

Flora Lucena Sant'ana

**MECANISMO ANTIARTRÍTICO DA TRIPSINA ADMINISTRADA  
POR VIA ORAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi.

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Sant'ana, Flora Lucena

Mecanismo Antiartrítico da Tripsina Administrada por Via Oral / Flora Lucena Sant'ana ; orientador, Carlos Rogério Tonussi - Florianópolis, SC, 2013.

98 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Tripsina. 3. Artrite. 4. Nervo Vago. 5. Vias Descendentes Inibitórias. I. Tonussi, Carlos Rogério. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Flora Lucena Sant'ana

## **MECANISMO ANTIARTRÍTICO DA TRIPSINA VIA ORAL**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Florianópolis, de de 2013.

---

Prof.<sup>ª</sup>. Thereza C. M. de Lima, Dr.  
Coordenadora do Curso

### **Banca Examinadora:**

---

Prof. Carlos Rogério Tonussi, Dr.  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Aleksander Zampronio, Dr.  
Universidade Federal do Paraná

---

Prof. Giles Alexander Rae, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina



Este trabalho é dedicado a minha mãe,  
Márcia, e aos meus avós, Iveraldo e  
Iracema, meus eternos exemplos.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Carlos Rogério Tonussi, por ter aberto as portas do seu laboratório e da ciência, um novo mundo que tem crescido dentro de mim a cada dia.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório, Alessandra, Eduardo, Felipe, Franci Ellen, Lucas, Taciane e Vanessa, pela paciência, companhia, brigas e descontrações, tudo faz parte! À Vanessa ainda agradeço toda a ajuda dada na reta final, o que foi muito importante.

Agradeço à minha família, a cada um de seus componentes, que com suas particularidades ajudaram a moldar a minha pessoa. Cada dia que passei junto de vocês foi um dia feliz. Muito obrigada!

Agradeço o apoio incondicional que sempre recebi da minha mãe, Márcia, meu avô, Iveraldo, e minha avó, Iracema. Meus guias, meu exemplos, meus orgulhos. Agradeço a Deus por ter vocês, e agradeço a vocês por todo amor que sempre me foi dado. Amo muito vocês.

Agradeço a meu pai e sua família, que com o jeito Sant'ana, Sant'Ana ou Sant'Anna de ser me ensinaram muito sobre a vida.

Uma pessoa é feita das experiências que viveu, onde cada uma delas ajudou a moldar a personalidade e o que ela é no presente. Por isso agradeço aos meus amigos. Novos, velhos, ausentes, presentes, muito obrigada por participar da minha vida. Um agradecimento mais do que especial a Igor, Suellen, Diogo, Anna Gabriela e Nayana, que serão sempre. Agradeço a Guilherme também, por toda disposição e paciência que ele teve ao me ajudar com a montagem da dissertação.

Agradeço também aos meus amigos mais recentes em tempo, mas não menos importantes. Vivemos juntos intensamente esses dois anos, sofrendo juntos, reclamando juntos, sorrindo juntos e nos apoiando sempre que preciso. Meus especiais agradecimentos, junto de um grande PARABÊNS, a Amanda, Renata, Wagner, Marília, Leonardo, Sandro e o restante da turma. Mestres, enfim!

Não posso esquecer-me de agradecer às minhas companheiras de apartamento, Jeniffer e Leia, que fazem meus dias mais leves e divertidos.

Agradeço a todos os alunos, professores e funcionários do programa, por toda ajuda que me foi dada. Em especial os laboratórios da Professora Thereza e do Professor Giles, com todos os seus integrantes inclusos, que me ajudaram com material e com carinho.

Agradeço às minhas ratas, que sem elas esse trabalho realmente não seria possível. Meu respeito a vocês!

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.



E um dia os homens descobrirão que os discos  
voadores estavam apenas estudando a vida dos  
insetos...

