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub>) e actina.

### ***3.12 – Análise Estatística***

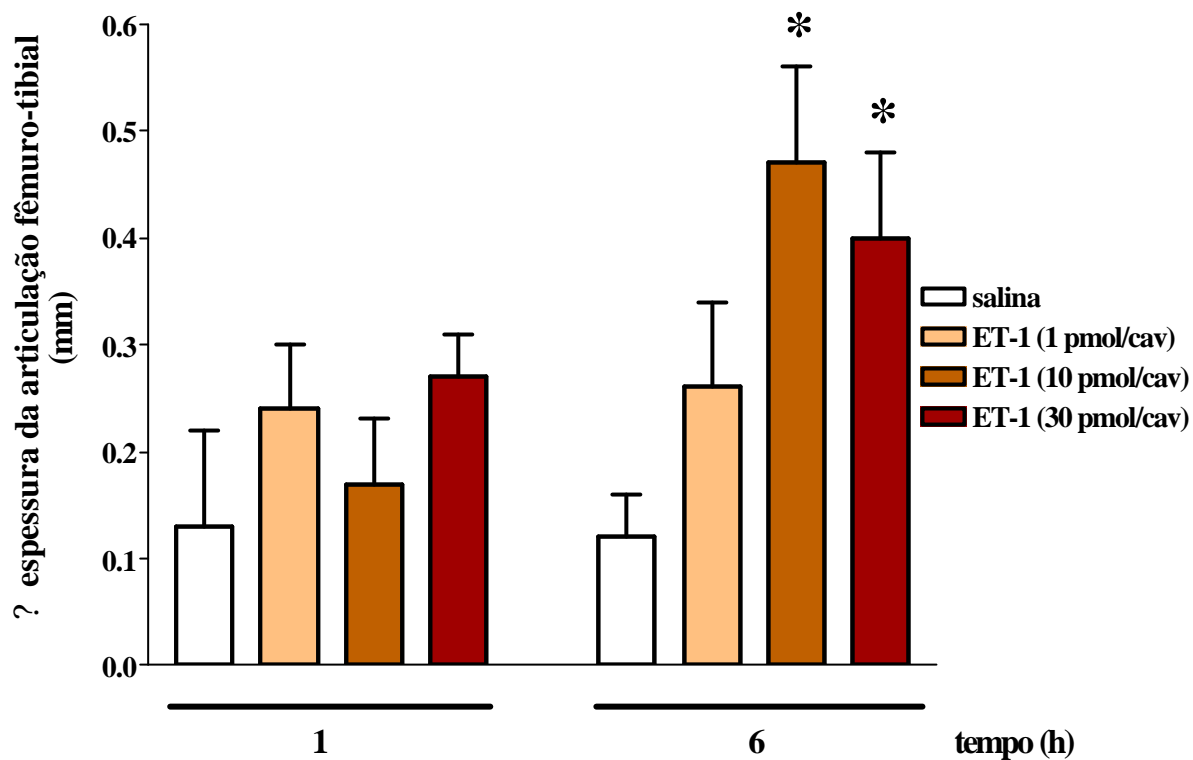
Os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M., e foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) e do teste Newman-Keuls-Student, considerando significativo os valores de  $p < 0,05$ .

## **4 – RESULTADOS**

#### ***4.1 – Análise do efeito de diferentes doses de ET-1 sobre a formação de edema na articulação fêmuro-tibial de camundongos.***

Haja vista que diversos relatos experimentais associam às endotelinas um importante papel na inflamação, principalmente em certos estados patológicos em que seus níveis estão aumentados, dentre eles a AR, inicialmente avaliou-se se a administração de ET-1 exógena *per se* era capaz de gerar efeitos pró-inflamatórios na cavidade articular. Dessa forma, avaliamos o efeito da injeção i.a. de ET-1 exógena sobre a formação de edema articular durante as seis primeiras horas após a estimulação.

De acordo com a **Figura 4.1**, a injeção i.a. de ET-1 (10 e 30 pmol/cavidade) induziu, 6 h após o estímulo, a formação de edema articular quando comparado ao grupo controle. Em contrapartida, a menor dose de ET-1 (1 pmol/cavidade) utilizada neste estudo, não foi capaz de, durante as seis primeiras horas, induzir a formação de edema articular.



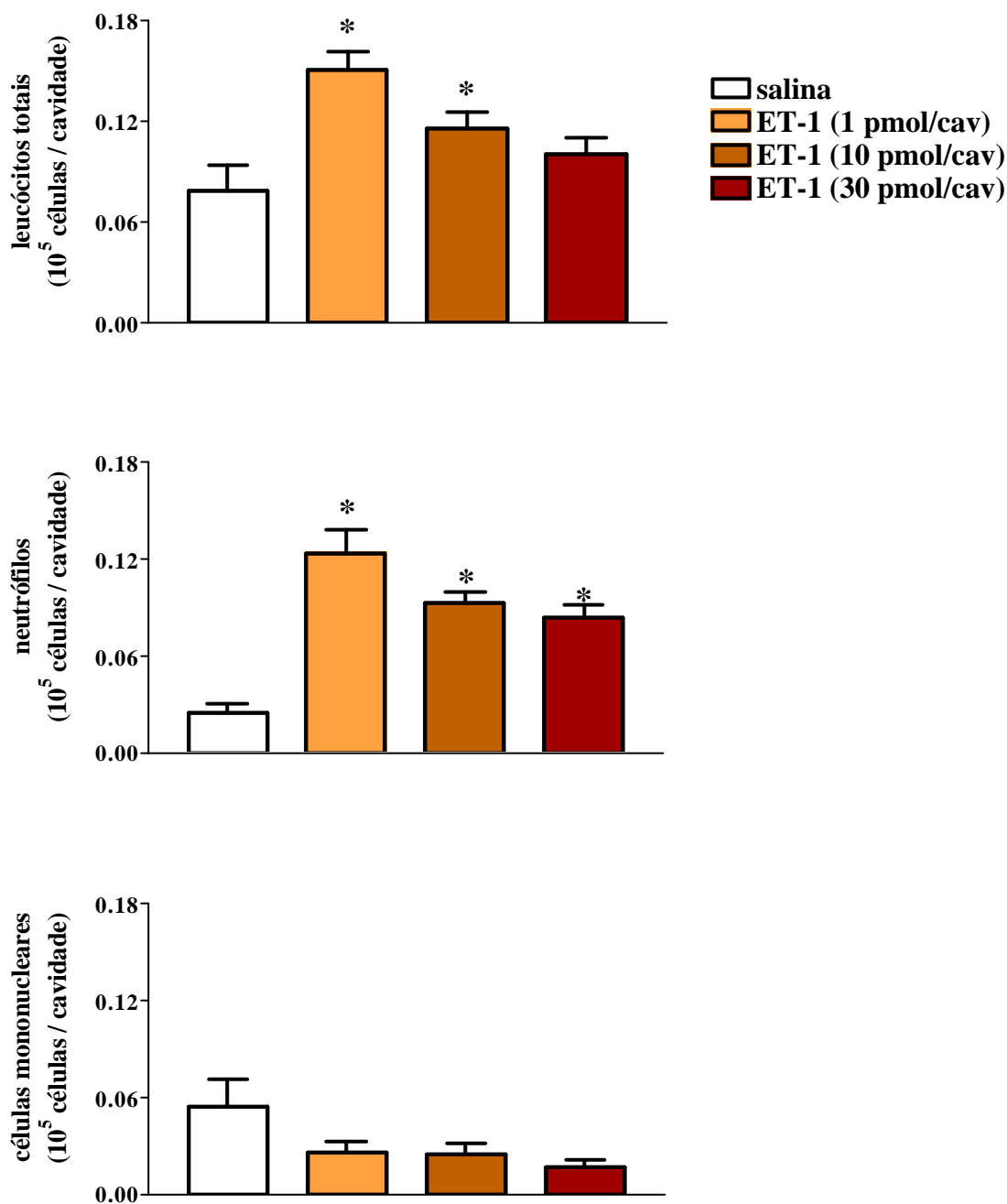
**Figura 4.1** – Indução da formação de edema articular em camundongos C57BL/6 submetidos à injeção i.a. com ET-1 (1, 10 e 30 pmol/cavidade; 25  $\mu$ L). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume i.a. de salina estéril. A formação de edema foi avaliada com o auxílio de um paquímetro digital 1 e 6 h após o estímulo i.a. com ET-1. Os valores foram descritos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de um grupo de no mínimo 10 animais. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos salina e ET-1 foram representados por \*.

#### ***4.2 – Análise do efeito de diferentes doses de ET-1 sobre o influxo de leucócitos para a cavidade articular de camundongos.***

Após avaliar o papel edematogênico da ET-1, avaliou-se a capacidade da ET-1 de induzir o acúmulo de leucócitos no lavado articular 6 h após o estímulo. A injeção i.a. de ET-1 (1 e 10 pmol/cavidade) induziu, em 6 h, o acúmulo significativo de leucócitos totais para o lavado articular. No entanto, e de forma inesperada, a maior dose utilizada (30 pmol/cavidade) não foi capaz de induzir o aumento no influxo de leucócitos totais para a cavidade articular, quando comparado ao grupo controle (**Figura 4.2**). O acúmulo significativo de leucócitos totais, em 6 h, induzido por ET-1 (1, 10 e 30 pmol/cavidade) deveu-se ao acréscimo significativo no influxo de neutrófilos para o lavado articular. Em contrapartida, o estímulo i.a. com ET-1, em quaisquer doses utilizadas neste estudo, não foi capaz de induzir influxo significante de células mononucleares para o lavado articular quando comparado ao grupo controle (salina).

A partir dos resultados obtidos, nos próximos ensaios a ET-1 foi utilizada na dose de 10 pmol/cavidade, por ser a única dose testada capaz de induzir ao mesmo tempo o influxo de leucócitos para o lavado articular e a formação de edema.

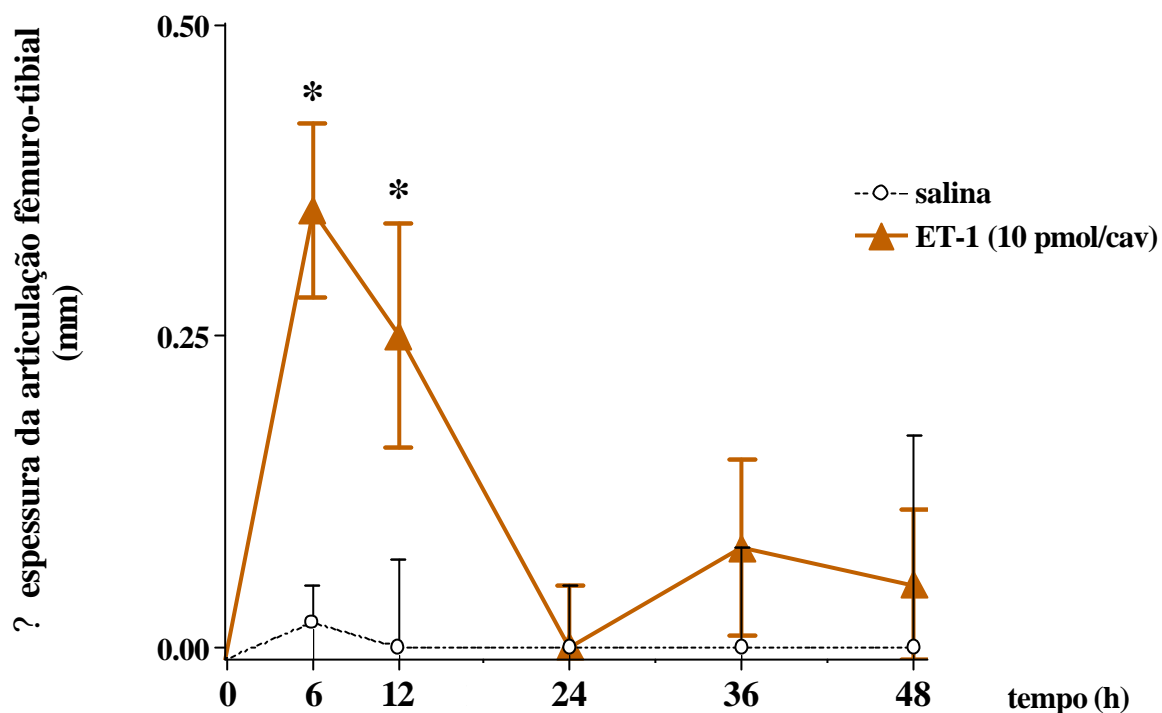




**Figura 4.2** – Indução do influxo de leucócitos para o lavado articular de camundongos C57BL/6 após injeção i.a. de ET-1 exógena (1, 10 e 30 pmol/cavidade; 25 µL). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume i.a. de salina estéril. O acúmulo de leucócitos foi avaliado 6 h após o estímulo com ET-1. Os valores foram descritos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de um grupo de no mínimo 10 animais. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos salina e ET-1 foram representados \*.

#### ***4.3 – Cinética da injeção intra-articular de ET-1 (10 pmol/cavidade) sobre a formação de edema na articulação fêmuro-tibial de camundongos.***

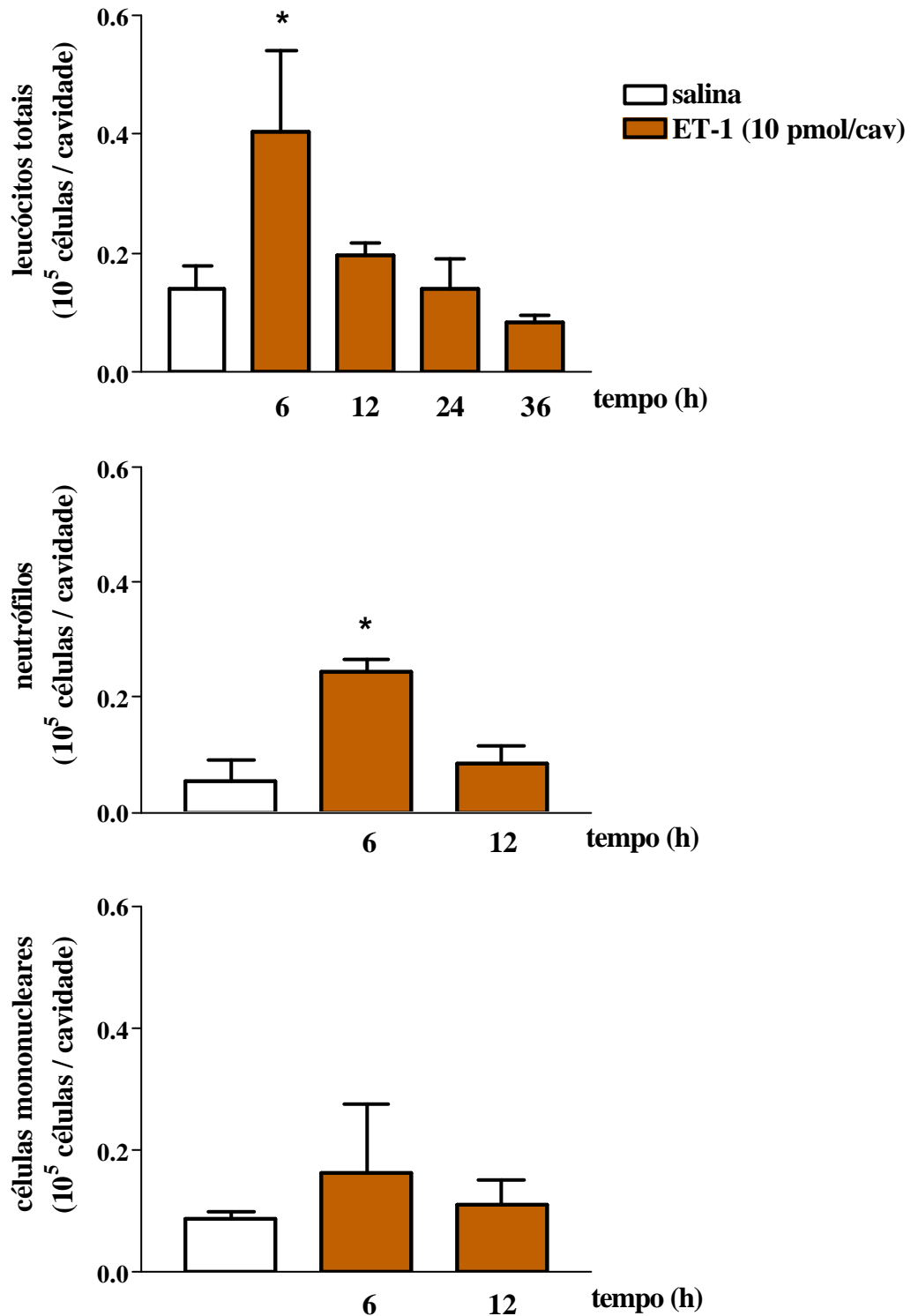
Após definir a dose de ET-1 a ser utilizada, avaliou-se a cinética da formação de edema articular induzida por ET-1. Como demonstrado na **Figura 4.3**, a injeção i.a. de ET-1 (10 pmol/cavidade) foi capaz de causar o aumento significativo no diâmetro da articulação fêmuro-tibial em 6 e 12 h. A resposta máxima de formação de edema articular ocorreu em 6 h e começou a declinar com o passar do tempo, permanecendo significativamente acima dos valores obtidos para animais do grupo controle até 12 h e voltando aos valores basais em tempos mais tardios (24, 36 e 48 h).



**Figura 4.3** – Cinética da formação de edema na articulação fêmuro-tibial de camundongos C57BL/6 após injeção i.a. de ET-1 exógena (10 pmol/cavidade; 25  $\mu$ L). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume i.a. de salina estéril. O ? do diâmetro da articulação fêmuro-tibial foi avaliado com o auxílio de um paquímetro digital em 6, 12, 24, 36 e 48 h após o estímulo com ET-1. Os valores foram descritos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de um grupo de no mínimo 10 animais. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos salina e ET-1 foram representados por \*.

#### ***4.4 – Cinética da migração de leucócitos para o lavado articular de camundongos induzida pela injeção intra-articular de ET-1 (10 pmol/cavidade).***

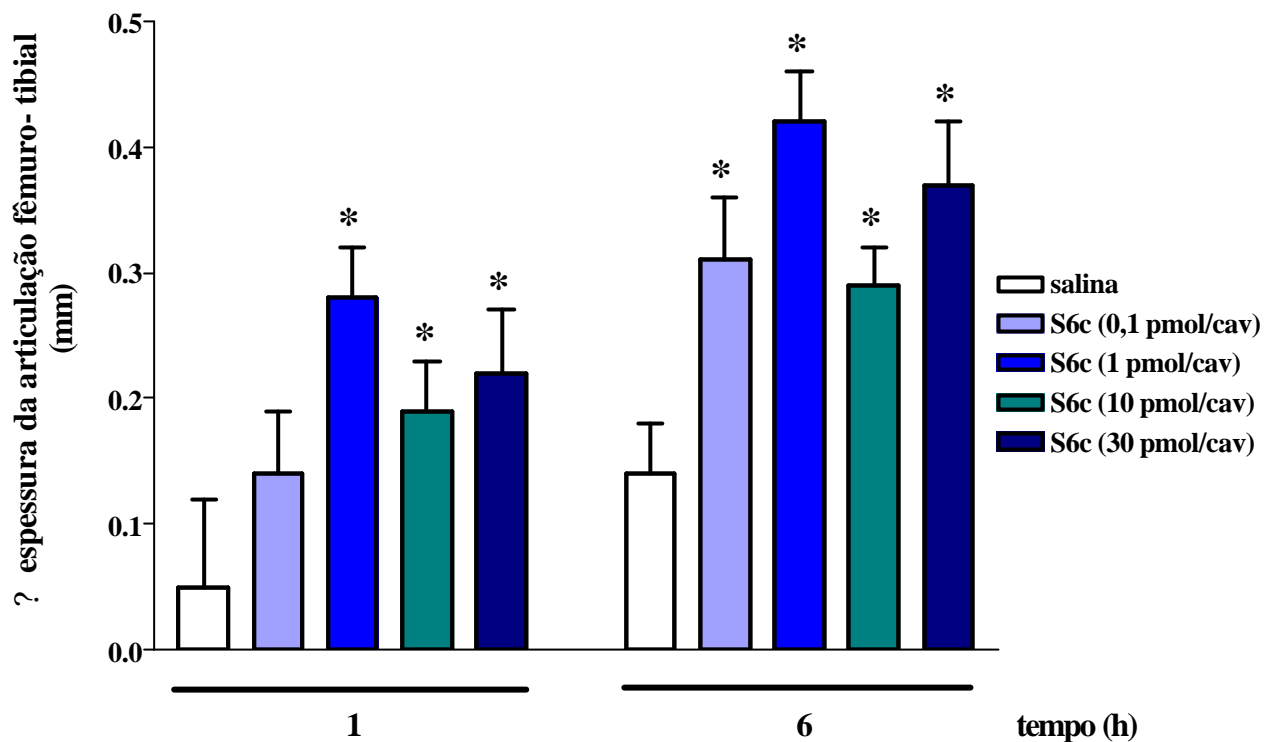
Segundo demonstrado na **Figura 4.4**, a injeção de ET-1 (10 pmol/cavidade) na cavidade articular foi capaz de induzir o acúmulo significativo de leucócitos somente durante as primeiras 6 h após o estímulo. Em tempos mais tardios (12, 24 e 36 h) não foram observadas quaisquer alterações no influxo de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares, para a cavidade articular (dados não mostrados). O aumento no acúmulo de leucócitos induzido pela ET-1, em 6 h deveu-se ao aumento significativo do influxo de neutrófilos, uma vez que nenhuma alteração foi observada no influxo de células mononucleares para a cavidade articular estimulada, sugerindo seletividade e potencial efeito quimiotático para neutrófilos *in vivo*.