(Mário Quintana)



## SUMÁRIO

	<b>RESUMO</b>	<b>i</b>
	<b>ABSTRACT</b>	<b>iii</b>
	<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>v</b>
	<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>vii</b>
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b>ix</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Artrite Reumatoide.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1</b>	<b>Farmacoterapia para a Artrite Reumatoide</b>	<b>4</b>
<b>1.2</b>	<b>O Nervo Vago .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.1</b>	<b>O Nervo Vago e a Inflamação.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.2</b>	<b>O Nervo Vago e a Medula Espinhal.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3</b>	<b>Receptor PAR-2 e o Parenzyme®/Tripsina.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Justificativa para o moedlo experimental.....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>Drogas.....</b>	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>Modelo Experimental: Artrite Induzida por CFA.....</b>	<b>32</b>
<b>4.4</b>	<b>Teste Algesimétrico: Medida da Incapacitação Articular.....</b>	<b>33</b>
<b>4.5</b>	<b>Mensuração do Edema Articular.....</b>	<b>35</b>
<b>4.6</b>	<b>Contagem de Leucócitos do Líquido Sinovial.....</b>	<b>35</b>
<b>4.7</b>	<b>Vagotomia Subdiafragmática.....</b>	<b>36</b>
<b>4.8</b>	<b>Lesão das Vias Serotoninérgicas e Noradrenérgicas Medulares.....</b>	<b>37</b>
<b>4.9</b>	<b>Administração por gavagem.....</b>	<b>38</b>
<b>4.10</b>	<b>Cálculo de Extrapolação Alométrica.....</b>	<b>39</b>
<b>4.11</b>	<b>Protocolo Experimental.....</b>	<b>40</b>
<b>4.12</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>5.1</b>	<b>Efeito da tripsina via oral.....</b>	<b>47</b>
<b>5.2</b>	<b>Efeito da Vagotomia Subdiafragmática na resposta da tripsina via oral.....</b>	<b>51</b>
<b>5.3</b>	<b>Efeito das neurotoxinas 6-hidroxidopamina e 5,7- dihidroxitriptamina na resposta da tripsina via oral.....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>77</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>



## RESUMO

**Palavras-chave:** Tripsina, artrite, nervo vago, vias descendentes inibitórias.

A artrite reumatoide é uma doença autoimune que em seu curso pode causar inatividade do paciente e levá-lo a óbito. Acredita-se que 1,5% da população mundial seja afligida pela doença, que não tem cura e os tratamentos disponíveis nos dias de hoje além de terem alto custo, podem causar efeitos adversos graves, limitando o tratamento da doença. A pesquisa em busca de medicamentos com menos efeitos adversos e de custo acessível faz-se então necessária. O presente estudo mostrou que a tripsina administrada em ratas pela via oral na dose de 2,95mg/Kg foi capaz de diminuir a dor e a inflamação articular em um modelo de artrite induzida por CFA, e que uma única administração foi capaz de manter o efeito antiartrítico durante os 7 dias de avaliação. Animais vagotomizados não tiveram melhora do quadro artrítico após a administração da tripsina na mesma dose anterior, indicando um papel vagal na atividade da enzima. Da mesma forma, a tripsina não teve efeito quando administrada em animais que receberam injeção intratecal das neurotoxinas 6-OHDA e 5,7-DHT. Esse resultado sugere o papel das vias descendentes inibitórias noradrenérgicas e serotoninérgicas, respectivamente, na ação da tripsina. As vias descendentes inibitórias monoaminérgicas não somente podem diminuir a nocicepção, como também, a partir da inibição do reflexo da raiz dorsal, seria capaz de controlar a inflamação articular. O presente trabalho propõe, então, que a ativação vagal seguida da liberação de monoaminas na medula pela via descendente inibitória compõem o mecanismo de ação da tripsina via oral, que pode ser considerada como uma alternativa de tratamento para doenças inflamatórias crônicas como a artrite reumatoide. Por extensão, esse trabalho sugere que ativadores orais de aferências do nervo vago subdiafragmático, e não absorvíveis, podem ser um novo ramo para o desenvolvimento de fármacos com menos efeitos colaterais.