**Figura 4.4** – Cinética do acúmulo de leucócitos no lavado articular de camundongos C57BL/6 após injeção i.a. de ET-1 exógena (10 pmol/cavidade; 25 µL). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume i.a. de salina estéril. O acúmulo de leucócitos foi avaliado 6, 12, 24 e 36 h após o estímulo com ET-1. Os valores foram descritos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de um grupo de no mínimo 10 animais. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos salina e ET-1 foram representados por \*.

#### ***4.5 – Efeito dose-resposta da injeção intra-articular de sarafotoxina S6c sobre a formação de edema na articulação fêmuro-tibial de camundongos.***

O uso de ferramentas farmacológicas como agonistas e antagonistas seletivos de receptores têm sido amplamente utilizados para demonstrar o envolvimento de subtipos de receptores de endotelina específicos em processos inflamatórios. Com o intuito avaliar a participação específica dos receptores ET<sub>B</sub> sobre a formação de edema articular, nós avaliamos o efeito do agonista seletivo deste receptor, a sarafotoxina S6c (S6c). Os dados apresentados na **Figura 4.5** demonstraram que a estimulação i.a. com S6c foi capaz de induzir o aumento do diâmetro da espessura da articulação fêmuro-tibial em todas as doses utilizadas neste estudo. Já na primeira hora após o estímulo, a sarafotoxina S6c (1, 10 e 30 pmol/cavidade) induziu o aumento do diâmetro da articulação fêmuro-tibial, permanecendo significativamente acima dos valores obtidos para animais do grupo controle durante todo o intervalo de tempo estudado, atingindo seus valores máximos em 6 h. Todas as doses utilizadas induziram a formação de edema articular 6 h após a estimulação.

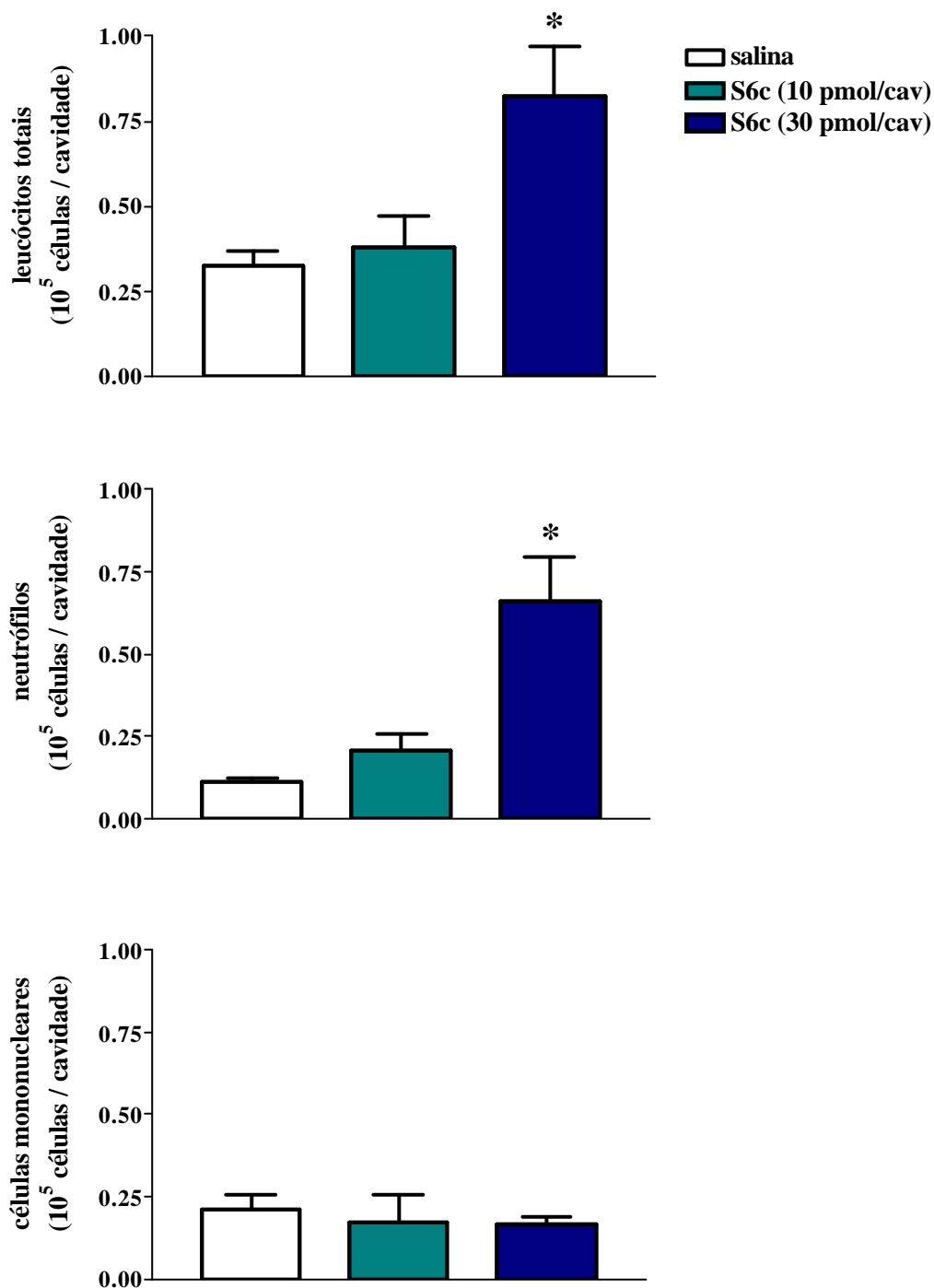


**Figura 4.5** – Indução da formação de edema na articulação fêmuro-tibial de camundongos C57BL/6 após estimulação i.a. com S6c (0,1 – 30 pmol/cavidade; 25  $\mu$ L). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume i.a. de salina estéril. A formação de edema na articulação foi avaliada com o auxílio de um paquímetro digital 1 e 6 h após o estímulo. Os valores foram descritos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de um grupo de, no mínimo, 10 animais. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos salina e sarafotoxina S6c foram representados por \*.

#### ***4.6 – Efeito da injeção intra-articular de sarafotoxina S6c sobre o acúmulo de leucócitos na cavidade articular de camundongos.***

Com o intuito de investigar a participação dos receptores ET<sub>B</sub> sobre o influxo de leucócitos para a cavidade articular, avaliamos o efeito, em 6 h, do estímulo i.a. com a sarafotoxina S6c (S6c). De modo similar ao observado para a injeção de ET-1, a injeção de S6c (30 pmol/cavidade; i.a.) induziu o acúmulo significativo de leucócitos totais na cavidade articular em 6 h, principalmente por induzir o influxo de neutrófilos, enquanto nenhuma alteração foi observada no influxo de células mononucleares recolhidas da cavidade articular estimulada (**Figura 4.6**). Doses menores de sarafotoxina (0,1-1 pmol/cavidade) não foram capazes de induzir o aumento significativo no número de leucócitos totais, mas levaram ao aumento significativo no número de neutrófilos recolhidos do lavado articular nas seis primeiras horas após o estímulo *in situ* com S6c (dados não mostrados).





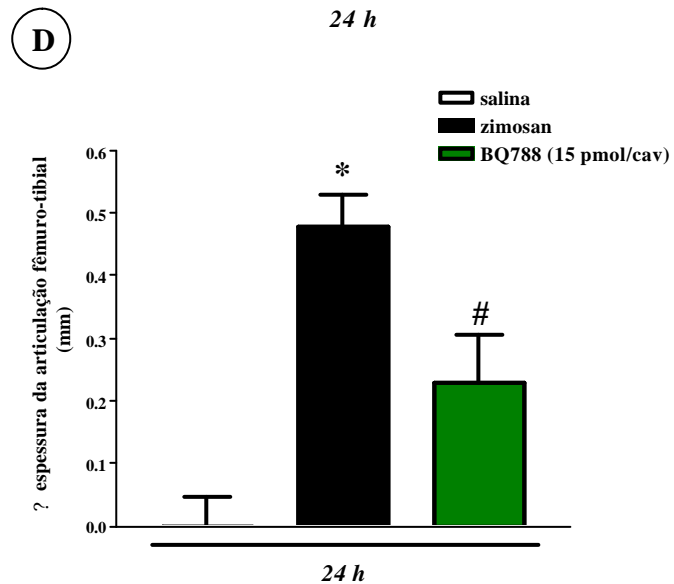
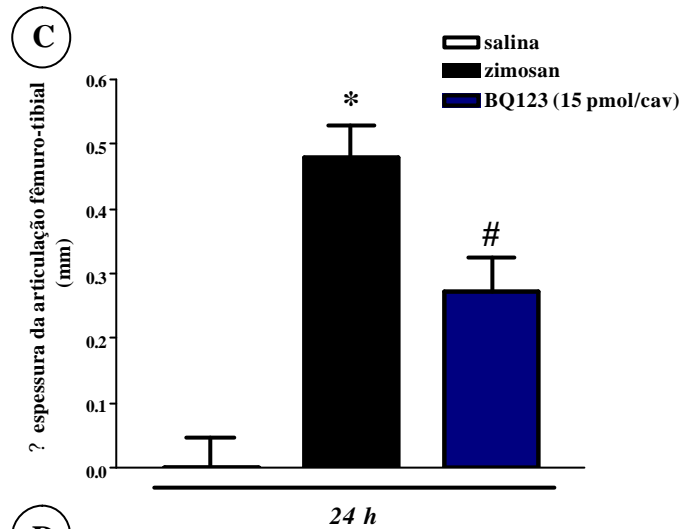
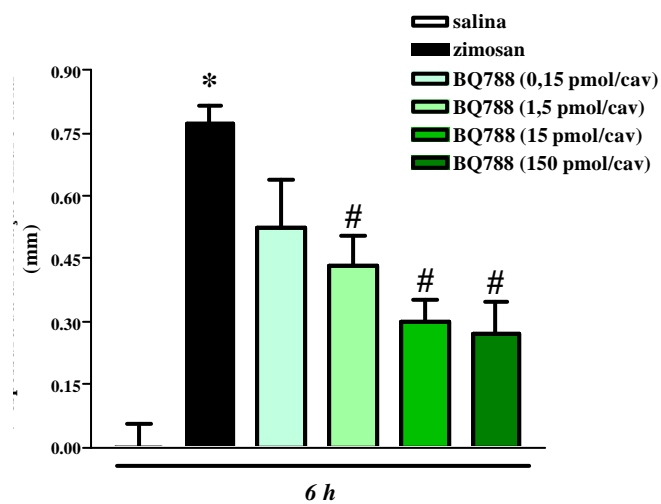
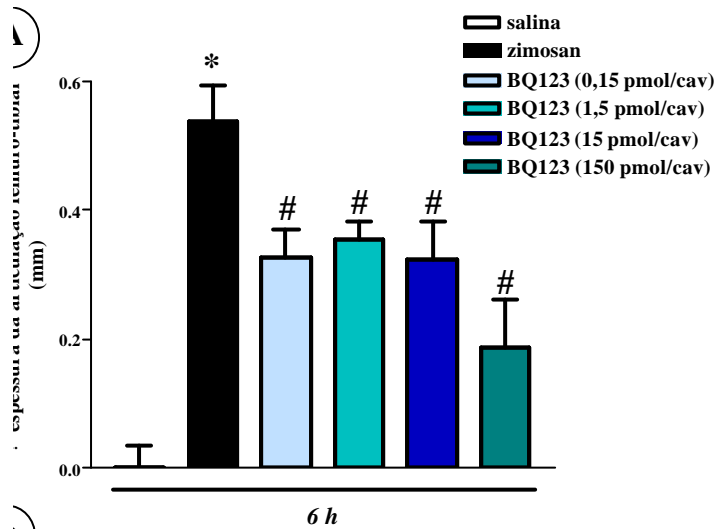
**Figura 4.6** – Influência do tratamento i.a. com S6c (0,1 – 30 pmol/cavidade; 25  $\mu$ L) sobre o número de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares recolhidos do lavado articular de camundongos C57BL/6 após 6 h estímulo. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume i.a. de salina estéril. Os valores foram descritos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de um grupo de no mínimo 10 animais. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos salina e sarafotoxina S6c foram representados por \*.

#### ***4.7 – Influência dos antagonistas seletivos de receptores de endotelina sobre a formação de edema na articulação fêmuro-tibial no modelo murino de artrite induzida por zimosan.***

Em artigo recentemente publicado pelo nosso grupo, demonstrou-se que a injeção i.a. de zimosan é capaz de, nas primeiras 6 horas, causar um aumento significativo no diâmetro da articulação fêmuro-tibial. Este fenômeno está associado ao aumento significativo do extravasamento de líquidos e proteína para o ambiente extravascular (Penido *et al.*, 2006). Assim sendo, a análise de parâmetros inflamatórios, como: influxo celular, formação de edema e produção de citocinas/quimiocinas foram realizadas 6 e 24 h após o estímulo i.a. com zimosan, uma vez que uma intensa resposta inflamatória local já podia ser observada.

Segundo dados demonstrados na **Figura 4.7 (A)**, o pré-tratamento com o antagonista seletivo do receptor ET<sub>A</sub> (BQ123; i.a.) foi capaz de, em todas as doses utilizadas neste estudo, reduzir significativamente a formação de edema induzida por zimosan (500 µg/cavidade; i.a.), 6 h após o estímulo. Aliado a isso, o bloqueio farmacológico seletivo dos receptores ET<sub>B</sub> (BQ788; i.a.) reduziu, de forma dependente da dose, a formação de edema induzida por zimosan (500 µg/cavidade; i.a.), 6 h após o estímulo (**Figura 4.7 (B)**).

Em seguida, avaliou-se o efeito do bloqueio farmacológico seletivo dos receptores ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub>, utilizando agora somente a dose de 15 pmol/cav, durante a resposta máxima de formação de edema induzida por zimosan (24 h). Nossos dados apresentados na **Figura 4.7 (C-D)** demonstraram que 24 h após o estímulo com zimosan (500 µg/cavidade; i.a.) houve um aumento significativo da espessura da articulação fêmuro-tibial e que o bloqueio farmacológico específico dos receptores de endotelina ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> (BQ123 e BQ788, respectivamente; i.a.) foi capaz de reduzir significativamente a formação de edema induzida por zimosan.



**Figura 4.7** – Redução da formação de edema induzida por zimosan em camundongos C57BL/6 após bloqueio farmacológico dos receptores ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> (BQ123 e BQ788, respectivamente). **(A-B)** Efeito dose-resposta dos antagonistas seletivos dos receptores ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> (0,15-150 pmol/cav; i.a.) sobre a formação de edema induzida por zimosan em 6 h. **(C-D)** Efeito do bloqueio farmacológico dos receptores ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> (15 pmol/cav) sobre a formação de edema induzida por zimosan 24 h após o estímulo. A artrite experimental foi induzida por zimosan (500 µg/cavidade; i.a.) 5 minutos após o pré-tratamento *in situ* com BQ123 ou BQ788 (0,15-150 pmol/cavidade; i.a.) e as análises foram feitas 6 **(A-B)** e 24 **(C-D)** h após o estímulo com zimosan. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume i.a. de salina estéril. Os valores estão descritos como média ± erro padrão da média (EPM), e estão expressos com ? do diâmetro da espessura da articulação. Os grupos experimentais continham 5 **(A-B)** e 10 **(C-D)** animais. As diferenças estatisticamente significativas (teste one-way ANOVA e Student-Newman-Keuls; p < 0,05) entre os grupos salina e zimosan foram representados por \*, e entre o grupo zimosan e os tratamentos foram representados por #.

#### ***4.8 – Influência dos antagonistas seletivos de receptores de endotelina sobre o acúmulo de leucócitos na cavidade articular no modelo murino de artrite induzida por zimosan.***

Além do aumento significativo na formação de edema articular induzido por zimosan descrito anteriormente, 6 h após a injeção intra-articular, o edema é acompanhado por aumento significativo no número de leucócitos presentes na cavidade sinovial de camundongos C57BL/6, quando comparados aos animais do grupo controle que receberam mesmo volume i.a. de salina estéril (**Figura 4.8.1 e 4.8.2**). O acúmulo de leucócitos para a cavidade articular induzido por zimosan, em 6 h, deveu-se principalmente ao intenso influxo de neutrófilos somado ao discreto, mas significativo, influxo de células mononucleares para o sítio inflamado.

O pré-tratamento com o antagonista peptídico seletivo para o receptor ET<sub>A</sub> (BQ123; i.a.) reduziu significativamente e de forma dose-dependente, nas seis primeiras horas, o acúmulo de leucócitos induzido por zimosan na cavidade articular afetada (**Figura 4.8.1**). O efeito observado na redução do influxo de leucócitos foi caracterizado pela inibição do influxo de neutrófilos para a cavidade sinovial, sendo significativamente relevante nas doses utilizadas de 15 e 150 pmol/cav. O bloqueio seletivo do receptor ET<sub>A</sub> não foi capaz de induzir, nas doses utilizadas nesse estudo, quaisquer alterações significativas na migração de células mononucleares induzida por zimosan. A princípio, o bloqueio do receptor ET<sub>A</sub> parece estar seletivamente envolvido no influxo de neutrófilos induzido por zimosan para a cavidade articular inflamada.

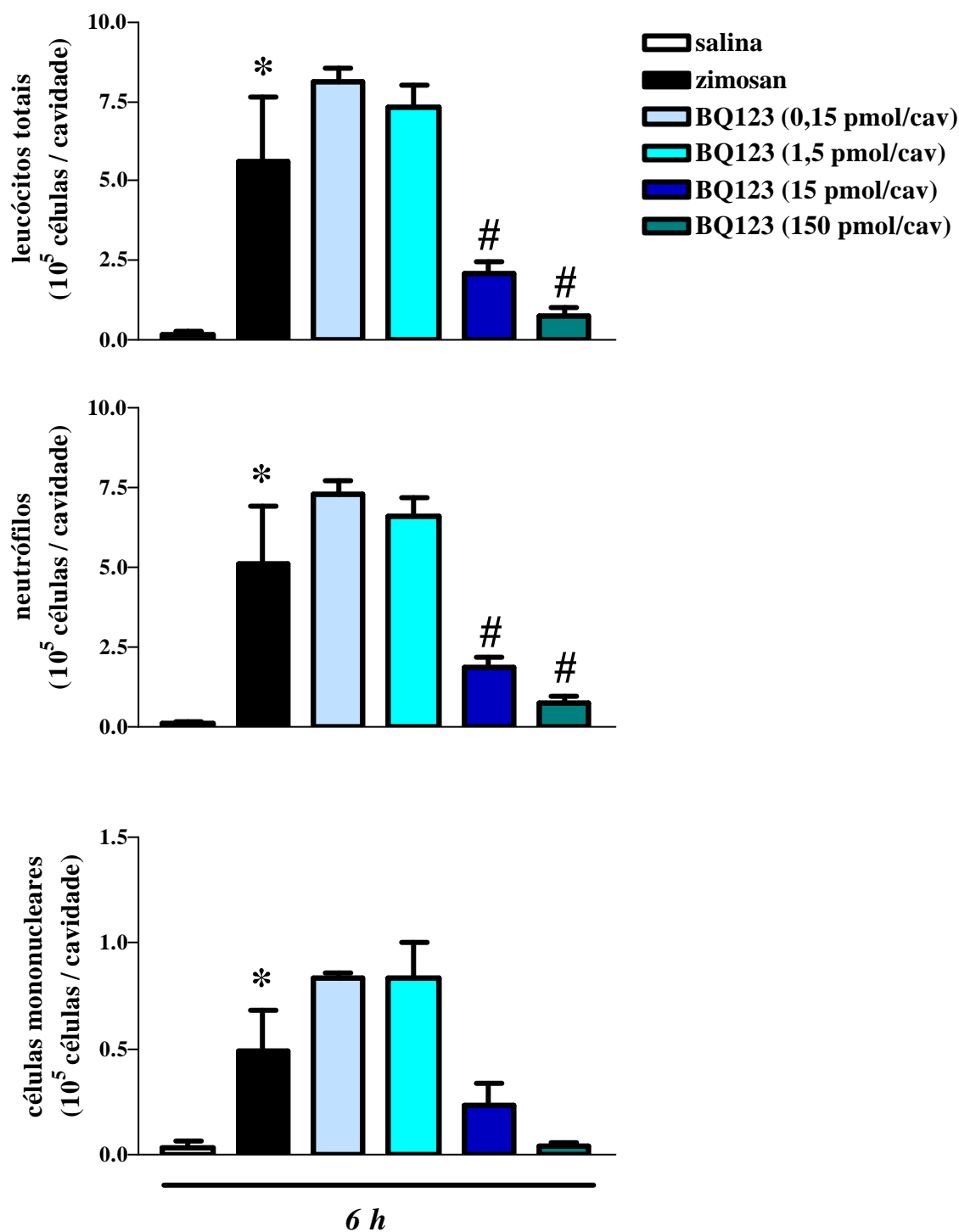
O pré-tratamento com o antagonista peptídico seletivo para o receptor ET<sub>B</sub> (BQ788; i.a.) reduziu significativamente, em todas as doses utilizadas, o influxo de leucócitos para a cavidade articular induzido por zimosan 6 h após o estímulo i.a. (**Figura 4.8.2**). A redução significativa no número de células recolhidas do lavado articular, em todas as doses utilizadas, deveu-se à redução significativa no influxo de neutrófilos para a cavidade articular inflamada, enquanto quaisquer alterações na contagem de células mononucleares não foram observadas 6 h após o pré-tratamento com antagonista de receptor ET<sub>B</sub> durante a artrite induzida por zimosan.

Ambos antagonistas peptídicos foram isoladamente injetados i.a. (BQ123 e BQ788; 15 pmol/cav), na ausência do estímulo i.a. com zimosan, e estes não foram capazes de, em 6h, induzir o acúmulo de leucócitos totais (salina  $0,428 \pm 0,092$  versus BQ123  $0,306 \pm 0,070$  versus BQ788  $0,228 \pm 0,046 \times 10^5$  células/cav, n=5), células mononucleares (salina  $0,171 \pm 0,068$  versus BQ123  $0,074 \pm 0,013$  versus BQ788  $0,073 \pm 0,013 \times 10^5$  células/cav, n=5) e

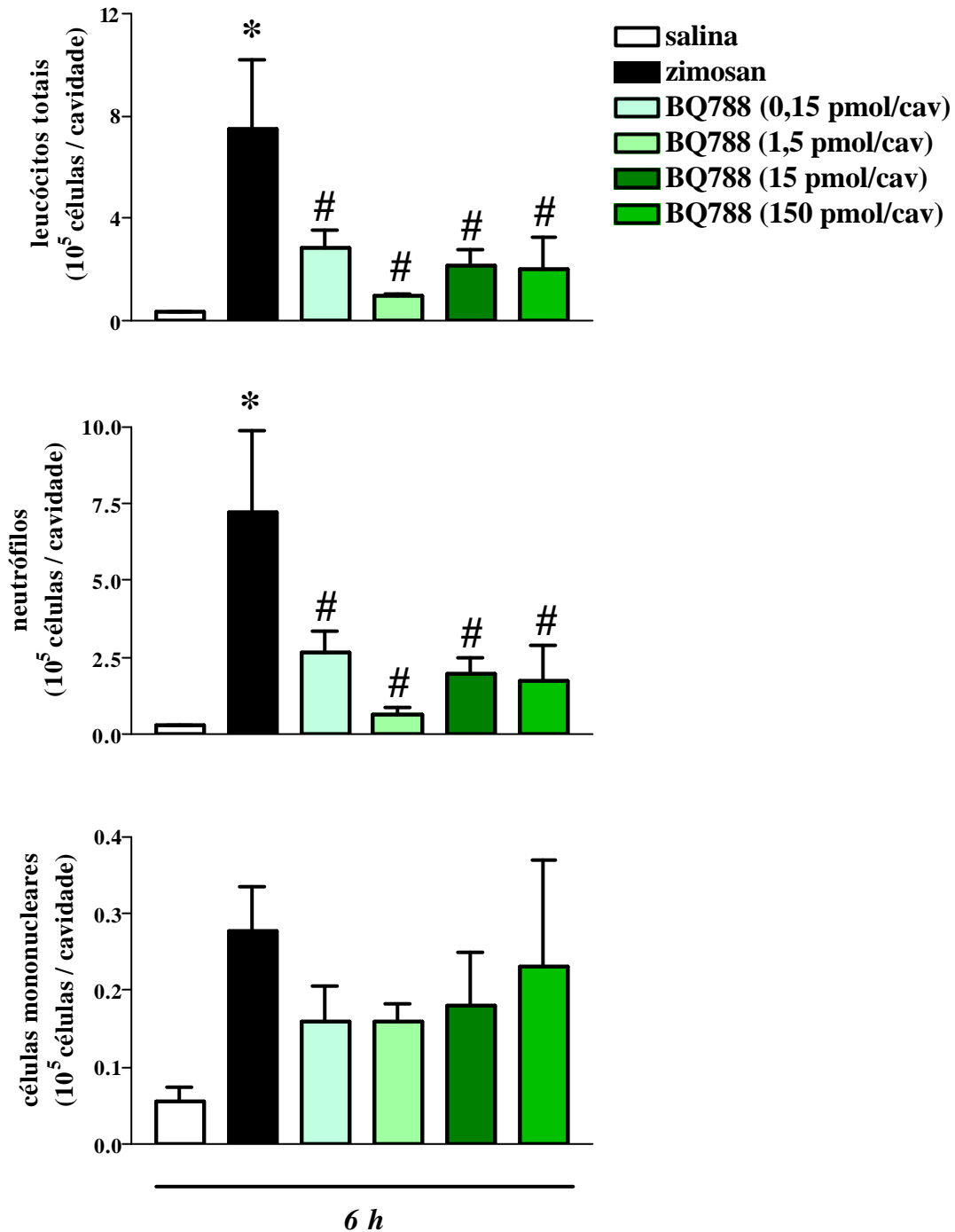
neutrófilos (salina  $0,256 \pm 0,060$  versus BQ123  $0,233 \pm 0,074$  versus BQ788  $0,155 \pm 0,038$   $\times 10^5$  células/cav, n=5) para a cavidade articular.

A injeção i.a. de zimosan (500  $\mu$ g/cavidade) induziu, em 24 h, um intenso acúmulo de leucócitos para a cavidade sinovial (**Figura 4.8.3**). O aumento observado no número de leucócitos totais recolhidos do lavado articular, devido à intensa migração de neutrófilos para a cavidade articular, foi acompanhado por um aumento discreto, porém significativo no influxo de células mononucleares. Os tratamentos *in situ* tanto com o antagonista seletivo do receptor ET<sub>A</sub> da endotelina, BQ123 (15 pmol/cavidade), quanto com o antagonista seletivo do receptor ET<sub>B</sub> da endotelina, BQ788 (15 pmol/cavidade), foram capazes de reduzir significativamente a migração de leucócitos induzida por zimosan em 24 h (65 e 60 %, respectivamente). O efeito observado deveu-se à inibição significativa do acúmulo de neutrófilos induzida por zimosan (73 e 65 %, respectivamente) na cavidade articular. Em contrapartida, a dose utilizada nos tratamentos (15 pmol/cav), em 24 h, não apresentou nenhum efeito sobre o acúmulo de células mononucleares.

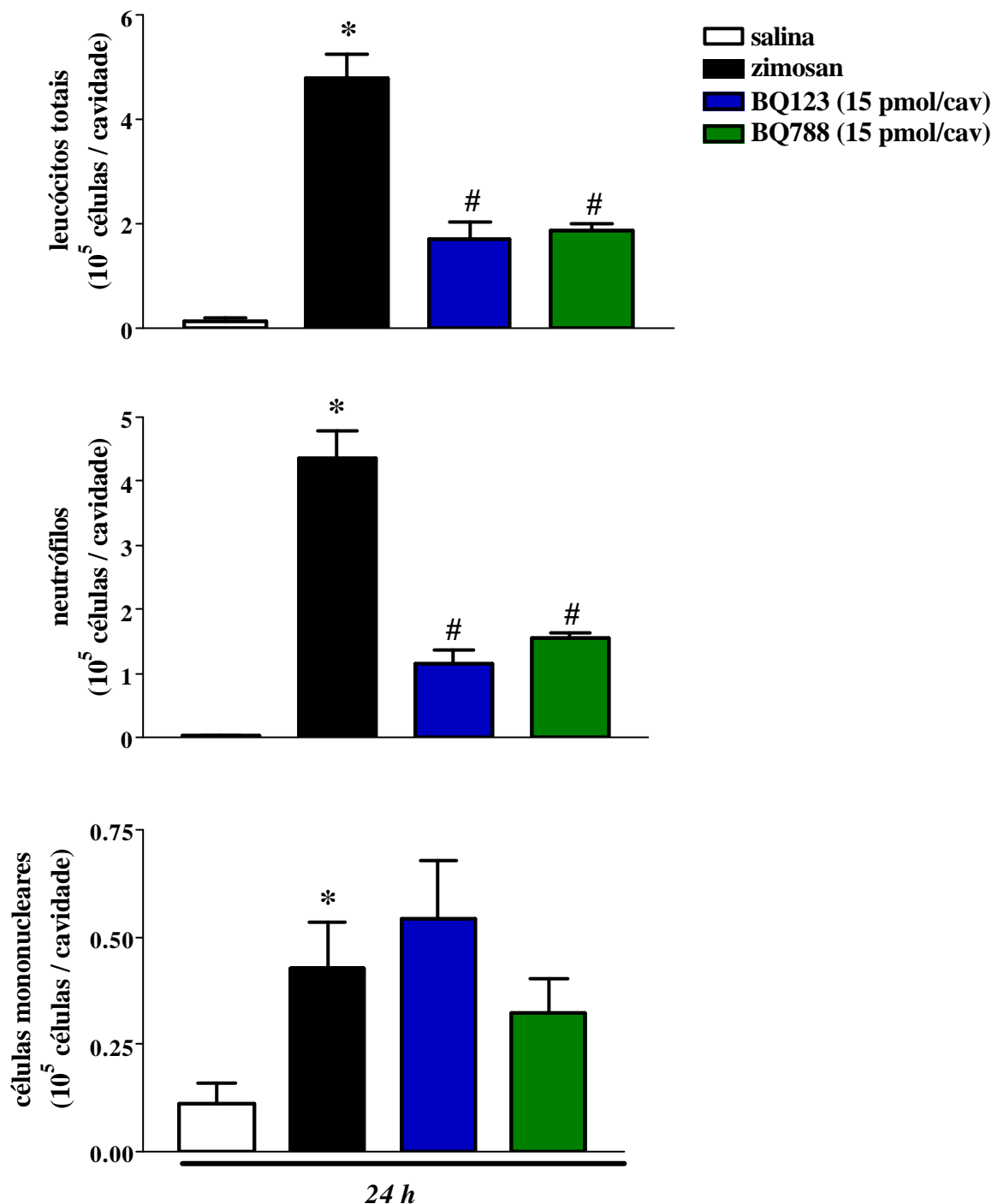
De forma interessante, resultados preliminares obtidos durante este estudo demonstraram que algumas populações celulares foram capazes de expressar ET-1 em decorrência da estimulação local com zimosan. Aliado ao aumento observado, em 6 h, no influxo de células mononucleares para a cavidade articular após o estímulo, a análise por citometria de fluxo de células recolhidas do lavado articular, 6 h após a injeção i.a. com zimosan, demonstrou o aumento significativo no número de células CD14<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup> expressando ET-1 (dados não mostrados). Apesar de preliminares, esses dados sugerem a participação destas populações celulares na produção local de ET-1 e o envolvimento destes peptídeos durante a resposta inflamatória induzida por zimosan.



**Figura 4.8.1** – Efeito dose-resposta do pré-tratamento com o antagonista seletivo do receptor  $ET_A$  (BQ123) sobre o influxo de leucócitos induzido pela injeção i.a. com zimosan (500  $\mu\text{g}/\text{cavidade}$ ) em camundongos C57BL/6. A artrite experimental foi induzida por zimosan (500  $\mu\text{g}/\text{cavidade}$ ; i.a.) 5 minutos após o pré-tratamento *in situ* com BQ123 (0,15-150 pmol/cavidade; i.a.) e as análises foram feitas 6 h após o estímulo com zimosan. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume i.a. de salina estéril. Os valores estão descritos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), cada grupo com 5 animais. As diferenças estatisticamente significativas (teste one-way ANOVA e Student-Newman-Keuls;  $p < 0,05$ ) entre os grupos salina e zimosan foram representados por \*, entre o grupo zimosan e os tratamentos foram representados por #.



**Figura 4.8.2** – Efeito dose-resposta do pré-tratamento com o antagonista seletivo do receptor  $ET_B$  (BQ788) sobre o influxo de leucócitos induzido pela injeção i.a. com zimosan (500  $\mu\text{g}/\text{cavidade}$ ) em camundongos C57BL/6. A artrite experimental foi induzida por zimosan (500  $\mu\text{g}/\text{cavidade}$ ; i.a.) 5 minutos após o pré-tratamento *in situ* com BQ788 (0,15-150 pmol/cavidade; i.a.) e as análises foram feitas 6 h após o estímulo com zimosan. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume i.a. de salina estéril. Os valores estão descritos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), cada grupo com 5 animais. As diferenças estatisticamente significativas (teste one-way ANOVA e Student-Newman-Keuls;  $p < 0,05$ ) entre os grupos salina e zimosan foram representados por \*, entre o grupo zimosan e os tratamentos foram representados por #.

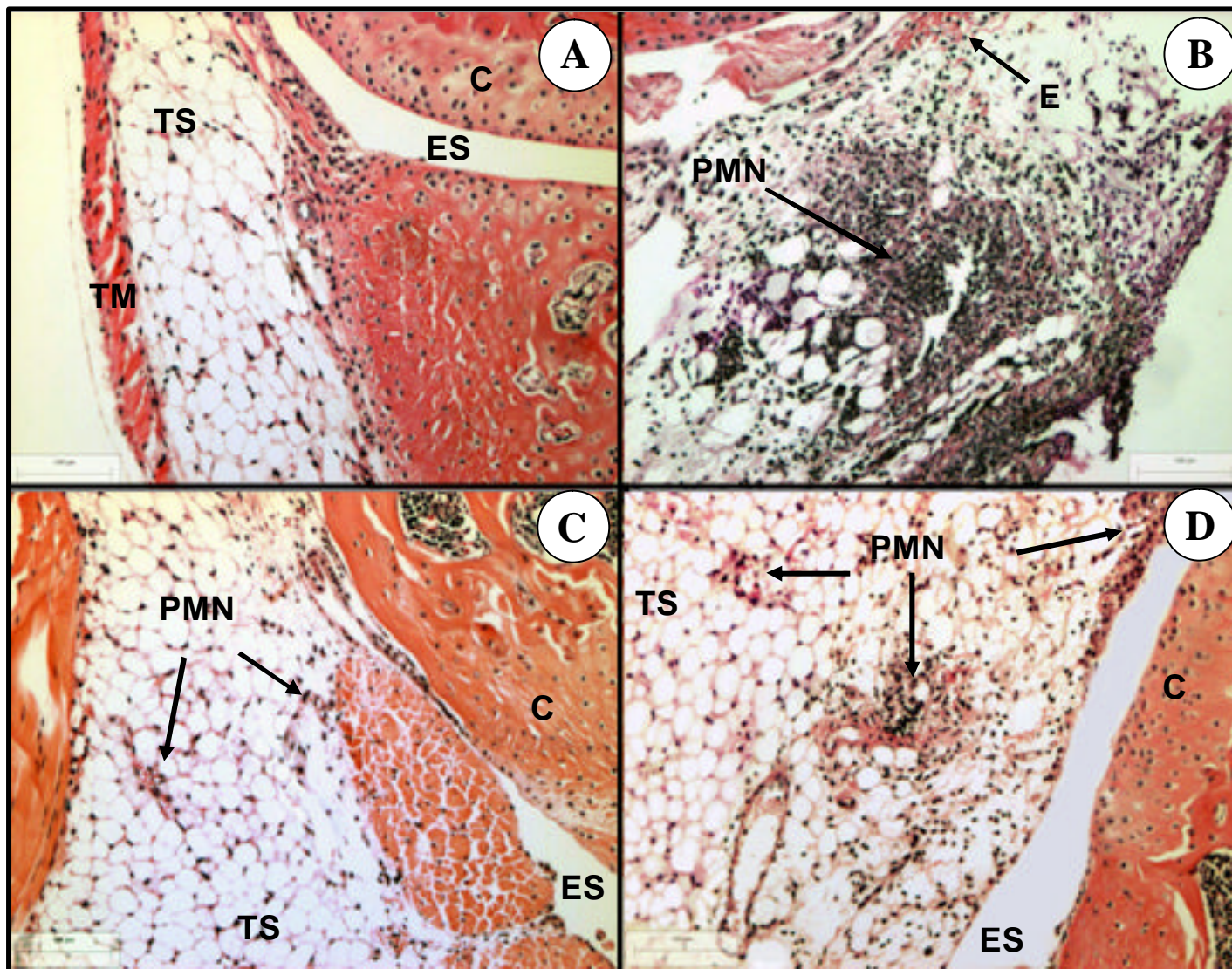


**Figura 4.8.3** – Inibição do influxo de leucócitos para o lavado articular 24 h após o tratamento com antagonistas seletivos de receptores ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub>. A artrite experimental foi induzida por zimosan (500 µg/cavidade; i.a.) 5 minutos após o pré-tratamento *in situ* com BQ123 (15 pmol/cavidade; i.a.) ou BQ788 (15 pmol/cavidade; i.a.) e as análises foram feitas 24 h após o estímulo com zimosan. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume i.a. de salina estéril. Os valores estão descritos como média ± erro padrão da média (EPM) de um grupo de no mínimo 10 animais. As diferenças estatisticamente significativas (teste t-Student; p < 0,05) entre os grupos salina e zimosan foram representados por \*, entre o grupo zimosan e os tratamentos foram representados por #. Esse gráfico é uma figura representativa de sete experimentos independentes.



***4.9 – Análise histológica do efeito dos antagonistas seletivos de receptores de endotelina sobre o influxo de neutrófilos induzido por zimosan para o tecido da articulação fêmuro-tibial.***

Cortes histológicos da articulação fêmuro-tibial de camundongos C57BL/6 foram realizados 24 h após estímulo i.a. com zimosan. Nossos dados demonstraram que a reação inflamatória articular em resposta ao zimosan foi caracterizada pelo intenso influxo de células inflamatórias, em sua grande parte leucócitos polimorfonucleares, que encontravam-se dispersas difusamente no tecido sinovial, especialmente ao redor de vasos sanguíneos (**Figura 4.9(B)**). Aliado a isso podemos observar a presença de vasos sanguíneos congestos e hemorragia local (denotada por eritrócitos). De forma interessante, a resposta local exacerbada ao zimosan levou a um acúmulo importante de células inflamatórias chegando a invadir o tecido muscular (dados não mostrados). Em contrapartida, ao analisarmos os cortes histológicos da articulação fêmuro-tibial dos animais do grupo controle (salina) percebemos que o tecido sinovial é composto por adipócitos, fibroblastos, uma quantidade reduzida de polimorfonucleares e ausência de hemorragia. Como demonstrado na **Figura 4.9**, o pré-tratamento com o antagonista do receptor ET<sub>A</sub> (BQ123; **(C)**) ou ET<sub>B</sub> (BQ788; **(D)**) foi capaz de reduzir o intenso acúmulo de leucócitos polimorfonucleares no tecido sinovial e extinguir a presença de polimorfonucleares no tecido muscular (dados não mostrados). Tomados em conjunto, os dados histológicos do acúmulo de células inflamatórias retidas no tecido sinovial, bem como o influxo de células recolhidas do lavado articular da articulação estimulada com zimosan sustentam a hipótese da participação das endotelinas neste modelo de inflamação articular.