## ABSTRACT

**Keywords:** Trypsin, arthritis, vagus nerve, descending inhibitory pathways.

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease that can cause severe physical incapacity or even involve several organs other than joints, eventually leading to death. RA affects 1.5% of the world's population, it has no cure, and the current medical treatment can cause severe adverse effects, or may be highly expensive. In such context, the research for new drugs with lower side effects and accessible price is needed. The present work showed that orally administered trypsin in female rats was able to reduce the nociception and the articular inflammation in a model of CFA-induced arthritis. These effects could be observed throughout the 7-day period of evaluation. Animals underwent subdiaphragmatic vagotomy did not show the improvement of the arthritic parameters after trypsin administration, suggesting the vagal mediation of trypsin effect. Likewise, trypsin had no effect in rats which received intrathecal injection of the neurotoxins, 6-OHDA and 5,7-DHT, suggesting the involvement of descending noradrenergic and serotonergic bulbo-medullar projections, respectively. The monoaminergic descending inhibitory pathway may be responsible for both antinociception and anti-inflammatory effects. Thus, the present work proposes that oral trypsin may cause vagal activation, which is followed by the activation of descending inhibitory pathways. Such mechanism may lead to a novel approach for the treatment of pain and inflammation that do not need to be absorbed, thus producing less side-effects.



## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1	Terminal axonal vagal e seus receptores.....	13
Fig. 2	Ilustração do Reflexo da raiz dorsal.....	19
Fig. 3	Esquema de ativação do receptor PAR-2.....	23
Fig. 4	Aparelho para avaliação da incapacitação articular e sapatilha metálica.....	34
Fig. 5	Foto ilustrativa da medida do diâmetro articular.....	35
Fig. 6	Ilustração esquemática do local da dissecação do nervo vago e local da incisão da cirurgia.....	37
Fig. 7	Diagrama do local da incisão e foto ilustrativa da injeção intratecal.....	38
Fig. 8	Efeito da tripsina via oral na incapacitação e no diâmetro articular.....	49
Fig. 9	Efeito da tripsina via oral nas contagens total e diferencial de leucócitos no líquido sinovial.....	50
Fig. 10	Perfil de resposta da vagotomia subdiafragmática na incapacitação e no diâmetro articular.....	52
Fig. 11	Perfil de resposta da vagotomia subdiafragmática nas contagens total e diferencial de leucócitos no líquido sinovial.....	53
Fig. 12	Bloqueio do efeito da tripsina via oral pela vagotomia na incapacitação e no diâmetro articular.....	56
Fig. 13	Bloqueio do efeito da tripsina via oral pela vagotomia nas contagens total e diferencial de leucócitos no líquido sinovial.....	57
Fig. 14	Perfil de resposta das neurotoxinas 6-OHDA e 5,7-DHT na incapacitação e no edema articular.....	59
Fig. 15	Perfil de resposta das neurotoxinas 6-OHDA e 5,7-DHT nas contagens total e diferencial de leucócitos no líquido sinovial.....	60
Fig. 16	Antagonismo do efeito da tripsina via oral pelas neurotoxinas 6-OHDA e 5,7-DHT na incapacitação e no edema articular.....	62
Fig. 17	Antagonismo do efeito da tripsina via oral pelas neurotoxinas 6-OHDA e 5,7-DHT nas contagens total e diferencial de leucócitos no líquido sinovial.....	63
Fig. 18	Esquema demonstrativo do mecanismo de ação da tripsina.....	76



**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Lista de fármacos, dose, via de administração e veículo .....32



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5,7-DHT – 5,7-dihidroxitriptamina

6-OHDA – 6-hidroxidopamina

AIA – artrite induzida por antígeno

AINE's – anti-inflamatórios não esteroidais

CFA – Adjuvante completo de Freund, do inglês complete Freund's adjuvant

COX – ciclooxigenase

DA – diâmetro articular

DMARD – disease-modifying antirheumatic drugs

EPM – erro padrão da média

EULAR – European League Against Rheumatism

FDA – Food and Drug Administration - USA

IASP – International Association for the Study of Pain

IL – interleucina

NTS – núcleo do trato solitário

PAD – despolarização do aferente primário, do inglês primary afferent depolarization

PAG – matéria cinzenta periaquedutal, do inglês periaquedutal grey matter

PAR-2 – receptor ativado por protease tipo 2, do inglês protease-activated receptor-2

RRD – reflexo da raiz dorsal

TEP – tempo de elevação de pata

TGI – trato gastrointestinal

TMB – taxa metabólica basal

TNF – fator de necrose tumoral, do inglês tumor necrosis factor

Trip – tripsina



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença auto-imune crônica que se inicia em articulações, mas pode se transformar em uma doença sistêmica. É caracterizada pela inflamação das articulações, hiperalgesia sinovial, infiltração de células inflamatórias e angiogênese, aumentando a vascularização articular (Lee e Weinblatt, 2001).

Inicialmente há a formação de um edema articular, seguida de hiperalgesia causada por sinoviócitos tipo fibroblastos e ainda a infiltração de células B e T, macrófagos e plasmócitos. A formação do *pannus*, tecido sinovial invasivo formado principalmente por fibroblastos e células mononucleares, leva à perda de tecido ósseo e cartilaginoso pelo aumento da expressão de enzimas proteolíticas, que permitem a penetração do *pannus* na cartilagem (Shiozawa, Shiozawa e Fujita, 1983).

A causa da AR ainda é desconhecida, mas se acredita que tanto fatores genéticos quanto fatores ambientais, juntamente com reações autoimunes sistêmicas mediadas por células T, precipitam uma cascata de alterações imunológicas, dando início à patologia (Melzack e Wall, 2006). Vários mediadores inflamatórios participam da patogênese da artrite reumatoide, como o fator de necrose tumoral tipo alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ), que não somente estão envolvidas no desenvolvimento da doença, como na sua manutenção da mesma (Cvetkovic et al., 2002). De forma sinérgica, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  estimulam a proliferação celular na articulação, a produção de prostaglandinas, a

expressão de metaloproteinase e a liberação de mais citocinas (Lee e Weinblatt, 2001; Dayer, Beutler e Cerami, 1985).

As metaloproteinases são enzimas que remodelam e destroem a matriz extracelular. Em cultura de sinoviócitos foi mostrado que TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  induzem a produção das metaloproteinases e também já é descrito na literatura que altos níveis de atividade das metaloproteinases contribuem para a degradação dos tecidos ósseo e cartilaginoso articular (Martel-Pelletier et al., 1994).

Os sintomas da AR frequentemente alcançam a articulação contralateral, dando uma característica de simetria para a doença, e outras articulações próximas, podendo também ter envolvimento sistêmico, resultando em óbito (Khurana e Berney, 2005). As articulações pequenas, como as das mãos, pés, tornozelos, joelhos e pulsos, desenvolvem a doença mais facilmente, e em formas mais severas da doença mais de 20 articulações podem estar envolvidas (Harris, Schur e Maini, 2006).

O pico da incidência da AR acontece entre as idades de 40-60 anos, e a artrite acomete 1% a 1,5% da população mundial, tendo predominância no sexo feminino, onde a razão de mulheres:homens em tratamento é de 2-4:1 (Silman, 2001). Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que a artrite está em quarto lugar no quesito de causas globais mais importantes de inaptidão de mulheres e em oitavo lugar quando se trata de homens (Murray e Lopez, 1997).

A Portaria nº66 de 2006 do Ministério da Saúde leva em consideração os seguintes itens como marcadores da atividade da doença:

- Avaliação dos sintomas e estado funcional (gradação da dor articular, rigidez matinal e severidade da fadiga);
- Avaliação do envolvimento articular e manifestações extra-articulares (envolvimento articular: edema, dor, perda de movimento e deformidade; manifestações extra-articulares: febre, náuseas, anorexia e perda de peso);
- Testes laboratoriais para Proteína C reativa e velocidade de eritrossedimentação, ambos marcadores inespecíficos, mas que refletem o grau de inflamação sinovial;
- Técnicas de imagem como radiografias, ressonância nuclear magnética e ultra-sonografia de alta resolução, que podem identificar o dano, assim como acompanhar o seu desenvolvimento.

As queixas predominantes dos pacientes acometidos por AR são dor e rigidez articular, provocada pelo inchaço das articulações, limitando o movimento desta articulação pelo paciente, se tornando um dos principais prejuízos causados pela doença. Essa limitação do movimento é piorada pelo processo de enfraquecimento muscular, também encontrado em pacientes artríticos (Khurana e Berney, 2005).

De acordo com a EULAR (European League Against Rheumatism), o tratamento ideal para um paciente com artrite é uma combinação de tratamentos farmacológico (analgésicos e anti-inflamatórios não-esteroidais, entre outros) e não-farmacológico (educação, exercícios, mudança de estilo de vida) (Jordan et al., 2003).