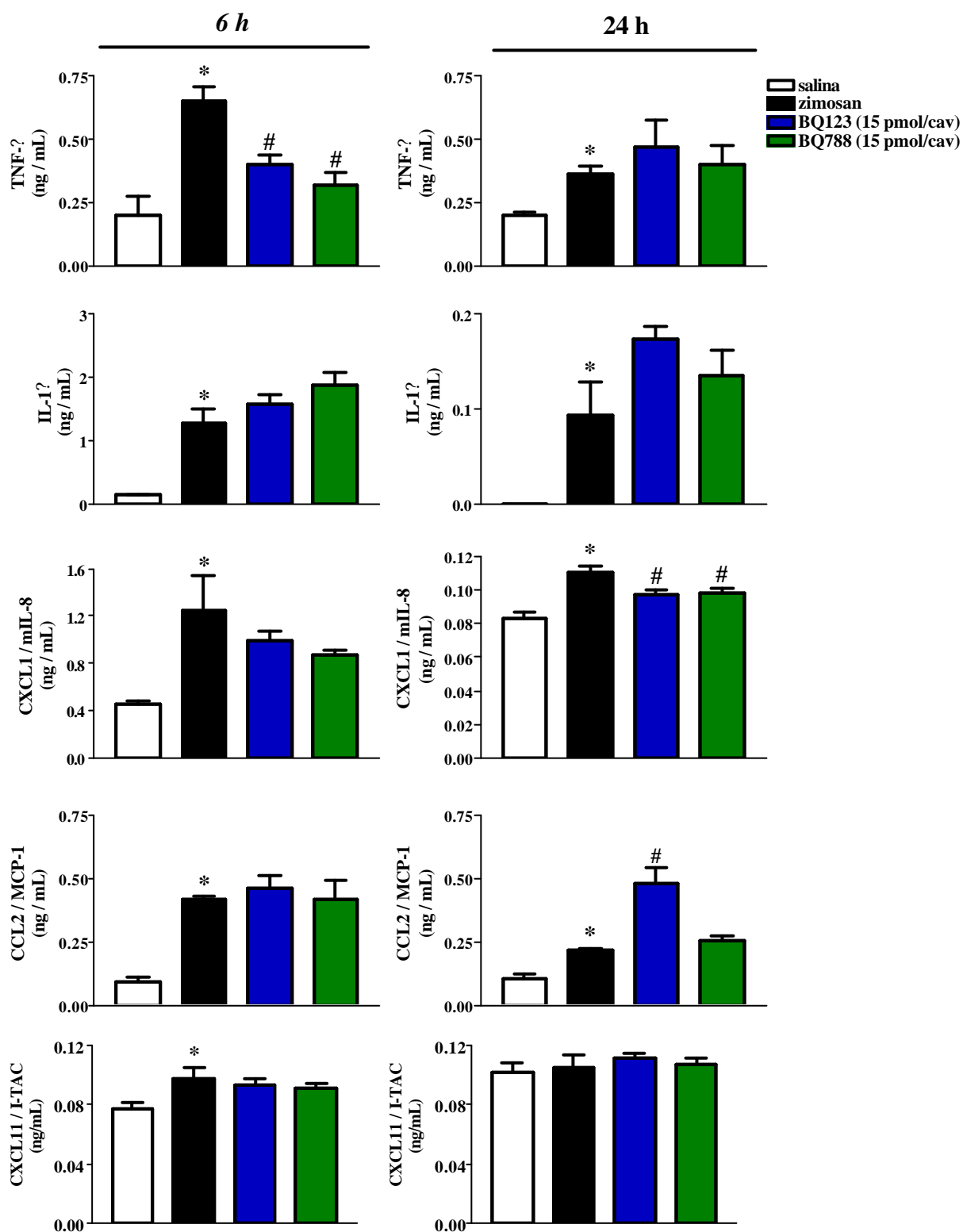


**Figura 4.9** – Histopatologia representativa do efeito do antagonista seletivo do receptor  $ET_A$  (BQ123) ou  $ET_B$  (BQ788) sobre a inflamação articular induzida por zimosan (500  $\mu\text{g}/\text{joelho}$ ). Cortes histológicos longitudinais da articulação fêmuro-tibial de camundongos C57BL/6 injetados i.a. com salina (A) e zimosan (B-D) e analisados após 24 h. (A) apresenta estrutura cartilaginosa normal e preservada com tecido sinovial preservado e livre de células inflamatórias. (B) apresenta intenso infiltrado de células inflamatórias espalhadas difusamente no tecido sinovial, presença de vasos sanguíneos congestionados e hemorragia local. Uma importante redução no infiltrado de células inflamatórias e hemorragia local pode ser observada em camundongos pré-tratados com BQ123 (15 pmol/cavidade) (C) ou BQ788 (15 pmol/cavidade) (D). Aumento de 100X.

*Legenda:* C: cartilagem; E: Eritrócitos; ES: Espaço sinovial; TM: tecido muscular; TS: tecido sinovial; PMN: polimorfonucleares.

#### ***4.10 – Efeito dos antagonistas seletivos de receptores de endotelina sobre a produção de citocinas e quimiocinas em camundongos submetidos ao modelo experimental de artrite induzida por zimosan.***

A observação de que o uso de antagonistas seletivos de receptores de endotelina foi capaz de inibir o acúmulo de leucócitos no lavado articular de camundongos submetidos ao modelo experimental de artrite induzida por zimosan nos levou a investigar a participação das endotelinas endógenas no desenvolvimento da resposta inflamatória local. Logo, os níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) e quimiocinas (CCL2/MCP-1, CXCL1/mIL-8/KC, CXCL11/I-TAC) foram determinados dos extratos da articulação fêmuro-tibial e avaliados por ELISA. Como demonstrado na **Figura 4.10**, os níveis de todas as citocinas e quimiocinas avaliadas encontravam-se aumentados após a estimulação i.a. com zimosan, tanto em 6 quanto em 24 h (exceto CXCL11 em 24 h). Em contrapartida, o bloqueio farmacológico *in situ* dos receptores ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub>, em 6 h, foi capaz de reduzir significativamente a produção local de TNF- $\alpha$ , enquanto quaisquer outras alterações não puderam ser observadas. Em 24 h, porém, os pré-tratamentos foram responsáveis por uma redução significativa dos níveis de CXCL1. De maneira inesperada, o antagonista do receptor ET<sub>A</sub> (BQ123) foi responsável por um aumento significativo nos níveis de CCL2 quando comparado ao grupo zimosan e semelhante efeito não foi observado para o antagonista do receptor ET<sub>B</sub> (BQ788).



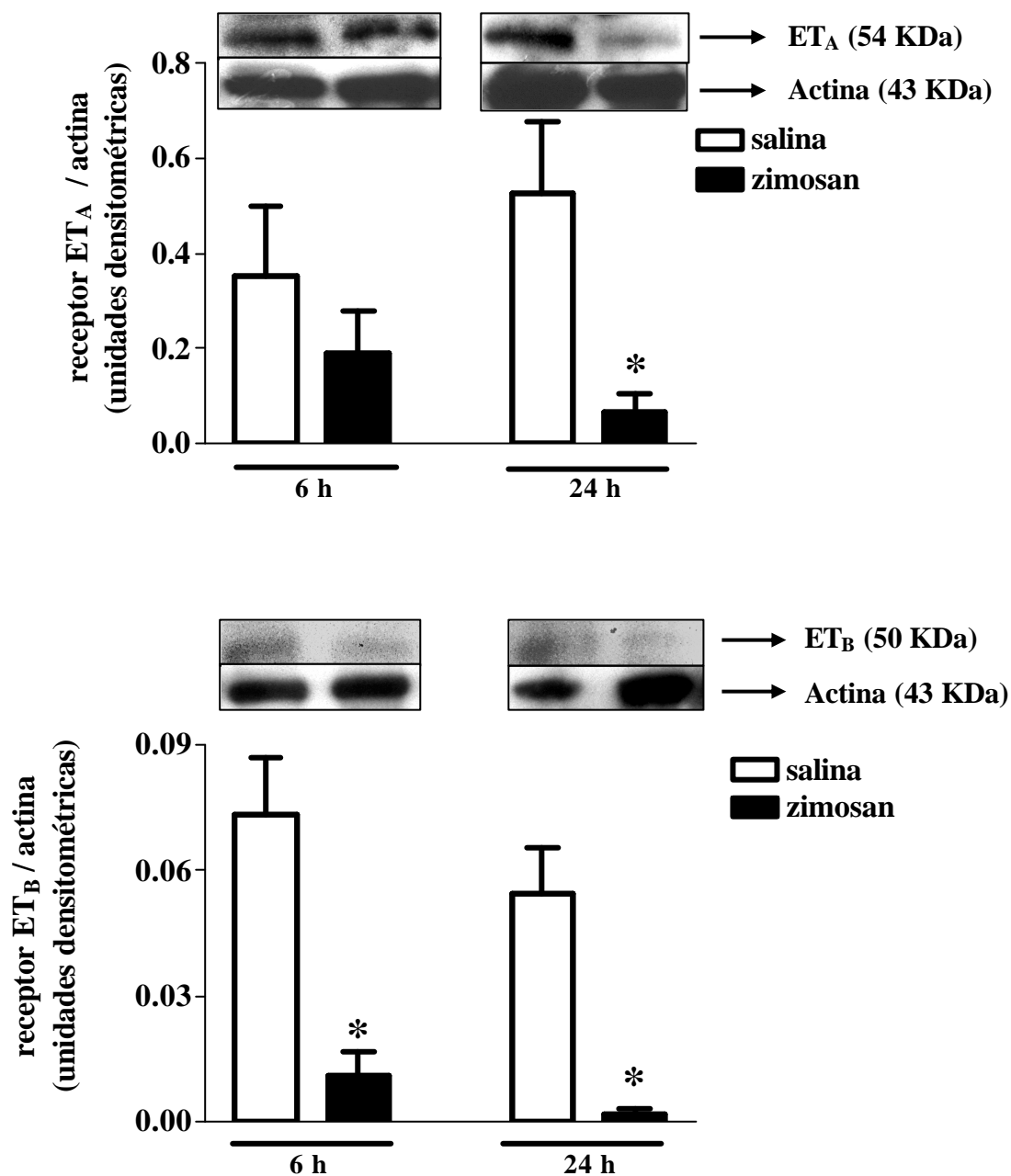
**Figura 4.10** – Efeito do bloqueio seletivo dos receptores  $ET_A$  ou  $ET_B$  (BQ123 e BQ788, respectivamente; 15 pmol/cavidade; i.a.; 5 min antes do estímulo) sobre os níveis de citocinas e quimiocinas do extrato articular de camundongos C57BL/6 submetidos à artrite induzida por zimosan. Os extratos articulares foram obtidos nos tempos de 6 e 24 h e processados para ELISA como descrito na metodologia. Os valores foram descritos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de um grupo de no mínimo 6 animais. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos salina e zimosan estão representados por \*, entre o grupo zimosan e os

grupos tratados estão representados por #. Esse gráfico é uma figura representativa de, no mínimo, dois experimentos independentes.

#### ***4.11 – Análise da expressão dos receptores de endotelina no tecido sinovial após inflamação articular induzida por zimosan.***

É sabido que as endotelinas exercem seus efeitos através da ligação aos seus receptores celulares de superfície. Assim avaliou-se a expressão dos receptores de endotelina no tecido sinovial da articulação fêmuro-tibial encontrava-se alterada durante a inflamação articular induzida por zimosan. Os dados apresentados na **Figura 4.11** demonstraram que a intensidade de expressão dos receptores ET<sub>A</sub> encontrava-se inalterada nas seis primeiras horas após o estímulo i.a. com zimosan, em comparação ao grupo controle (salina). Entretanto, 24 h após o estímulo i.a. com zimosan, e o agravamento do quadro inflamatório (aumento da formação de edema e influxo de leucócitos para a cavidade articular) a intensidade de expressão dos receptores ET<sub>A</sub> encontrava-se significativamente reduzida.

Por outro lado, a intensidade de expressão dos receptores ET<sub>B</sub> encontrava-se significativamente reduzida em comparação aos animais controle tanto em 6 e 24 h após o estímulo i.a. com zimosan.



**Figura 4.11** – Análise da expressão dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> no extrato total do tecido sinovial de camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo experimental de artrite induzida por zimosan. A análise da expressão dos receptores celulares foi avaliada 6 e 24 h após o estímulo com zimosan (500 µg/cav; i.a.) e determinada semi-quantitativamente através da análise densitométrica das bandas utilizando o programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). A intensidade de expressão dos receptores de endotelina (ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub>) para cada amostra foi corrigida utilizando-se a actina como controle interno na mesma membrana. Os valores expressos no gráfico correspondem à média ± erro padrão da média (E.P.M.); as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos salina e zimosan foram representados por \*.  $n = 3$  (pool de 2 animais) por grupo.

## **5 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**

Este estudo demonstra que as endotelinas endógenas participam do desenvolvimento da reação inflamatória articular aguda ao zimosan, uma vez que o uso de antagonistas específicos de seus receptores levou à redução da formação de edema e migração celular bem como a produção de TNF- $\alpha$  e CXCL1. Foi demonstrado também que a ET-1 *per se* ao ser injetada na cavidade articular é capaz de gerar uma resposta inflamatória caracterizada pelo aumento significativo do influxo de leucócitos, predominantemente neutrófilos, acompanhado da formação de edema articular. Nossos dados indicam que os efeitos observados não dependem exclusivamente de um único tipo de receptor de endotelina, pois o bloqueio farmacológico do receptor ET<sub>A</sub> após a indução do modelo de artrite induzida por zimosan gera inibição da migração celular e formação de edema similar ao bloqueio do receptor ET<sub>B</sub>.

O zimosan é um polissacarídeo da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, que é composto primariamente por resíduos de glucana e manana. Em estudos *in vitro*, tem sido um estímulo inflamatório bastante utilizado no estudo da resposta imune inata, devido à sua capacidade de estimular a produção de citocinas inflamatórias e de ativar o sistema complemento na ausência de imunoglobulinas. A resposta desencadeada pelo zimosan está relacionada à sua fagocitose, um processo mediado pelo seu reconhecimento através do TLR (do inglês, *Toll-like receptor*) -2 em colaboração com TLR6 e do CD14, na membrana de monócitos e macrófagos principalmente (Underhill, 2003). O seu reconhecimento por estes tipos celulares leva, dentre outros aspectos, à ativação celular, liberação de hidrolases lisossomais, formação de espécies reativas de oxigênio e produção de citocinas (Werling *et al.*, 2003).

Em 1977, Keystone *et al.* descreveram um modelo murino de artrite induzido por zimosan, que até hoje é utilizado como uma importante ferramenta na caracterização da resposta inflamatória articular. Neste caso, o zimosan é capaz de induzir uma reação inflamatória articular associada a um aumento significativo da permeabilidade vascular, migração celular (Penido *et al.*, 2006; Gegout *et al.*, 1995; Gegout *et al.*, 1994) aliado a distúrbios de locomoção e dor (Rocha *et al.*, 1999; da Rocha *et al.*, 2004), que culmina progressivamente em sinovite erosiva grave que se assemelha bastante ao quadro de degeneração encontrado em pacientes com AR (Gegout *et al.*, 1994). Neste estudo utilizou-se o modelo murino de artrite induzida por zimosan como ferramenta para estudar o efeito das endotelinas endógenas sobre parâmetros característicos do processo inflamatório articular, como: a formação de edema articular, influxo celular e produção de mediadores inflamatórios.



A formação de edema articular foi um dos parâmetros avaliados durante este estudo. Em artigo recentemente publicado por nosso grupo (Penido *et al.*, 2006), demonstramos que a injeção i.a. de zimosan (500 µg/cavidade) foi capaz de promover o aumento significativo na formação de edema nas 6 primeiras horas, atingindo o auge da reação em 24 h e reduzindo progressivamente, permanecendo acima dos níveis dos controles (salina), até o vigésimo dia. Esse aumento da espessura da articulação fêmuro-tibial foi caracterizado pelo extravasamento protéico no interior do espaço articular, mas os mecanismos responsáveis por este fenômeno neste modelo experimental ainda precisam ser esclarecidos. Tem sido descrito que diversos mediadores inflamatórios estão envolvidos na formação de edema articular durante processos inflamatórios, dentre eles destacam-se os mediadores lipídicos eicosanóides e o fator de ativação plaquetário (PAF) (revisto por Sharma and Buchanan, 1994). Dados da literatura suportam a hipótese que as ETs poderiam estar modulando a geração de mediadores edematogênicos no nosso modelo (Gegout *et al.*, 1995). No presente trabalho, observou-se que o bloqueio farmacológico com antagonistas do receptor ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> (BQ123 ou BQ788, respectivamente; 15 pmol/joelho) 6 e 24 h após a indução da artrite por zimosan foi capaz de reduzir a formação de edema local. Já foi demonstrado que macrófagos peritoneais estimulados com ET-1 exógena aumentam a expressão da enzima ciclooxigenase-2, com conseqüente aumento na produção de PGE<sub>2</sub> por este tipo celular (Shimada *et al.*, 1998). De acordo com este trabalho, o bloqueio farmacológico do receptor ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> (BQ123 e BQ788, respectivamente), após estimulação *in vitro* com ET-1, foi capaz de reduzir a expressão de COX-2 e PGE<sub>2</sub>, sendo o efeito mais pronunciado utilizando o antagonista do receptor ET<sub>B</sub>. A participação destes mediadores lipídicos no modelo de artrite induzida por zimosan, já foi demonstrada por Gegout *et al.* (1995). Segundo os autores, o tratamento com indometacina, um antiinflamatório potente não seletivo que inibe a enzima ciclooxigenase (COX) impedindo a produção de prostaglandinas e outros autacóides, foi eficiente na redução da febre e da formação de edema articular induzida pelo zimosan. O tratamento com dexametasona apresentou uma redução mais significativa do edema articular e da febre, quando comparado ao grupo indometacina, um efeito provavelmente relacionado, dentre outros, à inibição da ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> e da COX-2 que conseqüentemente leva à redução da produção de leucotrienos e prostaglandinas. Esses dados reforçam a idéia de que, apesar de não ser um processo exclusivamente dependente destes mediadores lipídicos, de certa forma a redução da formação de edema articular obtida com o uso de antagonistas dos receptores de endotelina (BQ123 ou BQ788) pode estar, direta ou indiretamente, envolvido com a modulação da produção destes mediadores e precisa ser melhor investigado. Até o

momento, nós confirmamos a participação do receptor ET<sub>B</sub> *in vivo* na migração celular e formação de edema na cavidade articular através da injeção i.a. do agonista deste receptor ET<sub>B</sub>, a sarafotoxina S6c. No entanto, é importante esclarecer ainda quais populações celulares presentes no tecido sinovial articular modulam a produção de mediadores inflamatórios diretamente associados à formação de edema, qual receptor de endotelina está envolvido e por qual via a produção destes mediadores é deflagrada.

Outro parâmetro importante avaliado neste estudo relaciona-se ao influxo celular para a cavidade articular inflamada. Tem sido descrito que os neutrófilos são células que participam da patogênese das lesões teciduais na artrite, e são encontrados predominantemente nos exudatos sinoviais de diversas artropatias inflamatórias, incluindo gota, doença de Reiter e AR (Harris *et al.*, 1990). Os neutrófilos não parecem estar envolvidos na perpetuação da sinovite crônica, mas são importantes fontes de substâncias que levam à degradação de cartilagem e reabsorção óssea, incluindo: espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, enzimas lisossomais e metaloproteases (Hampton *et al.*, 1998). O recrutamento dessas células para o sítio inflamatório na AR é mediado por substâncias quimioatraentes, como quimiocinas, o fator C5a e o leucotrieno B<sub>4</sub>. Atualmente, as estratégias terapêuticas para o tratamento de artropatias, como a AR, buscam reduzir o acúmulo e/ou ativação dessas células nas articulações inflamadas. Nossos dados demonstraram que durante a fase aguda da resposta inflamatória articular ao zimosan, 6 e 24 h após o estímulo i.a., houve um aumento significativo no acúmulo total de leucócitos recolhidos do lavado articular e retidos no tecido sinovial inflamado, e esta reação foi em grande parte devido ao intenso acúmulo de neutrófilos, acompanhada de um aumento significativo no acúmulo de células mononucleares. De forma interessante, os animais submetidos ao tratamento com antagonistas específicos tanto do receptor ET<sub>A</sub> ou receptor ET<sub>B</sub> no momento da injeção i.a. com zimosan apresentaram uma redução significativa na contagem de leucócitos totais durante a fase aguda da reação inflamatória (6 e 24 h), devido à redução expressiva no acúmulo de neutrófilos para a cavidade articular, enquanto nenhum efeito foi observado sobre o acúmulo de células mononucleares. De fato, estes resultados ainda não nos permitem inferir sobre qualquer possível efeito direto das endotelinas sobre o recrutamento e a ativação específica de neutrófilos, uma vez que estes peptídeos podem estar atuando indiretamente sobre outras populações celulares e, de certa forma, inibindo a produção de substâncias quimioatraentes responsáveis pelo recrutamento e ativação de neutrófilos para o sítio inflamatório. No entanto, dados da literatura demonstraram que as ETs são capazes de afetar diretamente algumas funções dos neutrófilos, dentre elas a migração celular (Elferink & Koster, 1994; Elferink &

Koster, 1995; Elferink & Koster, 1996a). Segundo estes autores, as diferentes isoformas de ET atuam promovendo a migração celular *in vitro* de neutrófilos de forma altamente dependente de concentração: baixas concentrações de ET estimulariam a migração celular, enquanto altas concentrações teriam efeito inibitório. O efeito estimulatório predominante descrito para ET-1 foi quimiocinético, em contrapartida aos efeitos quimiotáticos observados para as outras 2 isoformas de endotelina (ET-2 e -3). A ativação específica da migração celular via receptor ET<sub>B</sub>, utilizando a sarafotoxina S6c na presença do antagonista do receptor ET<sub>A</sub> (BQ123), promoveu o estímulo à migração celular (Elferink & Koster, 1996b) mas em níveis menores quando comparado ao estímulo fornecido pelas endotelinas (Elferink & Koster, 1994; Elferink & Koster, 1995). Esses resultados indicam que o efeito estimulatório da S6c ocorre especificamente via ET<sub>B</sub> e que as endotelinas parecem utilizar os dois receptores, e que a maior parte dos efeitos ocorre preferencialmente via receptor ET<sub>A</sub>.