### **1.1.1 Farmacoterapia para a Artrite Reumatoide**

Os principais medicamentos usados no tratamento da artrite reumatoide nos dias de hoje são os anti-inflamatórios não-esteroidais, os fármacos modificadores do curso de doenças (DMARD), os corticosteroides e os mais recentes fármacos anticitocinas.

#### **❖ Anti-inflamatórios não-esteroidais**

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) têm sua ação terapêutica a partir da inibição das ciclooxigenases (COX's) (Vane, 1971), enzimas que, em uma atividade catalítica de duas etapas, transformam o ácido araquidônico em prostanóides. Existem dois tipos de COX bem descritas na literatura, a COX-1 e a COX-2.

A COX-1 é expressa de forma constitutiva na maioria dos tecidos, em um nível constante, e tem um papel geral de manutenção do organismo. Os efeitos adversos deletérios dos inibidores da COX-1 permitiram a dedução dos efeitos fisiológicos desta enzima. A produção de prostaciclina pelas células do Trato Gastrointestinal protege a mucosa destes órgãos e a produção de tromboxano A<sub>2</sub> nas plaquetas aumenta a agregação plaquetária, por exemplo. A COX-2 tem sua expressão induzida em um processo inflamatório. Estímulos como citocinas pró-inflamatórias induzem COX-2, e citocinas anti-inflamatórias diminuem esta indução. A COX-2 origina, então, prostanóides mediadores da inflamação, levando a acreditar que a ação anti-inflamatória dos AINEs seja principalmente por inibição da COX-2, enquanto os efeitos adversos se originam, substancialmente, da inibição de COX-1 (Vane e

Botting, 2001; Vane, Bakhle e Botting, 1998). A maioria dos AINEs inibem ambas as enzimas, embora se diferenciem pelo grau de inibição de cada isoforma.

Fármacos que inibem a COX-1 e são amplamente utilizados na artrite são o diclofenaco, ibuprofeno, indometacina e tenoxicam. Nos pacientes artríticos, o uso de AINEs produz um ótimo efeito no alívio da dor e da inflamação. São eficazes tanto via oral quanto em uso tópico (Grace et al., 1999; Dickson, 1991), porém as ulcerações gástricas, danos renais e disfunção plaquetária são os principais efeitos adversos dessas drogas, o que faz com que o tratamento da artrite com esta classe seja diminuído.

Os Coxibes, AINEs que inibem seletivamente a ciclooxigenase-2 (COX-2), como o celecoxibe e o etoricoxibe, se tornam uma opção de tratamento melhor, já que tem a mesma eficácia analgésica e antiinflamatória (McKenna et al., 2001), sem promover os danos para o trato gastrointestinal (Boers, 2001). Porém, os coxibes facilitam acidentes trombo-embólicos. A inibição da COX-2 diminui a produção de prostanóides envolvidos na inflamação, porém tem pouco efeito nas plaquetas, permitindo que estas ainda produzam TXA<sub>2</sub>, que leva a agregação plaquetária e posterior formação de trombos (Weir, et al., 2003). Este grave efeito adverso fez com que os poucos representantes desta classe no mercado passassem a ser vendidos com receituário especial e somente são receitados a pacientes para os quais o tratamento com inibidores da COX-1 traria sérios riscos gastrointestinais e, mesmo assim, somente após avaliação de risco cardiovascular. Além de seus efeitos adversos, os AINEs não inibem a progressão da doença, o que torna seu uso ineficaz ao longo do tempo.

## ❖ Glicocorticoides

Os corticosteroides, ou glicocorticoides, ativam receptores intracelulares específicos para glicocorticoides, pertencentes à superfamília de receptores nucleares. Os receptores nucleares em seu estado não-ligado, ou de repouso, se encontram no citoplasma e fazem parte de um complexo de proteínas que incluem as proteínas chamadas proteínas do choque térmico (*heat shock proteins*; HSP). Após a ligação do corticosteroide, o receptor se dissocia das HSP's, sofre uma mudança conformacional e expõe um domínio ligante de DNA que, ao alcançar o núcleo, é capaz de induzir ou reprimir a transcrição gênica a partir de diversos mecanismos possíveis (Rang e Dale, 2007; Wilkens, 1995).

Os glicocorticoides são, em sua maioria, anti-inflamatórios e imunossupressores. Eles são capazes de diminuir a transcrição dos genes de citocinas tanto na fase de indução quanto na fase efetora da resposta imunológica (Schacke, Docke e Asadullah, 2002). Por este motivo, o uso crônico de glicocorticoides como a hidrocortisona, prednisolona, dexametasona e betametasona, pode suprimir uma resposta a infecções e lesões, permitindo a incidência de uma infecção oportunista, tornando a supressão imunológica um dos seus efeitos adversos. Os efeitos adversos dos glicocorticoides surgem a partir de seu uso sistêmico prolongado.

Outros efeitos adversos que podem ocorrer com o uso prolongado de glicocorticoides são: prejuízo na cicatrização de lesões, ulcerações pépticas, desequilíbrio no balanço eletrolítico, insuficiência supra-renal se o tratamento for interrompido abruptamente, possível diabetes e

atrofia e fraqueza muscular, além da Síndrome de Cushing (paciente adquire uma fisionomia característica com face em lua cheia e aumento da gordura abdominal e corcova. Há também aumento da pressão arterial, euforia, catarata, esquimoses e necrose avascular).

O principal efeito adverso dos glicocorticoides, ainda assim, é a osteoporose. O risco de fraturas é a principal limitação do tratamento de longo prazo, e acontece por diminuição da densidade óssea, redução da função dos osteoblastos e aumento da atividade dos osteoclastos.

### **❖ Imunossupressores e Fármacos Anti-reumatóides Modificadores da Doença**

Além dos glicocorticoides, outros fármacos imunossupressores tem efeito antiartrítico, como a ciclosporina A, a azatioprina e a leflunomida, principalmente. Todos estes diminuem a resposta imune do paciente pela diminuição da produção de citocinas, proliferação de células T e a inibição da síntese de purinas e pirimidinas (Morris, 1995), porém são todas citotóxicas, podendo causar insuficiência hepática, hipertensão e nefrotoxicidade. Algumas referências didáticas divergem quanto à classificação destes medicamentos, e os classificam como DMARDs.

Os fármacos modificadores do curso de doenças (DMARD) são imunomoduladores que consistem de alternativa para os AINEs, já que estes são capazes de melhorar os sintomas e reduzir a atividade da doença a partir da redução da degradação articular, retardando a progressão da doença, de forma que são tidos hoje em dia como primeira escolha de tratamento (Mota et al., 2012). Os DMARDs

diminuem sintomas como dor e inchaço articular e duração e severidade da rigidez matinal, diminuem marcadores inflamatórios, melhoram o estado funcional da articulação e retardam a progressão radiológica da doença. Eles formam um grupo heterogêneo de agentes terapêuticos com estruturas químicas não relacionadas e mecanismos de ação diferentes.

Os principais DMARDs são o metotrexato, sulfassalazina, cloroquina e compostos de ouro. Bonderson, em 1997, fez uma revisão sobre os prováveis mecanismos de ação dos DMARDs. O metotrexato é um antagonista do ácido fólico e tem atividade citotóxica e imunossupressora; a sulfassalazina remove metabólitos tóxicos do oxigênio produzidos por neutrófilos; acredita-se que o efeito da cloroquina venha da inibição da síntese protéica e de RNA e DNA; por fim, os compostos de ouro têm seu efeito terapêutico pela inibição da indução de IL-1 e TNF- $\alpha$ .

Os efeitos adversos desta classe começam por ulcerações bucais e seguem com distúrbios gastrointestinais, toxicidade ocular, cirrose hepática e anormalidade hematológica, podendo aparecer em até 40% dos pacientes. Os DMARDs também tem a desvantagem de normalmente serem utilizados como terapia combinada junto com AINEs (Haibel e Specker, 2009), o que faz com que apareça efeitos adversos de ambas as drogas.