Ainda sobre o envolvimento das endotelinas endógenas na ativação de neutrófilos, recentemente Toffoli *et al.* (2007), utilizando um sistema de co-cultura *in vitro*, demonstraram que a ativação prévia da monocamada de células endoteliais com um estímulo inflamatório (LPS ou TNF- $\alpha$ ) foi capaz de promover a desgranulação e ativação celular de neutrófilos quando estes, em etapa posterior, foram plaqueados sobre as células endoteliais previamente ativadas. Em outro experimento, quando neutrófilos humanos foram adicionados à monocamada de células endoteliais já ativadas com LPS e pré-tratadas ou com um inibidor da enzima conversora de endotelina (ECE) ou com o antagonista do receptor ET<sub>A</sub> (BQ123), uma intensa redução na ativação e desgranulação de neutrófilos foram observadas. Com esses dados, os autores sugerem que os neutrófilos podem ser ativados pelos produtos liberados pelas células endoteliais e, mais especificamente, a produção de ET ou a expressão do receptor ET<sub>A</sub> são responsáveis por esse fenômeno. Em paralelo, eles demonstraram que a incubação de neutrófilos humanos *in vitro* com este peptídeo causou um aumento significativo na ativação e desgranulação deste tipo celular. Em suma, esses dados suportam o efeito pró-inflamatório desses peptídeos, haja visto que a ET-1 atua diretamente sobre neutrófilos induzindo, via receptor ET<sub>A</sub>, a ativação e a desgranulação desta população celular.

Corroborando, dados *in vitro* descritos por outros autores anteriormente, neste estudo ficou demonstrado que a injeção i.a. de ET-1 exógena *in vivo* induziu significativamente a contagem de neutrófilos recolhidos do lavado articular 6 h após o estímulo. Esses dados sugerem que as endotelinas poderiam estar ou induzindo diretamente o recrutamento deste tipo celular ou, de forma indireta, induzindo a produção e secreção de mediadores inflamatórios por outros tipos celulares que seriam os responsáveis por este efeito. De forma

interessante, a análise temporal do influxo de leucócitos para a cavidade articular estimulada após a injeção de ET-1 demonstrou que houve um aumento significativo no acúmulo de leucócitos apenas nas 6 primeiras horas não sendo observadas quaisquer alterações significativas no influxo celular em tempos tardios (12, 24 e 36 h após o estímulo). Isto nos leva a acreditar que existam mecanismos homeostáticos locais que seriam responsáveis pela rápida remoção do excesso de ET (degradação ou internalização de receptores), na tentativa de reduzir a inflamação local desencadeada pelo peptídeo. Suportando a hipótese de degradação do excesso de ET, já foi demonstrado que altas concentrações extracelulares de ET-1 são altamente tóxicas e induzem os mastócitos locais a liberarem seletivamente o conteúdo de seus grânulos, lançando no meio extracelular uma enzima que é responsável pela homeostase tecidual, a quimase, que leva à clivagem do excesso de ET-1 (Maurer *et al.*, 2004). Estudos posteriores envolvendo a dosagem destes peptídeos necessitam ser conduzidos posteriormente para comprovarmos esta hipótese.

De forma bastante interessante, durante a artrite induzida por zimosan nós observamos a redução significativa na intensidade de expressão dos receptores de endotelina. Digno de nota foi a redução significativa observada em 6 e 24 h na intensidade de expressão dos receptores ET<sub>B</sub> presentes no extrato total de tecido sinovial de camundongos submetidos à artrite induzida por zimosan. Esse dado, aliado aos dados preliminares de citometria de fluxo em que houve o aumento significativo no número de células CD14<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup> expressando ET-1 6 h após a injeção i.a. com zimosan (dados não mostrados), nos sugerem experimentalmente a presença da ET-1 na resposta inflamatória aguda articular e que tanto linfócitos quanto macrófagos parecem ser responsáveis pela produção local do peptídeo. Resta saber se outras populações celulares são também responsáveis pela produção local de endotelina, sobre quais tipos celulares estes peptídeos estão exercendo seus efeitos biológicos, além da cinética da produção local deste peptídeo. Em conjunto, estes dados sugerem que o aumento nos níveis de ET-1 na cavidade articular está associado ao desenvolvimento da resposta inflamatória articular somado à internalização dos receptores de endotelina (ET<sub>B</sub> e ET<sub>A</sub>), em decorrência do aumento local na produção de ET-1. Estudos acerca dos níveis de produção de ET-1 durante a artrite induzida por zimosan necessitam ser executados para confirmação destas hipóteses.

Um dos mecanismos responsáveis pela mobilização de leucócitos para o sítio inflamatório está associado à secreção de mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos) que atuam diretamente no recrutamento de populações celulares

específicas para o local afetado. Em nosso modelo experimental, nós demonstramos que a resposta inflamatória aguda articular ao zimosan, em 6 e 24 h, levou a um aumento importante de diversas citocinas pró-inflamatórias, dentre elas, duas importantes citocinas associadas à AR em seres humanos: o TNF-a e a IL-1 $\beta$ .

O TNF-a é um importante mediador do processo inflamatório articular (Joosten *et al.*, 1999) pois é capaz de regular os níveis de quimiocinas e a migração de leucócitos para as articulações de pacientes com AR (Taylor *et al.*, 2000). Na artrite experimental, o TNF-a é responsável pela inflamação articular aguda e a migração celular para o tecido sinovial (Van den Berg *et al.*, 1999). Uma vez que o TNF-a possui um papel fundamental no surgimento dos sintomas clínicos e da inflamação articular, o bloqueio desta citocina pode resultar num efeito anti-inflamatório. Nós demonstramos que o tratamento com antagonistas dos receptores ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> foi responsável por um decréscimo significativo na produção de TNF-a, apenas nas 6 primeiras horas após a inflamação articular induzida por zimosan. Vinte e quatro horas após o estímulo, os níveis de TNF-a dos animais tratados com antagonistas dos receptores de endotelina voltaram aos valores obtidos para animais controle injetados com zimosan. A princípio, a redução observada na produção de TNF-a na fase aguda da inflamação em decorrência do bloqueio dos receptores de endotelina parece estar associada à redução do edema articular e à migração celular. No entanto, para suportar esta hipótese, estudos sobre quais células estariam sendo responsáveis pela produção local (articular) de TNF-a, bem como quais populações celulares na cavidade articular estariam sendo diretamente afetadas pelo bloqueio dos receptores de endotelina, ainda necessitam ser conduzidos. Dados obtidos em nosso laboratório (Sampaio *et al.*, 2004) demonstraram, no modelo de pleurisia induzida por LPS, que o tratamento com o antagonista do receptor ET<sub>A</sub> (BQ123) também foi capaz de, em fases iniciais, inibir a produção de TNF-a e IL-6. Estes dados demonstraram que, a princípio, a redução inicial na produção de TNF-a pareceu estar envolvida no desenvolvimento da resposta inflamatória, não sendo um fenômeno restrito ao sítio inflamatório estudado.

A patogênese da erosão articular pode diferir da inflamação sinovial articular. Tem sido descrito que a inflamação não está necessariamente ligada à progressão da destruição articular na AR. A erosão articular é capaz de continuar a despeito da melhora dos sintomas clínicos, sendo acelerado na presença da sinovite contínua prolongada (Mulherin *et al.*, 1996). A IL-1 medeia o acúmulo celular sustentado e o dano erosivo da cartilagem (Van den Berg *et al.*, 1999), logo, nos últimos anos estudos vêm demonstrando que a destruição da cartilagem seria um processo dependente desta citocina na articulação (Joosten *et al.*, 1999). Diversas

evidências apontam para o papel indispensável da IL-1 $\beta$  no modelo de artrite induzida por colágeno, com um papel marcante na degradação de cartilagem e na erosão óssea. Os dados obtidos no presente estudo demonstraram que o bloqueio farmacológico específico dos receptores de endotelina não foram capazes de alterar os níveis de IL-1 $\beta$  6 e 24 h após a indução da resposta inflamatória articular por zimosan. Por outro lado, nós observamos uma redução significativa dos parâmetros inflamatórios (migração celular e formação de edema). Esses dados sugerem que esta citocina não parece estar comprometida com o influxo de células inflamatórias para a cavidade articular. No entanto, estudos histológicos para avaliação do comprometimento da cartilagem desses animais ainda precisam ser conduzidos para confirmação da hipótese de que esta citocina participa mais da degradação do tecido cartilaginoso, do que no influxo de células para o sítio inflamatório.

Durante a resposta inflamatória articular, a produção de quimiocinas e a expressão de seus receptores parece ser um dos principais processos responsáveis pelo contínuo recrutamento de diversos tipos celulares para a cavidade sinovial. Em alguns casos, como para CXCL1/mIL-8/KC, algumas quimiocinas são secretadas somente após estímulo celular promovido através de citocinas ou produtos derivados de microorganismos, como ligantes de TLR, e dessa forma desempenham um papel crucial na inflamação (Moser *et al.*, 2004). No caso particular do tecido sinovial inflamado, fibroblastos e macrófagos despontam como as principais células envolvidas na produção de quimiocinas (Ritchlin, 2000). Até o momento, diversas quimiocinas presentes no tecido sinovial durante a inflamação articular já foram descritas (Shadidi *et al.*, 2002). Nós demonstramos que, 6 e 24 h após a injeção i.a. de zimosan, houve um acréscimo significativo na produção de quimiocinas recolhidas do sobrenadante dos extratos das articulações fêmuro-tibias, tais como: CXCL1, CCL2/MCP-1 e CXCL11/I-TAC (esta última apenas na 6 h). Não se sabe ainda quais populações estão envolvidas na produção destes mediadores, mas nossos resultados demonstraram que o bloqueio farmacológico dos receptores de endotelina na cavidade articular levou à redução nos níveis de CXCL1 24 h após a resposta inflamatória induzida por zimosan. De forma interessante, nós observamos que nas 6 primeiras horas após o estímulo inflamatório i.a. o tratamento com os antagonistas de receptor não foi capaz de reduzir os níveis locais desta quimiocina. Em contrapartida, a redução na migração e no acúmulo tecidual de neutrófilos foram observados. Estes dados sugerem a participação de um outro mediador que, em tempos mais iniciais, pode atuar em paralelo à CXCL1, sendo o responsável pelo acúmulo deste tipo celular na cavidade articular estimulada com zimosan. De alguma forma o bloqueio dos

receptores de endotelina poderia estar levando, direta ou indiretamente, à redução de um segundo mediador que então seria responsável pelo recrutamento de neutrófilos na fase aguda da reação. Um possível candidato, não analisado neste estudo, que seria capaz de responder pelo recrutamento de neutrófilos na fase aguda da reação ao zimosan é o leucotrieno B<sub>4</sub>. Este mediador lipídico derivado da conversão enzimática do ácido araquidônico, pela enzima 5-lipoxigenase, é primariamente produzido por leucócitos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos, e funciona como um potente estímulo quimiotático para leucócitos polimorfonucleares (Kuwabara *et al.*, 2000). Estudos envolvendo o bloqueio dos receptores de ET e a produção deste mediador em fases iniciais da artrite induzida por zimosan precisam ser conduzidos na tentativa de inferir a participação das Ets no recrutamento de leucócitos para a cavidade articular.

O aumento dos níveis de CCL2 no líquido sinovial de pacientes com AR já foi demonstrado, assim como seu papel no recrutamento de células mononucleares para a articulação inflamada (Koch *et al.*, 1992). Estes autores ainda demonstraram que os macrófagos do tecido sinovial são os principais responsáveis pela produção desta quimiocina. No presente estudo, o aumento no recrutamento de monócitos/macrófagos induzida por zimosan pode ser responsável pelo subsequente aumento no recrutamento celular e consequente produção de mediadores inflamatórios. Nós observamos ainda que o bloqueio dos receptores de endotelina nas seis primeiras horas após o estímulo i.a. com zimosan não foi capaz de alterar os níveis de produção desta quimiocina no sobrenadante do macerado da articulação fêmuro-tibial. Em contrapartida, em 24 h o bloqueio do receptor ET<sub>A</sub> promoveu um acréscimo significativo nos níveis de CCL2, enquanto nenhuma alteração foi observada quando bloqueamos o receptor ET<sub>B</sub> da endotelina. Estes resultados indicam que, em tempos mais tardios, a produção de CCL2 e provavelmente, de forma indireta, o recrutamento de células mononucleares pode estar associado à sinalização mediada pelos receptores ET<sub>A</sub>, mas esta hipótese ainda precisa ser melhor investigada. Neste estudo, nós apenas evidenciamos que o aumento desta quimiocina, em 6 e 24 h após a injeção i.a. de zimosan, foi acompanhado do aumento significativo no acúmulo de células mononucleares para a articulação inflamada. A quimiocina CXCL11 já foi encontrada na cavidade sinovial (Patel *et al.*, 2001) e estudos *in vitro* demonstraram que neutrófilos expressam I-TAC após estimulação com IFN- $\alpha$  em combinação com TNF- $\alpha$  (Gasperini *et al.*, 1999). A CXCL11 tem sido descrita por seu papel no recrutamento de células NK e linfócitos T para a cavidade sinovial inflamada (Shadidi *et al.*, 2001), e a produção desta quimiocina por neutrófilos pode contribuir para a evolução e progressão da resposta inflamatória. Nossos dados demonstraram que, nas primeiras 6 h após

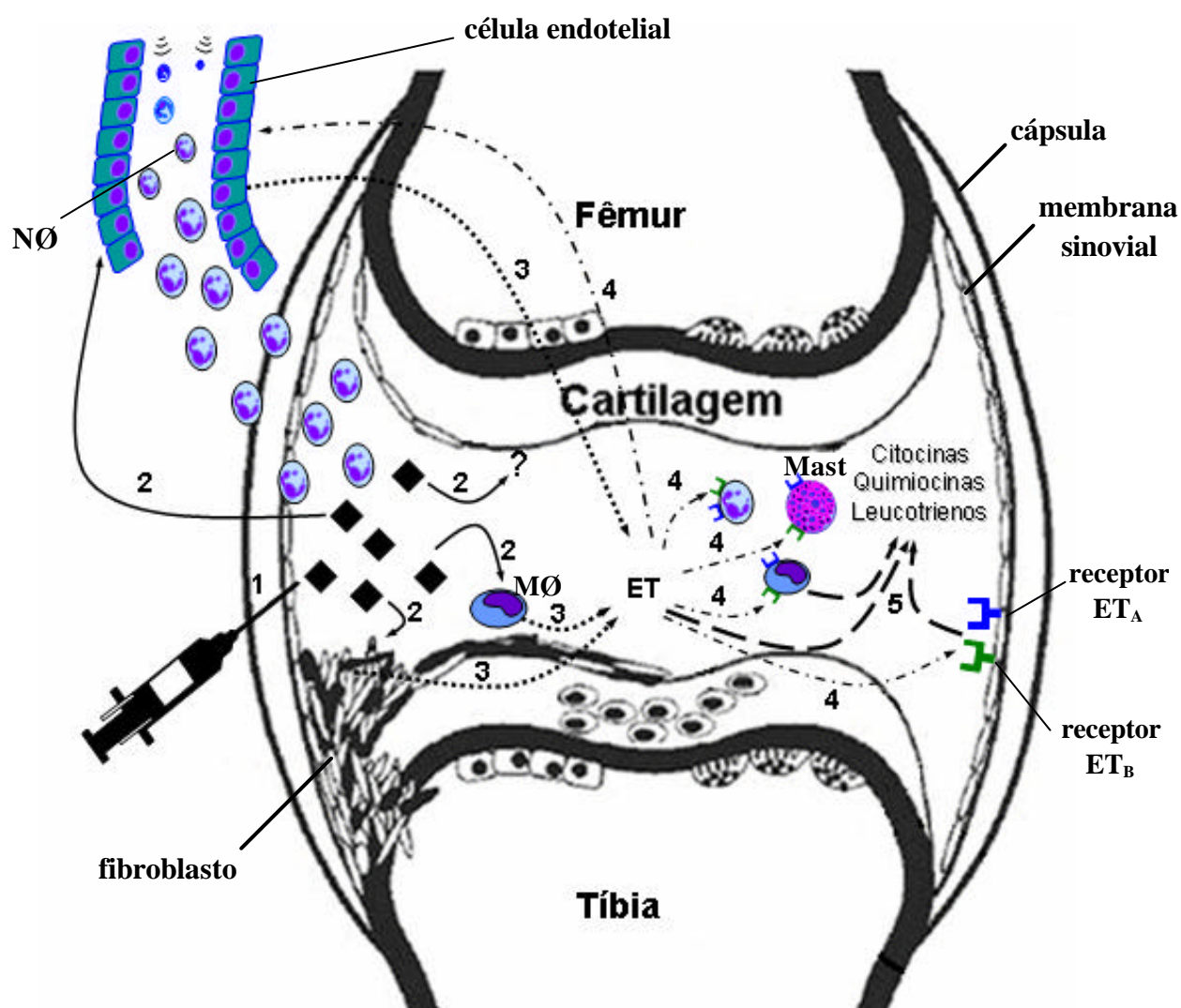
o estímulo i.a. com zimosan, os níveis de CXCL11 encontravam-se aumentados em comparação aos controles (salina), o que não foi observado em tempos mais tardios (24 h). O tratamento com os antagonistas de receptor de endotelina não surtiram quaisquer efeitos sobre a produção deste mediador. Dessa forma, a contribuição para o recrutamento de linfócitos induzido pela produção de CXCL11 não parece ser relevante no modelo estudado, e os receptores de endotelina não parecem estar envolvidos na regulação da produção deste mediador. A princípio, a quimiocina CCL2 parece responder pelo acúmulo de células mononucleares tanto em 6 quanto em 24 h após o estímulo com zimosan, enquanto o envolvimento da CXCL11 nas fases iniciais parece não ser tão relevante, talvez atuando de forma mais específica em tempos mais tardios no decorrer da transição da resposta inata para adquirida, mas estes dados ainda necessitam confirmação experimental.

Além dos mediadores inflamatórios conhecidos (citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos), atualmente as endotelinas são peptídeos reconhecidos pelas suas atividades pró-inflamatórias, contribuindo para a exacerbação do processo inflamatório, por modular a expressão de moléculas de adesão de células endoteliais, promover o recrutamento e a ativação de outros tipos celulares, dentre outros (revisto por Kedzierski & Yanagisawa, 2001). A ET-1, a isoforma predominante e de maior significância encontrada no plasma e nos tecidos em seres humanos, já foi descrita pelos seus efeitos pró-inflamatórios sobre leucócitos. Em nosso estudo, além de comprovarmos os efeitos anti-inflamatórios causados pelo bloqueio dos receptores de endotelina, nós comprovamos a participação deste peptídeo na inflamação articular aguda induzida por zimosan.



## **6 – CONCLUSÃO**

Tomados em conjunto, nossos dados demonstraram que a ET-1 exerce um efeito pró-inflamatório na cavidade articular, promovendo tanto a migração de neutrófilos quanto a formação de edema articular. Além disso, demonstramos a participação do receptor ET<sub>B</sub> neste processo. Ao avaliarmos o papel das endotelinas endógenas durante a artrite experimental murina induzida por zimosan, demonstramos que as endotelinas exercem suas atividades pró-inflamatórias na cavidade articular, modulando a produção de mediadores inflamatórios, indistintamente através dos seus dois receptores ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub>, que têm sua expressão modulada no decorrer da resposta inflamatória induzida por zimosan.



**Figura 6.1** – Modelo hipotético do envolvimento das ETs durante a artrite induzida por zimosan. (1) Após a injeção i.a. de zimosan (◆) (2) diferentes tipos celulares são ativados e estimulados a produzir diversos mediadores inflamatórios, (3) dentre eles as ETs. (4) As ETs atuando autócrina e/ou parácrina em diversas populações celulares (5) estimulam indireta ou diretamente, através da ligação aos seus receptores (ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub>), a produção de citocinas/quimiocinas/leucotrienos que irão induzir o recrutamento celular e a formação de edema articular. Legenda: ET= endotelina; Mast= mastócito; MØ= macrófago; NØ= neutrófilo

## **7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Akiyama N, Hiraoka O, Fujii Y, Terashima H, Satoh M, Wada K, Furuichi Y. Biotin derivatives of endothelin: utilization for affinity purification of endothelin receptor. *Protein Expr.* 1992;3(5):427-33.
- Andersson SE, Lexmuller K, Alving K, Ekstrom GM. Periarticular tissue levels of cytokine- and endothelin-1-like immunoreactivity during the course of antigen-induced arthritis in the rat. *Inflamm Res.* 1999;48(9):491-6.
- Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature.* 1990;348(6303):730-2.
- Attinà T, Camidge R, Newby DE, Webb DJ. Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond. *Heart.* 2005;91(6):825-31.
- Baamonde A, Lastra A, Villazon M, Bordallo J, Hidalgo A, Menendez L. Involvement of endogenous endothelins in thermal and mechanical inflammatory hyperalgesia in mice. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol.* 2004;369:245-51.
- Bradford M A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals Biochemistry.* 1976;72: 248-54.
- da Rocha FA, Teixeira MM, Rocha JC, Girao VC, Bezerra MM, Ribeiro RA, Cunha FQ. Blockade of leukotriene B4 prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. *Eur J Pharmacol.* 2004;497(1):81-6.
- Davenport AP, Maguire JJ. Endothelin. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;176(Pt 1):295-329.
- Dayer JM. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2003;42(Suppl 2):ii3-10.
- Ehrenreich H, Anderson RW, Fox CH, Rieckmann P, Hoffman GS, Travis WD, Coligan JE, Kehrl JH, Fauci AS. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J Exp Med.* 1990;172(6):1741-8.
- Elferink JG, de Koster BM The effect of endothelin-2 (ET-2) on migration and changes in cytosolic free calcium of neutrophils. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1996a;353(2):130-5.
- Elferink JG, de Koster BM. Modulation of human neutrophil chemotaxis by the endothelin-B receptor agonist sarafotoxin S6c. *Chem Biol Interact.* 1996b;101(3):165-74.
- Elferink J, Koster BM. Stimulation and inhibition of neutrophil chemotaxis by endothelin-3. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;26(Suppl 3):S142-4.

- Elferink JG, de Koster BM. Endothelin-induced activation of neutrophil migration. *Biochem Pharmacol.* 1994;48(5):865-71.
- 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(12):2230-40.
- Ferreira SH, Romitelli M, de Nucci G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989;13(Suppl 1):S220-22.
- Filep JG, Sirois MG, Foldes-Filep E, Rousseau A, Plante GE, Fournier A, Yano M, Sirois P. Enhancement by endothelin-1 of microvascular permeability via the activation of ETA receptors. *Br J Pharmacol.* 1993;109(3):880-6.
- Gasperini S, Marchi M, Calzetti F, Laudanna C, Vicentini L, Olsen H, Murphy M, Liao F, Farber J, Cassatella MA. Gene expression and production of the monokine induced by IFN- $\gamma$  (MIG), IFN-inducible T cell chemoattractant (I-TAC), and IFN-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J Immunol.* 1999;162:4928-37.
- Gegout P, Gillet P, Terlain B, Netter P. Zymosan-induced arthritis in rats. II. Effects of anti-inflammatory drugs. *Life Sci.* 1995;56(20):L389-L394.
- Gegout P, Gillet P, Chevrier D, Guingamp C, Terlain B, Netter P. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. *Life Sci.* 1994;55(17):L321-6.
- Halim A, Kanayama N, el ME, Maehara K, Terao T. Activated neutrophil by endothelin-1 caused tissue damage in human umbilical cord. *Thromb Res.* 1995;77(4):321-7.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* 1998;92(9):3007-17.
- Haq A, El-Ramahi K, Al-Dalaan A, Al-Sedairy ST. Serum and synovial fluid concentrations of endothelin-1 in patients with rheumatoid arthritis. *J Med.* 1999;30(1-2):51-60.
- Harris ED, Jr. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med.* 1990;322(18):1277-89.
- Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol.* 1985;248(5 Pt 1):C550-6.
- Hültner L, Ehrenreich H. Mast cells and endothelin-1: a life-saving biological liaison? *Trends Immunol.* 2005;26(5):235-8.

- Ihara M, Noguchi K, Saeki T, Fukuroda T, Tsuchida S, Kimura S, Fukami T, Ishikawa K, Nishikibe M, Yano M. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci.* 1992;50(4):247-55.
- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(8):2863-7.
- Ishikawa K, Ihara M, Noguchi K, Mase T, Mino N, Saeki T, Fukuroda T, Fukami T, Ozaki S, Nagase T, *et al.* Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ788. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(11):4892-6.
- Jimenez-Boj E, Redlich K, Turk B, Hanslik-Schnabel B, Wanivenhaus A, Chott A, Smolen JS, Schett G. Interaction between synovial inflammatory tissue and bone marrow in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 2005;175(4):2579-88.
- Johnstrom P, Harris NG, Fryer TD, Barret O, Clark JC, Pickard JD, Davenport AP. (18)F-Endothelin-1, a positron emission tomography (PET) radioligand for the endothelin receptor system: radiosynthesis and in vivo imaging using microPET. *Clin Sci.* 2002;103(Suppl 48):4S-8S.
- Joosten LA, Helsen MM, Saxne T, van de Loo FA, Heinegard D, Van Den Berg WB. IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *J Immunol.* 1999;163(9):5049-55.
- Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem.* 1993;268(25):19126-33.
- Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:851-76.
- 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(7):1396-401.
- Khatib AM, Lomri A, Moldovan F, Fiet J, Mitrovic DR. Constitutive and inducible expression of endothelin-1 in primary rat articular chondrocyte culture. *Cytokine.* 1997;9(8):556-62.
- Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Johnson B, Evanoff HL, Haines GK, Burdick MD,

- Pope RM, Strieter RM. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1992;90(3):772-9.
- Kuryliszyn-Moskal A, Klimiuk PA, Sierakowski S, Ciolkiewicz M. A study on vascular endothelial growth factor and endothelin-1 in patients with extra-articular involvement of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2006;25(3):314-9.
- Ledón N, Casacó A, Ramirez D, González A, Cruz J, González R, Capote A, Tolón Z, Rojas E, Rodríguez VJ, Merino N, Rodríguez S, Ancheta O, Cano MC. Effects of a mixture of fatty acids from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) wax oil in two models of inflammation. *Phytomedicine* 2007;14(10):690-5.
- Masaki T. Historical review: Endothelin. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25(4):219-24.
- Maurer M, Wedemeyer J, Metz M, Piliponsky AM, Weller K, Chatterjea D, Clouthier DE, Yanagisawa MM, Tsai M, Galli SJ. Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature.* 2004;432(7016):512-6.
- Mayes MD. Endothelin and endothelin receptor antagonists in systemic rheumatic disease. *Arthritis Rheum.* 2003;48(5):1190-9.
- Menendez L, Lastra A, Hidalgo A, Baamonde A. Nociceptive reaction and thermal hyperalgesia induced by local ET-1 in mice: a behavioral and Fos study. *Naunyn-Schmiedeeberg's Arch Pharmacol.* 2003;367:28-34.
- Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* 2004;25(2):75-84.
- Motte S, McEntee K, Naeije R. Endothelin receptor antagonists. *Pharmacol Ther.* 2006;110(3):386-414.
- Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B. Clinical improvement and radiological deterioration in rheumatoid arthritis: evidence that the pathogenesis of synovial inflammation and articular erosion may differ. *Br J Rheumatol.* 1996;35(12):1263-8.
- Nahir AM, Hoffman A, Lorber M, Keiser HR. Presence of immunoreactive endothelin in synovial fluid: analysis of 22 cases. *J Rheumatol.* 1991;18(5):678-80.
- Nakano A, Kishi F, Minami K, Wakabayashi H, Nakaya Y, Kido H. Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. *J Immunol.* 1997;159(4):1987-92.
- Ozaki S, Ohwaki K, Ihara M, Fukuroda T, Ishikawa K, Yano M. ETB-mediated regulation of extracellular levels of endothelin-1 in cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;209(2):483-9.

- Patel DD, Zachariah JP, Whichard LP. CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium. *Clin Immunol.* 2001;98(1):39-45.
- Penido C, Conte FP, Chagas MS, Rodrigues CA, Pereira JF, Henriques MG. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. *Inflamm Res.* 2006;55(11):457-64.
- Pettipher ER & Salter ED. Resident joint tissues, rather than infiltrating neutrophils and monocytes, are the predominant sources of TNF- $\alpha$  in zymosan-induced arthritis. *Cytokine.* 1996;8(2):130-133.
- Piovezan AP, D'Orleans-Juste P, Souza GE, Rae GA. Endothelin-1-induced ET(A) receptor-mediated nociception, hyperalgesia and oedema in the mouse hind-paw: modulation by simultaneous ET(B) receptor activation. *Br J Pharmacol.* 2000;129:961-8.
- Rae GA, Henriques MGMO. Endothelins in Inflammation. In: Proinflammatory and antiinflammatory peptides. New York: Marcel Dekker Inc.; 1998. p. 163-202.
- Raffa RB, Schupsky JJ, Jacoby HI. Endothelin-induced nociception in mice: mediation by ETA and ETB receptors. *J. Pharmacol Exp Ther.* 1996;276:647-51.
- Ritchlin C. Fibroblast biology. Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Res.* 2000;2(5):356-60.
- Rocha FA, Aragao AG, Jr., Oliveira RC, Pompeu MM, Vale MR, Ribeiro RA. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflamm Res.* 1999;48(9):485-90.
- Rosengren S, Firestein GS, Boyle DL. Measurement of inflammatory biomarkers in synovial tissue extracts by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(6):1002-10.
- Rubanyi, GM, Polokoff, MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev.* 1994;46:325-415.
- Rubanyi GM, Botelho LH. Endothelins. *FASEB J.* 1991;5(12):2713-20.
- Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, Sakihama T, Matsutani T, Negishi I, Nakatsuru S, Sakaguchi S. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature.* 2003;426(6965):454-60.
- Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor.



- Nature. 1990;348(6303):732-5.
- Sampaio AL, Rae GA, Henriques MG. Effects of endothelin ETA receptor antagonism on granulocyte and lymphocyte accumulation in LPS-induced inflammation. *J Leukoc Biol.* 2004;76(1):210-6.
- Schwarting A, Schlaak J, Lotz J, Pfers I, Meyer zum Buschenfelde KH, Mayet WJ. Endothelin-1 modulates the expression of adhesion molecules on fibroblast-like synovial cells (FLS). *Scand J Rheumatol.* 1996;25(4):246-56.
- Shadidi KR, Aarvak T, Jeansson S, Henriksen JE, Natvig JB, Thompson KM. T-cell responses to viral, bacterial and protozoan antigens in rheumatoid inflammation. Selective migration of T cells to synovial tissue. *Rheumatology.* 2001;40(10):1120-5.
- Sharma JN, Buchanan WW. Pathogenic responses of bradykinin system in chronic inflammatory rheumatoid disease. *Exp Toxicol Pathol.* 1994;46(6):421-33.
- Shimada K, Yonetani Y, Kita T, Suzumura A, Takayanagi T, Nakashima T. Cyclooxygenase 2 expression by endothelin-1-stimulated mouse resident peritoneal macrophages in vitro. *Eur J Pharmacol.* 1998;356(1):73-80.
- Takasuka T, Sakurai T, Goto K, Furuichi Y, Watanabe T. Human endothelin receptor ETB. Amino acid sequence requirements for super stable complex formation with its ligand. *J Biol Chem.* 1994;269(10):7509-13.
- Taylor PC, Peters AM, Paleolog E, Chapman PT, Elliott MJ, McCloskey R, Feldmann M, Maini RN. Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(1):38-47.
- Toffoli MC, Gabra BH, Teixeira CF, Sirois P, Jancar S. Endothelins Mediate Neutrophil Activation, ProMMP-9 Release and Endothelial Cell Detachment. *Inflamma Res.* 2007;30(1-2):28-37.
- Underhill DM. Macrophage recognition of zymosan particles. *J Endotoxin Res.* 2003;9(3):176-80.
- Van de Loo FA, Arntz OJ, van Enkevort FH, Van Lent PL, Van Den Berg WB. Reduced cartilage proteoglycan loss during zymosan-induced gonarthrosis in NOS2-deficient mice and in anti-interleukin-1-treated wild-type mice with unabated joint inflammation. *Arthritis Rheum.* 1998;41(4):634-46.
- Van Den Berg WB, Joosten LA, Kollias G, van de Loo FA. Role of tumour necrosis factor alpha in experimental arthritis: separate activity of interleukin 1beta in chronicity

- and cartilage destruction. *Ann Rheum Dis.* 1999;58(Suppl 1):I40-8.
- Van Meurs JB, Van Lent PL, Joosten LA, Van der Kraan PM, Van Den Berg WB. Quantification of mRNA levels in joint capsule and articular cartilage of the murine knee joint by RT-PCR: kinetics of stromelysin and IL-1 mRNA levels during arthritis. *Rheumatol Int.* 1997;16(5):197-205.
- Vaudo G, Marchesi S, Gerli R, Allegrucci R, Giordano A, Siepi D, Pirro M, Shoenfeld Y, Schillaci G, Mannarino E. Endothelial dysfunction in young patients with rheumatoid arthritis and low disease activity. *Ann Rheum Dis.* 2004;63(1):31-5.
- Waggoner WG, Genova SL, Rash VA. Kinetic analyses demonstrate that the equilibrium assumption does not apply to [<sup>125</sup>I]endothelin-1 binding data. *Life Sci.* 1992;51(24):1869-76.
- Wahl JR, Goetsch NJ, Young HJ, Van Maanen RJ, Johnson JD, Pea AS, Brittingham A. Murine macrophages produce endothelin-1 after microbial stimulation. *Exp Biol Med.* 2005;230(9):652-8.
- Wanecek M, Weitzberg E, Rudehill A, Oldner A. The endothelin system in septic and endotoxin shock. *Eur J Pharmacol.* 2000;407(1-2):1-15.
- Werling D, Hope JC, Howard CJ, Jungi TW. Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology.* 2004;111(1):41-52.
- Xu S, Denton CP, Holmes A, Dashwood MR, Abraham DJ, Black CM. Endothelins: effect on matrix biosynthesis and proliferation in normal and scleroderma fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31(Suppl 1):S360-3.
- 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(6163):411-5.
- Yoshida H, Imafuku Y, Ohhara M, Miyata M, Kasukawa R, Ohsumi K, Horiuchi J. Endothelin-1 production by human synoviocytes. *Ann Clin Biochem.* 1998;35(Pt 2):290-4.
- Zouki C, Baron C, Fournier A, Filep JG. Endothelin-1 enhances neutrophil adhesion to human coronary artery endothelial cells: role of ET(A) receptors and platelet-activating factor. *Br J Pharmacol.* 1999;127(4):969-79.



## Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice

C. Penido<sup>1</sup>, F. P. Conte<sup>1</sup>, M. S. S. Chagas<sup>1</sup>, C. A.B. Rodrigues<sup>1</sup>, J. F. G. Pereira<sup>2</sup> and M. G. M. O. Henriques<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmacologia Aplicada, Far-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Sizenando Nabuco 100, 21041-250, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, Fax: ++5521 25642559, e-mail: gracahen@far.fiocruz.br

<sup>2</sup> Departamento de Produtos Naturais, Far-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Sizenando Nabuco 100, 21041-250, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 7 October 2005; returned for revision 16 January 2006; accepted by M. Parnham 22 May 2006

**Abstract.** *Objective:* We investigated the antiinflammatory properties of a derived fraction of tetranortriterpenoids (TNTP) obtained from the seeds of *Carapa guianensis* Aublet.

*Material and methods:* Zymosan-induced arthritis and pleurisy in Swiss and C57/B16 mice (n = 10 per group). Western blot analysis was performed to analyze nuclear factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) translocation in mice peritoneal macrophages stimulated *in vitro* with zymosan (500  $\mu$ g/ml). ELISA was performed to evaluate cytokine levels in knee joints. Values of p  $\leq$  0.05 were regarded as significant.

*Results:* Zymosan intra-articular (i.a.) injection (500  $\mu$ g/cavity) induced a significant increase in knee joint diameter within 6h, peaked within 24h and remained above control values for 20 days. Orally-given (p.o.) TNTP (100–200 mg/kg) inhibited zymosan-induced increase in knee joint diameter and protein extravasation into synovial cavity within 6h. TNTP (100–200 mg/kg, p.o.) also inhibited total leukocyte influx into the synovial space and tissue, as well as into the mice pleural cavity, due to neutrophil impairment 6h after zymosan stimulation. The increase in TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CXCL8/IL-8 levels that were detected in knee synovial extracts obtained from zymosan-stimulated mice was also inhibited by TNTP (100 mg/kg, p.o.). Moreover, the incubation of mice peritoneal macrophages with TNTP (100  $\mu$ g/ml) inhibited zymosan (500  $\mu$ g/ml)-induced NF $\kappa$ B translocation into the nucleus 6h after stimulation.

*Conclusion:* Taken together, these results indicate that TNTP present an important antiinflammatory effect, inhibiting zymosan-induced arthritis in mice via the impairment of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CXCL8/IL-8 generation, as well as NF $\kappa$ B signaling pathway.

**Key words:** *Carapa guianensis* – Arthritis – Cytokines – Chemokines – Oedema – Leukocyte trafficking

### Introduction

*Carapa guianensis* Aublet is a member of the Meliaceae family widely used in folk medicine in Brazil and other countries encompassing the Amazon rainforest. This species contains triterpenes, tetraterpenes, alkaloids and limonoids, which are phytochemically characteristic of all members of the Meliaceae family [for review see 1]. Six different tetranortriterpenoid compounds isolated from *C. guianensis* seeds and characterized as 6 $\alpha$ -acetoxygedunin, 7-deacetoxy-7-oxogedunin, andirobin, gedunin, methyl angolensate and 6 $\alpha$ -acetoxyepoxyzadiradione [2] have been described as the bioactive compounds of such species [3, 4].

Antiinflammatory and analgesic activities are among the most remarkable properties attributed by ethnopharmacological research to the oil extracted from *C. guianensis* seeds, mainly for rheumatic pain and arthritis [5, 6]. We have previously observed that *C. guianensis* oil and six different tetranortriterpenoids isolated from such oil (TNTP) present an important anti-allergic and analgesic effect on allergen-evoked hyperalgesia in rats due to the blockade of signaling mechanisms and generation of different mediators [3]. However, to date no scientific studies supporting the use of compounds isolated from *C. guianensis* for the treatment of inflammatory conditions have been published.

Zymosan-induced arthritis has been used as an experimental model to assess the antiinflammatory effects of different compounds. At early time points, after intra-articular (i.a.) zymosan stimulation, an important oedema formation is accompanied by a massive neutrophil infiltration in the synovial tissue and fluids of inflamed joints. At late time points, the chronic response is characterized by macrophage and lymphocyte accumulation [7, 8]. The articular inflammation is marked by an important generation of inflammatory mediators, as tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-18, leukotriene (LT)B<sub>4</sub> and prostaglandine (PG)E<sub>2</sub> [9] in the synovial space of human subjects and animals. Such mediators contribute to increased microvascular

permeability to plasma proteins (and hence oedema), as well as cellular infiltration and hyperalgesia [10–12]. Moreover, in different models of experimental arthritis the blockade or deletion of the gene of mediators including TNF- $\alpha$ , IL-18, LTB<sub>4</sub> and IL-1, have been shown to inhibit cellular influx, oedema formation and the generation of inflammatory mediators [10–14].

In the present study, we have assessed the antiinflammatory effects of tetranortriterpenoids (TNTP) isolated from *C. guianensis* seeds in zymosan-induced arthritis in mice.

## Materials and methods

### Animals

Male Swiss (20–25 g) and C57/Bl6 (18–20 g) mice provided by Oswaldo Cruz Foundation breeding unit (Rio de Janeiro, Brazil) were used. Animals were caged with free access to food and fresh water in a room with temperature ranging from 22 to 24 °C and a 12 h light/dark cycle at FarManguinhos experimental animal facility unit until used. All experimental procedures were performed according to the Committee on Ethical Use of Laboratory Animals of Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Brazil) and to the ethical guidelines of International Association for the Study of Pain [15].

### Antibodies and reagents

Zymosan, dexamethasone, phosphate buffered saline (PBS), tween 20, o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD), HEPES, bovine serum albumin (BSA), diaminobenzidine (DAB), Nonidet P-40, dithiothreitol (DTT), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), aprotinin, triton and ethylenediaminetetraacetic sodium salt (EDTA) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Hank's balanced salt solution was purchased from HyClone (Logan, Utah, USA). Polyacrilamide and polyvinylidene difluoride membrane were obtained from Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK). All reagents used for Lowry protein assay were purchased from Pierce Perbio (Germany). Purified anti-murine TNF- $\alpha$ , CXCL8/IL-8 (KC) and IL-1 $\beta$  mAbs, biotinylated anti-TNF- $\alpha$ , IL-8 and IL-1 $\beta$  mAbs and recombinant TNF- $\alpha$ , IL-8 and IL-1 $\beta$  were all obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Rabbit anti-mouse NF $\kappa$ B p65 (C-20) and biotinylated goat anti-rabbit IgG were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA), streptavidin-FITC was obtained from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). The pool of tetranortriterpenoids (TNTP) were precipitated from *Carapa guianensis* Aublet seeds oil (Brasmazon<sup>®</sup>, Pará, Brazil) during the extraction process, and presented the following composition: 6 $\alpha$ -acetoxypedunin (7%), 7-deacetoxy-7-oxopedunin (7%), 6 $\alpha$ -acetoxypoxyazadiradione (7%), methyl angolensate (6%), andirobin (4%) and gedunin (3%), when analyzed by HPLC (Shimadzu LC10 AD, Japan); [2].

### Treatments

Animals fasted overnight received TNTP (100 mg/kg) orally (p. o.) in a final volume of 200  $\mu$ l, 1 h prior stimulation. Dexamethasone (10 mg/kg, 100  $\mu$ l) was administered via intraperitoneal (i. p.) 1 h prior stimulation and used as reference inhibitor. The same volume of vehicle was administered into control groups.

### Induction of arthritis

During light ether anesthesia, mice received an intra-articular (i. a.) injection of zymosan (500  $\mu$ g in 25  $\mu$ l of sterile saline), into one knee joint.

The contralateral knee was injected with the same volume of the vehicle, and used as control.

### Measurement of knee joint swelling

Knee joint swelling was evaluated by measurement of the transverse diameters of each knee joint by a digital caliper (Digimatic Caliper, Mitsutoyo Corporation, Japan) at different time points after stimulation. Knee joint swelling is expressed in millimeters (mm).

### Collection of synovial fluid and leukocyte counts

Six hours after zymosan i. a. injection, animals were killed by an excess of carbone dioxide. The synovial cavities were washed with 300  $\mu$ l of PBS containing EDTA (10 mM) by the insertion of a 21G needle into the mice knee joints, and the synovial fluids were recovered by aspiration. Total leukocyte counts were made in Neubauer chamber, under an optical microscope, after dilution in Türk fluid (2% acetic acid). Differential counts of mononuclear cells, neutrophils and eosinophils were made using stained cytopspins (Cytospin 3, Shandon Inc., Pittsburgh, PA, USA) by the May-Grünwald-Giemsa method. Counts are reported as numbers of cells per cavity.

### Preparation of knee synovial extracts

Knee synovial extracts were prepared as previously described by Rosengren and colleagues [16] and modified by us for application in mice. Mice were killed 6 h after zymosan i. a. injection, and the knee synovial tissue was collected. The synovial tissue was removed with a scalpel, placed on liquid nitrogen (5–10 s) and pulverized with a hammer. The pulverized tissue was homogenized by hand using a glass potter homogenizer (Kontes Glass Company, Vineland, NJ, USA) in 1 ml HBSS containing 0.4% of triton and 0.2% of protease inhibitor cocktail (Complete Mini, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) in a rate of 50  $\mu$ l per 10 mg of tissue. The homogenate was then centrifuged (5,000 g for 10 min at 4 °C), the supernatant was filtered (0.2  $\mu$ l) and stored at -70 °C. Total protein content in the supernatant was estimated by Lowry protein assay [17].

### Enzyme-linked immunosorbent assay

Levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CXCL8/IL-8 in the knee synovial extracts were evaluated by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using matched antibody pairs from R&D Systems (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions.

### Induction of pleurisy

Pleurisy was induced by an intrathoracic (i. t.) injection of zymosan (100  $\mu$ g/cavity) diluted in sterile PBS to a final volume of 100  $\mu$ l. Control group received an i. t. injection of 100  $\mu$ l of sterile PBS. At specific time points after the stimuli, animals were killed by an excess of carbon dioxide, and their thoracic cavities were rinsed with 1 ml of saline containing heparine (20 IU/ml). Protein levels were quantified as described below.

### Vascular permeability measurements

Six hours after zymosan i. a. injection, animals were killed by an excess of carbone dioxide, synovial fluids were recovered as described above and centrifuged at 740 g for 10 min. Total protein contents were quantified in the supernatants by the Lowry protein assay.

### Histological analysis

Inflamed knee joints were obtained from C57/Bl6 mice 6h after i.a. zymosan or saline administration. Knee joints were dissected, immersed in 10% formalin solution for 24h and decalcified in 10% EDTA in PBS solution at 4°C. Specimens were dried, embedded in an O.C.T. compound (SHANDON Cryomatrix®, SHANDON, EUA) followed by snap-freezing in liquid nitrogen (-120°C). All specimens were kept in -70°C until frozen sections were performed in a cryostat (CM3050 S, Leica, Germany) followed by hematoxylin and eosin staining and permanent slides mounting.

### Preparation of cells for NFκB analysis

NFκB translocation was analysed *in vitro* in peritoneal macrophages recovered from C57/Bl6 mice stimulated with zymosan (500µg/ml) for 6h. Cells were added to a 24 well plate (5 × 10<sup>6</sup> cells/ml) in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, incubated with TNTP (100mg/ml) or dexamethasone (100mg/ml) for 1h at 37°C at 5% CO<sub>2</sub>, and then stimulated. The plate was centrifuged (500g, 10min) and cells were resuspended in lysis buffer [10mM HEPES (pH 7.6), 10mM KCl, 0.1mM EDTA (pH 8.0), 0.2% Nonidet P-40, 1mM dithiothreitol (DTT), 0.5mM PMSF, 10mg/ml aprotinin], and stored at -70°C until nuclear extraction.

### Preparation of nuclear extracts

The nuclear extracts were obtained as described previously [18] from cells recovered from the peritoneal cavities of mice, pre-treated and stimulated *in vitro*. In brief, cells were lysed in ice-cold buffer A (10mM HEPES, pH 7.9; 10mM KCl; 0.1mM EDTA; 0.1mM EGTA; 1mM dithiothreitol; and 0.5mM PMSF) and after 15 min of incubation on ice, NP-40 was added to a final concentration of 0.5% (v/v). Nuclei were collected by centrifugation (14,000g; 5 min at 4°C). Nuclear pellet was suspended in ice-cold buffer C (20mM HEPES, pH 7.9; 400mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 1mM dithiothreitol; 1mM PMSF; 1mg/ml pepstatin; 1mg/ml leupeptin; and 20%, v/v, glycerol) and incubated for 30min. Nuclear proteins were collected in the supernatant after centrifugation (14,000g for 10min, 4°C), and the immunoblotting for nuclear NFκB content was performed as subsequently described.

### Immunoblotting Analysis

The total protein content in the cell extracts was determined by Lowry protein assay [17]. Cell lysates were denatured in Laemmli's sample buffer (50mM Tris-HCl, pH 6.8; 1% SDS; 5% 2-mercaptoethanol; 10% glycerol; 0.001% bromophenol blue) and heated in boiling water bath for 3min. Samples (10µg total protein) were resolved by 12% SDS-PAGE, and proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-C Pure, Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA). Membranes were blocked with Tween-PBS (0.5% Tween-20) containing 2% bovine serum albumin and probed with the specific primary monoclonal antibody anti-NFκB/p65 (1: 500, Santa Cruz, CA, USA). After extensive washing in Tween-PBS, nitrocellulose sheets were incubated with anti-rabbit IgG biotin-conjugated antibody (1: 1000; Sigma) for 1h and then incubated with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (1: 1000; Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA). Immunoreactive proteins were visualized by 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma) staining. The bands were quantified by densitometry, using Image-Pro Plus Software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

### Statistical Analysis

Data were reported as the mean ±S.E.M. and were analyzed statistically by means of analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls-Student test or Student t test. Values of p ≤ 0.05 were regarded as significant.

## Results

### Time course of zymosan-induced knee joint thickness

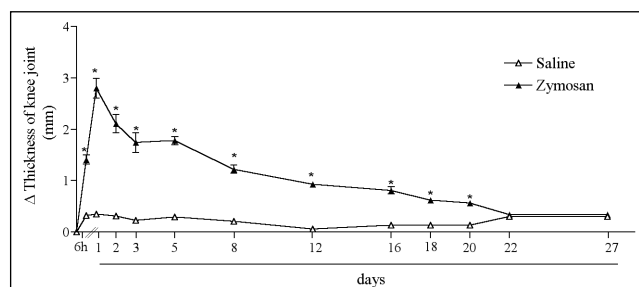
Figure 1 shows that zymosan (500µg/cavity) i.a. injection in Swiss mice induced a marked increase in the knee joint diameter within 6h, that peaked within 24h. Knee joint diameter values started to decrease at later time points and remained significantly above control levels until 20 days after stimulation. Further analyses were performed within 6h after stimulation, since a marked inflammatory reaction was already observed at this time point.

### Dose response analysis of TNTP on knee joint oedema induced by zymosan

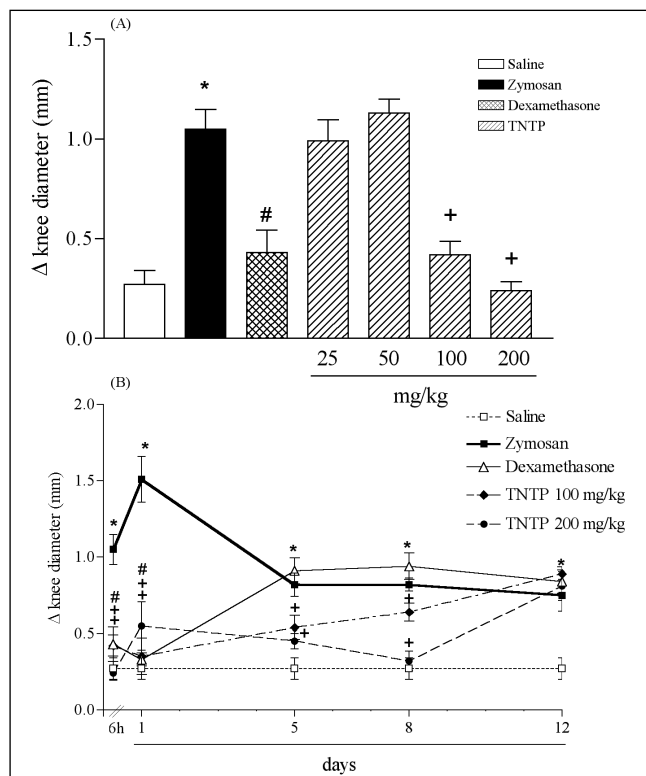
As shown in Figure 2A, the oral pre-treatment with TNTP 1h prior was able to significantly inhibit zymosan-induced knee joint oedema formation starting at 100mg/kg, in a dose dependent manner (R = 0.79). Maximal inhibition of 77% was achieved at 200mg/kg. Such dose corresponds to 14mg of 6α-acetoxypedunin, 14mg of 7-deacetoxy-7-oxogedunin, 14mg of 6α-acetoxypoxyazadiradione, 12mg of methyl angolensate, 8% mg of andirobin and 6% of gedunin per kg of mice weight, which are the major components of TNTP. It is noteworthy that TNTP effect (100–200mg/kg) was similar to the effect achieved with dexamethasone pre-treatment (10mg/kg, i.p., 1h prior). It is very interesting that the single oral treatment with TNTP at 100 or 200mg/kg 1h prior zymosan (500µg/cavity, i.a.) was able to inhibit oedema formation until 8 days after stimulation, whereas dexamethasone was effective for 24h after zymosan i.a. injection (Fig. 2B).

### Dose response analysis of TNTP on cellular influx induced by zymosan in mice pleural cavity

The dose response analysis of TNTP on cellular influx was performed using the pleurisy model induced by zymosan in Swiss mice, due to the higher numbers of leukocytes present in mice pleural cavities than in synovial cavities, allowing us to use less animals for the experiment. As shown in Figure 3, 6h after the i.t. injection of zymosan (100µg/cavity), an



**Fig. 1.** Time-course of zymosan (500µg/knee, i.a.)-induced increase in knee diameter in Swiss mice. Analysis was performed from 6h to 27 days after stimulation. Results are expressed as the mean ±S.E.M. from at least 8 animals per group. Statistically significant differences (p ≤ 0.05) between stimulated and non-stimulated groups are indicated by an asterisk.

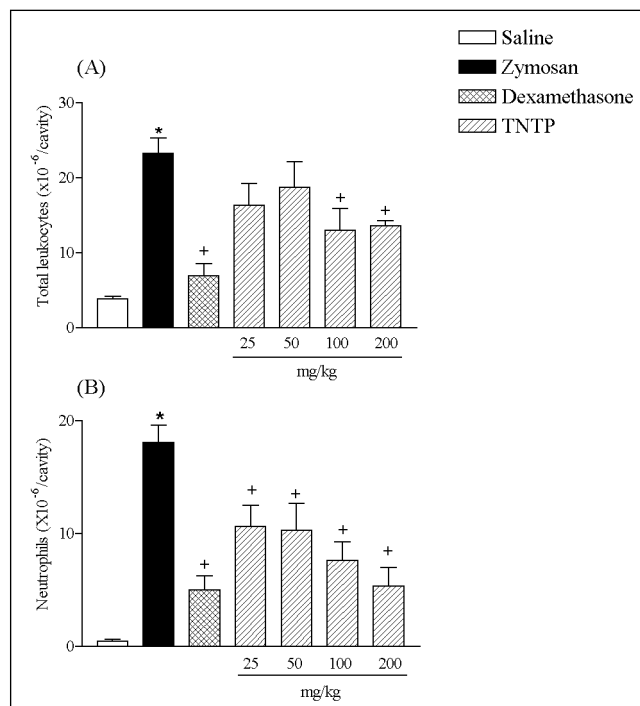


**Fig. 2.** (A) Dose-dependent effect of TNTP oral pre-treatment (25–200 mg/kg) on increase in knee diameter induced by zymosan (500 µg/knee, i.a.). (B) Temporal analysis of TNTP (100, 200 mg/kg) effect on zymosan-induced increase in knee diameter. Dexamethasone (10 mg/kg, i.p.) was used as reference inhibitor. Animals were treated 1 h before stimulation. Analysis was performed 6 h after stimulation. Results are expressed as the mean  $\pm$ S.E.M. from at least 8 animals per group. Statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between stimulated and non-stimulated groups are indicated by an asterisk, whereas # represents differences between dexamethasone treated and non-treated groups, and + represents differences between TNTP treated and non-treated groups.

intense accumulation of total leukocytes (A) and neutrophils (B) was observed in the pleural cavity of Swiss mice. Dexamethasone pre-treatment (10 mg/kg, i.p.) 1 h before stimulation significantly inhibited the influx of total leukocytes (70%) and neutrophils (72%) in the mice pleural cavity. The oral administration of TNTP 1 h before stimulation was also able to inhibit the increase in total leukocyte and neutrophil numbers. Neutrophil influx was inhibited in a dose dependent manner ( $R = 0.96$ ; with maximal inhibition 70% for neutrophils, at 200 mg/kg). It is important to note that the i.t. injection of zymosan also induced an influx of mononuclear cells into the mice pleural cavity that was not inhibited by TNTP (data not shown), which explains the fact that TNTP inhibited only 44% for total leukocytes.

#### *Inhibition of knee oedema and protein extravazation by TNTP*

The knee joint oedema induced by the i.a. injection of zymosan (500 µg/cavity) was accompanied by plasma protein extravazation into the synovial space, as observed by the significant increase in total protein content in the synovial



**Fig. 3.** Dose-dependent effect of TNTP oral pre-treatment (25–200 mg/kg) on zymosan (100 µg/cavity, i.t.)-induced total leukocyte (A) and neutrophil (B) accumulation into C57/B16 mice pleural cavities. Dexamethasone (10 mg/kg, i.p.) was used as reference inhibitor. Animals were treated 1 h before stimulation. Analysis was performed 6 h after stimulation. Results are expressed as the mean  $\pm$ S.E.M. from at least 7 animals per group. Statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between stimulated and non-stimulated groups are indicated by an asterisk, whereas + represents differences between treated and non-treated groups.

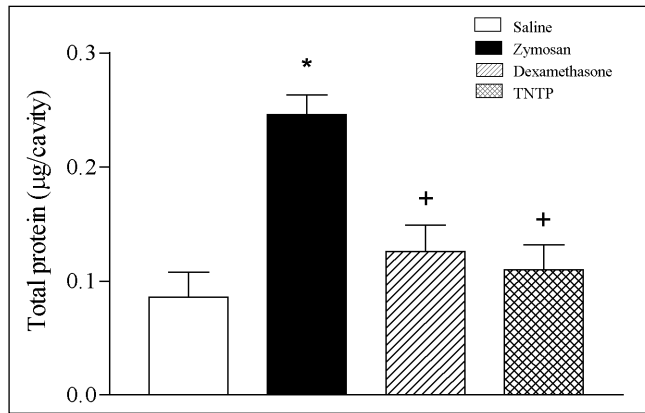
fluid 6 h after stimulation (Fig. 4). Oral pre-treatment with TNTP (100 mg/kg, 1 h prior) was also able to significantly inhibit zymosan-induced protein extravazation to the same extent as dexamethasone (10 mg/kg, i.p.), used as the reference inhibitor.

#### *Inhibition of leukocyte influx into the synovial space by TNTP*

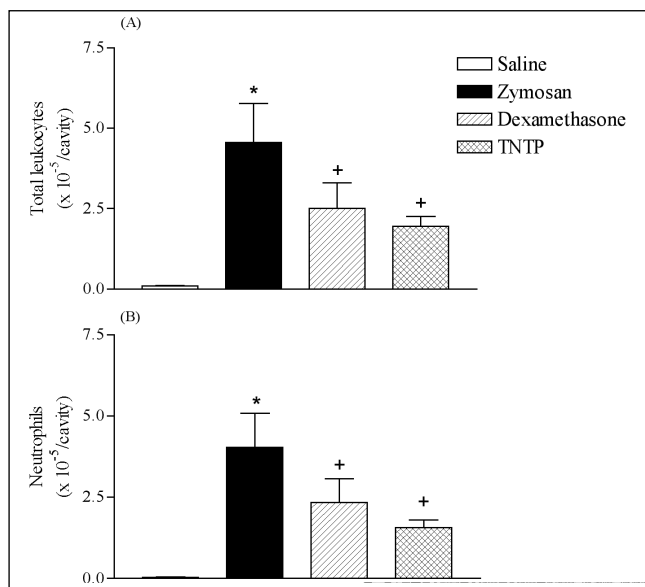
The i.a. injection of zymosan (500 µg/cavity) induced an important increase in total leukocyte numbers in the articular space within 6 h (Fig. 5A). Such increase was mainly due to the influx of neutrophils (Fig. 5B), with no significant changes observed in other cell populations at this time point (data not shown). Interestingly, TNTP (100 mg/kg, p.o.) pre-treatment significantly inhibited the increase in total leukocyte and neutrophil numbers in the synovial fluid to the same extent as the reference inhibitor dexamethasone (10 mg/kg, i.p.).

#### *Histological analysis of neutrophil influx into the knee joint tissue*

Histological samples of i.a. zymosan-stimulated C57/B16 mice were characterized by an intense neutrophil infiltra-

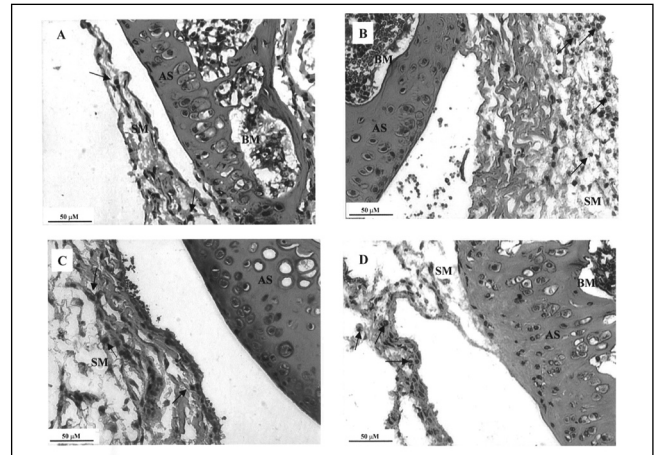


**Fig. 4.** Effect of TNTP oral pre-treatment (100 mg/kg) on protein extravazation induced by zymosan (500 µg/knee, i. a.) in C57/B16 mice. Dexamethasone (10 mg/kg, i. p.) was used as reference inhibitor. Animals were treated 1 h before stimulation. Analysis was performed 6 h after stimulation. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. from at least 8 animals per group. Statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between stimulated and non-stimulated groups are indicated by an asterisk, whereas + represents differences between treated and non-treated groups.



**Fig. 5.** Effect of TNTP oral pre-treatment (100 mg/kg) on total leukocyte (A) and neutrophil (B) accumulation into C57/B16 mouse synovial space 6 h after zymosan i. a. injection (500 µg/knee). Dexamethasone (10 mg/kg, i. p.) was used as reference inhibitor. Mice were treated 1 h before stimulation. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. from at least 10 animals per group. Statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between stimulated and non-stimulated groups are indicated by an asterisk, whereas + represents differences between treated and untreated groups.

tion into the joints, tendons and ligament sheaths with initial pannus development (Fig. 6B), markedly different when compared to samples recovered from saline-injected knee joints, as shown in Figure 6A. Dexamethasone (10 mg/kg, i. p., Fig. 6C) and TNTP (100 mg/kg, p. o., Fig. 6D) significantly inhibited the migration of inflammatory cells into the knee synovial membrane, adjacent connective tissues and skeletal muscle.



**Fig. 6.** Effect of TNTP on zymosan-induced knee joint inflammation. Histological sections of saline- (A) and zymosan-injected (B–D) knee joints within 6 h. (A) shows normal articular cartilage surface and synovial membrane, with absence of inflammatory cells. (B) shows oedema and neutrophil influx into the synovial membrane spreading into adjacent connective tissue and skeletal muscle. Note the inhibition of neutrophil infiltration and oedema in dexamethasone (10 mg/kg, i. p.)-treated mice (C) and (100 mg/kg, p. o.) treated mice (D). Original magnification of 400X. Black arrows show leukocyte accumulation on synovial membrane connective tissue. Sections were stained with hematoxylin and eosin. SM = synovial membrane; AS = articular surface; BM = bone marrow.

#### *TNTP inhibit cytokines generation in the knee synovial extracts*

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CXCL8/IL-8 levels in the knee synovial extracts of C57/B16 mice were evaluated by ELISA. As shown in Figure 7, CXCL8/IL-8 (A), IL-1 $\beta$  (B) and TNF- $\alpha$  (C) levels were significantly increased in synovial extracts from knees recovered from zymosan-stimulated mice. The oral pre-treatment with dexamethasone (i. p., 10 mg/kg) or TNTP (100 mg/kg, p. o.) significantly impaired the generation of such mediators.

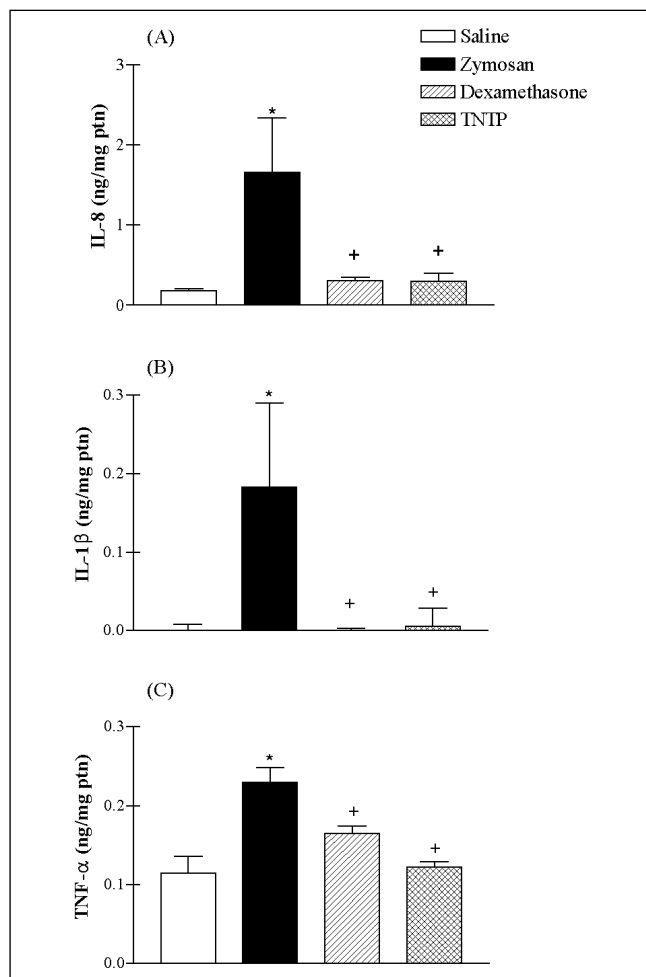
#### *TNTP inhibit NF $\kappa$ B/p65 activation after zymosan stimulation in vitro*

Protein levels were determined in nuclear extracts of peritoneal macrophages recovered from C57/B16 mice pre-treated or not with TNTP (100 µg/ml) and stimulated with zymosan (500 µg/ml) for 6 h. The p65-binding complex was detected by anti-p65 subunit monoclonal antibody. As shown in Figure 8A, zymosan stimulation enhanced p65 subunit in the nuclei (lanes 3, 4), which was significantly inhibited by TNTP pre-treatment (lanes 5, 6). Non-stimulated cells pre-incubated with TNTP showed a basal translocation of p65 subunit to the nuclei (lanes 1, 2). Densitometric analysis of bands is shown in Figure 8B.

#### **Discussion**

Natural compounds are broadly recognized for their wide range of pharmacological activities. The medicinal proper-

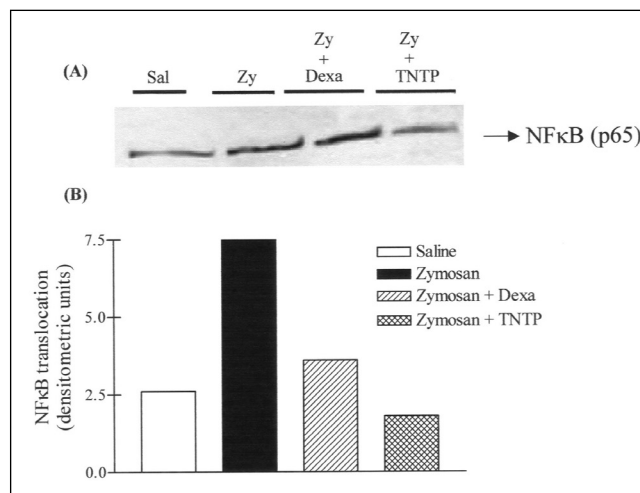




**Fig. 7.** Effect of TNTP pre-treatment (100 mg/kg, p. o.) on CXCL8/IL-8 (A), IL-1 $\beta$  (B) and TNF- $\alpha$  (C) generation induced by zymosan in C57/B16 mice. Protein levels were determined by ELISA in tissue extracts of knee joints recovered 6 h after saline or zymosan (500  $\mu$ g/knee, i. a.) stimulation, compared with pleural washes recovered from mice pretreated with dexamethasone (10 mg/kg, i. p.) or TNTP and injected with zymosan. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. from at least 10 animals per group. Statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between stimulated and non-stimulated groups are indicated by an asterisk, whereas + represents differences between treated and untreated groups.

ties of *C. guianensis* have been attributed to the presence of limonoids, which are tetranortriterpenoids [1]. The present study demonstrates that a group of six different tetranortriterpenoids (TNTP) obtained from the seeds of *C. guianensis* present an important antiinflammatory property, marked by the inhibition of cell influx and oedema formation in a murine model of experimental arthritis induced by zymosan.

Previous reports demonstrated that zymosan-induced acute arthritis in rats mimicked some features of rheumatoid synovitis, leading to the release of prostanoids, cytokines and proteases from resident cells that result in proliferation of synovial cells, infiltration of polymorphonuclear cells, oedema and pannus formation as well as cartilage destruction [19, 20]. We observed that zymosan i. a. injection in mice resulted in a marked increase in knee joint thickness within 6 h that peaked within 24 h and remained significantly



**Fig. 8.** Western blot analysis. NF $\kappa$ B ( $\alpha$ -p65 MAb, Santa Cruz) protein levels were determined in nuclear extracts of peritoneal macrophages from C57/B16 mice pre-treated or not with dexamethasone (Dexa, 100  $\mu$ g/ml) or 100 TNTP (100  $\mu$ g/ml) for 1 h, and stimulated with zymosan (Zy, 500  $\mu$ g/ml). Nuclear extracts were prepared 6 h after stimulation. A total of 10  $\mu$ g of protein were applied per lane (A). Densitometric analysis is represented in (B).

above control values until 20 days, according to data published by others [20, 21]. Zymosan-induced knee joint thickness was due to protein extravazation into the articular space, a phenomenon that was inhibited by TNTP oral pre-treatment starting at the dose of 100 mg/kg. It is noteworthy that the extent of inhibition provided by TNTP against zymosan-induced knee joint swelling was similar to that of dexamethasone, the reference inhibitor used. It has been demonstrated that mediators such as leukotriene (LT) B<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, bradykinin and platelet-activating-factor (PAF) are involved in oedema formation during articular inflammation (for review see [22]). We have previously demonstrated that the oral pre-treatment with TNTP was able to inhibit vascular permeability induced by bradykinin, platelet-activating factor (PAF) and histamine, as well as PGE<sub>2</sub> generation during the allergic response [3]. In light of such findings, it is possible that the anti-oedematogenic effect of TNTP might be exerted through the inhibition of PGE<sub>2</sub>, PAF and bradykinin in such model, even though further studies are necessary to clarify such hypothesis.

According to previous data, we observed that zymosan i. a. stimulation induced a marked increase in total leukocyte numbers, mainly due to a massive influx of neutrophils into the articular space and tissues, a phenomenon inhibited by corticoids [10, 23]. The oral administration of TNTP was also able to significantly inhibit zymosan-induced neutrophil migration into the inflammatory site, as observed in synovial washes as well as in histological slices. Indeed, rheumatoid arthritis is regarded as a prototype of diseases characterized by neutrophilic inflammation. Elevated numbers of neutrophils are found in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, which secrete proteases that contribute to the destruction of cartilage and related joint structures. The inhibition of neutrophil mobilization by TNTP was previously observed by us in the mice pleural cavity after antigenic challenge [4], a phenomenon shown to be related

to the increase in CXCL8/IL-8 levels [24]. Indeed, high levels of synovial IL-8 have been reported in patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory joint conditions, and such chemokine has been implicated in the mobilization of neutrophils into the synovium and synovial space during the course of rheumatoid and experimental arthritis [25, 26].

We observed an important increase in CXCL8/IL-8 levels in knee joint extracts 6h after zymosan stimulation, which correlates to the massive influx of neutrophils. Since CXCL8/IL-8 returned to basal levels in knee joint extracts recovered from mice pre-treated with TNTP and dexamethasone, it is very likely that the inhibition of neutrophil influx by TNTP is related to the impairment of CXCL8/IL-8 generation in the inflammatory site. The pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  are mediators intimately involved in the pathogenesis of arthritis. Increased levels of such cytokines are found in joints of rheumatoid patients and experimental animals, in which they contribute to leukocyte recruitment and joint damage, through their effects on the release of active proteases and collagenases from resident chondrocytes and fibroblasts (for review see [27]). According to previous published data, we observed that the i. a. injection of zymosan induced the release of IL-1 $\beta$  in articular tissues at the initial phase of the inflammatory response [12]. IL-1 produced during zymosan-induced articular inflammation has been correlated to oedema formation and neutrophil influx at early times, and to a high extent in cartilage destruction via suppression of proteoglycan synthesis at later time points [12]. Moreover, the neutralization of IL-1 by antibodies in C57/Bl6 mice greatly attenuated joint inflammation by the decrease of oedema formation and also reduced cartilage loss in different models experimental arthritis, including the induced by zymosan [28–30]. The fact that TNTP pre-treatment was able to inhibit the synthesis of IL-1 $\beta$  in inflamed joints suggests that it is one of the mechanisms by which TNTP incite its antiinflammatory effects on acute arthritis, mainly due to oedema reduction at the acute response. However, the effect of TNTP at later time points after zymosan i. a. stimulation and on cartilage integrity remains to be investigated.

TNF- $\alpha$  levels are rapidly increased during the onset of zymosan-induced arthritis, and such cytokine has been related to important features of joint inflammation. It has been demonstrated that TNF- $\alpha$  is produced by resident synovial lining cells, that comprise macrophages and fibroblasts, and responds to oedema formation and also to neutrophil influx [10]. According to others, we found increased levels of TNF- $\alpha$  in knee joints after zymosan stimulation, at times in which leukocyte infiltration and knee joint swelling were also observed [8, 9]. The fact that TNTP pre-treatment inhibited TNF- $\alpha$  generation in addition to IL-1 $\beta$  might contribute to the inhibition of zymosan-induced increase in knee joint thickness, even though the blockade of other mediators are probably also important for this effect. The inhibition of TNF- $\alpha$ , in addition to CXCL8/IL-8 and IL-1 $\beta$ , by TNTP also seems to account for neutrophil impairment.

The recognition of zymosan mainly occurs via toll-like receptor 2 (TLR2), which, in collaboration with CD14, responds for the pro-inflammatory signaling in zymosan-induced experimental arthritis in mice [7]. Resident

cells in knee joints including synovial macrophages, fibroblasts, and chondrocytes are believed to participate in the inflammatory response induced by zymosan, and the expression of TLR2 by these cells has been reported [31]. Ligand binding to TLR2 induces the activation of NF $\kappa$ B and the following synthesis of chemokines and cytokines during the inflammatory response. Compelling data demonstrate that cytokines and chemokines generated during the course of articular inflammation depend on NF $\kappa$ B. In the present study, we observed that TNTP were able to inhibit NF $\kappa$ B translocation into the nucleus of peritoneal murine macrophages stimulated with zymosan. Such result suggests that blockade of NF $\kappa$ B signaling pathway might respond for cytokine impairment in inflamed knee joints, since it has been demonstrated that the use of NF $\kappa$ B inhibitors reduced arthritic score in mice with rheumatoid arthritis due to the inhibition of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CXCL8/IL-8 [32–34]. It has been shown that NF $\kappa$ B blockade was able to inhibit mRNA and protein levels of such mediators in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis, articular chondrocytes, murine macrophages and human monocytes stimulated with zymosan [35–38]. In addition, we have previously observed that TNTP inhibited NF $\kappa$ B translocation and cytokine generation, in a murine model of allergic pleurisy as well as in *in vitro* stimulated splenocytes [4]. Overall, it is very likely that the antiinflammatory effects observed in zymosan-induced arthritis are related to the inhibition of NF $\kappa$ B translocation into the nucleus.

In conclusion, the current results reveal that TNTP presents remarkable antiinflammatory activity by inhibiting zymosan-induced knee joint inflammation. Our results suggest that this effect might depend on the blockade of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CXCL8/IL-8 synthesis via inhibition of NF $\kappa$ B signaling pathway. Moreover, we have also elucidated the mechanisms by which *C. guianensis* exerts its medicinal properties supporting the popular use of such species for the treatment of arthritis.

*Acknowledgments.* The authors are indebted to Leonardo Alves and Karina Costa for technical assistance and to Fernanda Schnoor for language revision. This work was supported by CNPq and Fundação Oswaldo Cruz grants (Brazil).

## References

- [1] Banerji B, Nigam SK. Wood constituents of Meliaceae: A review. *Fitoterapia* 1984; LV (1): 3–36.
- [2] Pereira JFG, Teixeira, Mazzei JL, Gilbert B. Characterization of the chemical constituents of *Carapa guianensis* Aublet by HPLC-DAD. *Boll Chim Farmaceutico* 1999; 138(2): 177.
- [3] Penido C, Costa KA, Pennaforte, RJ, Costa, MFS, Pereira, JFG, Siani, AC et al. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. *Inflamm Res* 2005; 54: 295–303.
- [4] Penido C, Costa, KA, Costa, MFS, Pereira, JFG, Siani, AC, Henriques, MGMO. Inhibition of allergen-induced eosinophil recruitment by natural tetranortriterpenoids is mediated by the suppression of IL-5, CCL11/eotaxin and NF $\kappa$ B activation. *Int. Immunopharmacol* 2006; 6: 109–21.

- [5] Hammer MLA, Johns EA. Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará (Brazil). *J Ethnopharmacol* 1993; 40: 53–75.
- [6] Lorenzi H, Matos FJ. Plantas Medicinais no Brasil: nativas, exóticas e cultivadas. In: Editora Nova Odessa. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002: 332–4.
- [7] 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.
- [8] Pettipher ER, Salter ED. Resident joint tissues, rather than infiltrating neutrophils and monocytes, are the predominant sources of TNF-alpha in zymosan-induced arthritis. *Cytokine* 1996; 8: 130–3.
- [9] Vicente AM, Guillen MI, Habib A, Alcaraz MJ. Beneficial effects of heme oxygenase-1 up-regulation in the development of experimental inflammation induced by zymosan. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307: 1030–7.
- [10] Bombini G, Canetti C, Rocha FAC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. *Eur J Pharmacol* 2004; 496: 197–204.
- [11] Wei X, Leung BP, Arthur HM, McInnes IB, Liew FY. Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in mice lacking IL-18. *J Immunol* 2001; 166: 517–21.
- [12] van de Loo FA, Arntz OJ, van Enckevort FH, van Lent PL, van den Berg WB. Reduced cartilage proteoglycan loss during zymosan-induced gonarthrosis in NOS2-deficient mice and in anti-interleukin-1-treated wild-type mice with unabated joint inflammation. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 634–46.
- [13] Williams RO, Feldmann M, Maini R. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 9784–8.
- [14] Kuwabara K, Yasui K, Jyoyama H, Maruyama T, Fleish JH, Hori Y. Effects of the second-generation leukotriene B(4) receptor antagonist, LY293111Na, on leukocyte infiltration and collagen-induced arthritis in mice. *Eur J Pharmacol* 2000; 402: 275–85.
- [15] Zimmermann M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16: 109.
- [16] Rosengren S, Firestein GS, Boyle DL. Measurement of inflammatory biomarkers in synovial tissue extracts by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10: 1002–10.
- [17] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall, RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265–75.
- [18] Dignam J, Lebovitz R, Roeder R. Accurate transcription initiation by RNAPolymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl. Acids Res.* 1983; 5: 1475–89.
- [19] 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: 1396–401.
- [20] Gegout P, Gillet P, Terlain B, Netter P. Zymosan-induced arthritis in rats. II. Effects of anti-inflammatory drugs. *Life Sci* 1995; 56: 389–94.
- [21] Nakagawa T, Akagi M, Hoshikawa H, Chen M, Yasuda T, Mukai S et al. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates leukocyte infiltration and articular cartilage destruction in rat zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2486–94.
- [22] Sharma JN, Buchanan WW. Pathogenic responses of bradykinin system in chronic inflammatory rheumatoid disease. *Exp Toxicol Pathol* 1994; 46: 421–33.
- [23] Rocha FAC, Aragão Jr AGM, Oliveira RC, Pompeu MML, Vale MR, Ribeiro RA. Periartthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflamm Res* 1999; 48: 485–90.
- [24] De Sanctis GT, MacLean JA, Qin S, Wolyniec WW, Grasmann H, Yandava CN et al. Interleukin-8 receptor modulates IgE production and B-cell expansion and trafficking in allergen-induced pulmonary inflammation. *J Clin Invest* 1999; 103: 507–15.
- [25] Kraan MC, Patel DD, Haringman JJ, Smith MD, Weedon H, Ahern, MJ et al. The development of clinical signs of rheumatoid synovial inflammation is associated with increased synthesis of the chemokine CXCL8 (interleukin 8). *Arthritis Res* 2001; 3: 65–71.
- [26] López-Armada MJ, Sánchez-Pernaute O, Largo R, Diez-Ortego I, Palacios I, Egido J et al. Modulation of cell recruitment by anti-inflammatory agents in antigen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 1027–30.
- [27] van den Berg WB. Arguments for interleukin 1 as a target in chronic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 81–4.
- [28] Bakker A, Joosten LAB, Arntz OJ, Helsen MMA, Bendele AM, van de Loo FAJ et al. Prevention of murine collagen-induced arthritis in the knee and ipsilateral paw by local expression of human interleukin-1 receptor antagonist protein in the knee. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 893–900.
- [29] van de Loo FAJ, Arntz OJ, Otterness IG, van den Berg WB. Protection against cartilage proteoglycan synthesis inhibition by anti-interleukin 1 antibodies in experimental arthritis. *J Rheumatol* 1992; 19: 348–56.
- [30] van den Berg WB, Joosten LAB, Helsen MMA, van de Loo AAJ. Amelioration of established murine collagen induced arthritis with anti-IL-1 treatment. *Clin Exp Immunol* 1994; 95: 237–43.
- [31] Liu-Bryan R, Pritzker K, Firestein GS, Terkeltaub R. TLR2 signaling in chondrocytes drives calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate crystal-induced nitric oxide generation. *J Immunol* 2005; 174: 5016–23.
- [32] Matsumoto N, Ariga A, To-e S, Nakamura H, Agata N, Hirano S et al. Synthesis of NF- $\kappa$ B Activation Inhibitors Derived from Epoxyquinomicin C. *Bioorg Med Chem Lett* 2000; 10: 865–9.
- [33] Umezawa K, Ariga A, Matsumoto N. Naturally occurring and synthetic inhibitors of NF-kappaB functions. *Anticancer Drug Des* 2000; 15: 239–44.
- [34] Aikawa Y, Yamamoto M, Yamamoto T, Morimoto K, Tanaka K. An anti-rheumatic agent T-614 inhibits NF-kappaB activation in LPS- and TNF-alpha-stimulated THP-1 cells without interfering with IkappaBalpha degradation. *Inflamm Res* 2002; 51(4): 188–94.
- [35] Onodera S, Nishihira J, Koyama Y, Majima T, Aoki Y, Ichiyama H et al. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates the expression of interleukin-8 messenger RNA in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients. Common transcriptional regulatory mechanism between interleukin-8 and interleukin-1 $\beta$ . *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1437–47.
- [36] Friedland JS, Constantin D, Shaw TC, Stylianou E. Regulation of interleukin-8 gene expression after phagocytosis of zymosan by human monocytic cells. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 447–54.
- [37] Pulai JI, Chen H, Im HJ, Kumar S, Hanning C, Hegde PS et al. NF- $\kappa$ B mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments. *J Immunol* 2005; 174: 5781–8.
- [38] Cheon H, Yu SJ, Yoo DH, Chae JJ, Song GG, Sohn J. Increased expression of pro-inflammatory cytokines and metalloproteinase-1 by TGF- $\beta$ 1 in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis and normal individuals. *Clin Exp Immunol* 2002; 127: 547–52.



# 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](#)