### ❖ **Fármacos Anti-citocinas**

Por fim, os fármacos para o tratamento da artrite reumatoide mais recentes no mercado são os fármacos que bloqueiam seletivamente as

citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . São conhecidos como biofármacos, pois são anticorpos frutos de engenharia recombinante, isto é, produzidos artificialmente a partir de genes clonados e outras proteínas, e representam um avanço no âmbito do tratamento de inflamações crônicas (Choy e Panayi, 2001; Carterton, 2000). Os principais representantes desta classe são: infliximabe, adalimumabe, etanercept e anaquinra. O infliximabe e o adalimumabe são anticorpos artificiais combinando partes da imunoglobulina de camundongos e de humanos (moléculas quiméricas) para evitar a sua rejeição pelo nosso organismo. O etanercept é uma combinação da forma solúvel do receptor de TNF- $\alpha$  ligada ao fragmento Fc das imunoglobulinas (parte comum dos anticorpos). Por causa da porção Fc, o etanercept pode se ancorar nos tecidos, aumentando sua permanência no organismo. O etanercept se liga fortemente ao TNF- $\alpha$  e inibe seus efeitos biológicos (Maini e Taylor, 2000). Já o anaquinra funciona como antagonista da IL-1 $\beta$ . Na verdade, trata-se de um antagonista natural do organismo humano, o IL-1RA, produzido por clonagem em *E. coli*. Este se liga com alta afinidade aos receptores da citocina, presentes na célula, impedindo a ligação da mesma aos seus receptores.

Ambas as citocinas citadas são pró-inflamatórias e importantes para a formação da artrite. O uso desses fármacos pode não só melhorar a doença como inibir o dano articular (Suresh, 2010; Maini e Taylor, 2000). As principais desvantagens dessa terapia são duas: a susceptibilidade do indivíduo a infecções novas por supressão do sistema imunológico, e o alto custo de tratamento, já que a produção destes medicamentos, além de difícil, tem custo elevado, aumentando

seu preço e limitando sua utilização clínica para pacientes que não respondem adequadamente a outras terapias (Schoels et al., 2010).

Tendo em vista o descrito acima, a falta de um tratamento que seja eficaz, com poucos efeitos adversos, ou efeitos adversos menos graves, e/ou o alto custo das medicações disponíveis para tratamento da artrite reumatoide atualmente, torna necessária a pesquisa por novas estratégias farmacológicas ou não farmacológicas para o tratamento da doença.

## **1.2 O Nervo Vago**

No contexto de se buscar novas estratégias para o tratamento da artrite reumatoide que minimizem os efeitos colaterais dos fármacos tradicionais e maximizem seus efeitos terapêuticos, recentemente tem aparecido a estimulação vagal como possibilidade.

O nervo vago é o décimo par de nervos cranianos e se caracteriza como a principal inervação das cavidades torácica e abdominal (Berthoud e Neuhuber, 2000). O nervo se divide em aferência e eferência ao passar pelo foramen jugular e a partir de então diversos ramos são originados até que o vago alcance sua porção abdominal, ou porção subdiafragmática. O nervo vago é também o principal condutor periférico do Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático, responsável por 75% deste (Guyton e Hall, 2000).

O Sistema Parassimpático é conhecido como o sistema que controla as funções corporais de repouso e digestão, momento em que o corpo repõe suas energias. Seus neurônios pré-sinápticos são originados no tronco cerebral e nos segmentos medulares sacrais S2-S4 e seus

neurônios pós-ganglionares se encontram nos gânglios parassimpáticos, geralmente próximo aos seus órgãos ou tecidos alvo. O neurotransmissor do sistema parassimpático é a acetilcolina, que é liberada tanto pelos neurônios pré-ganglionares quanto pós-ganglionares. A liberação de acetilcolina pelos neurônios pré-ganglionares é capaz de ativar receptores colinérgicos nicotínicos na membrana do neurônio pós-ganglionar. Os receptores colinérgicos nicotínicos são canais iônicos permeáveis a cátions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^+$ ) que despolarizam a membrana da célula em que se encontram, excitando-a. No entanto, a transmissão colinérgica ganglionar é comum tanto para o sistema parassimpático quanto para o sistema simpático, fazendo com que a manipulação farmacológica desse tipo de receptor nicotínico afete ambas as divisões do Sistema Nervoso Autônomo (Guyton e Hall, 2000).

A porção subdiafragmática do nervo vago se divide em nervo vago subdiafragmático ventral e nervo vago subdiafragmático dorsal. O nervo vago subdiafragmático ventral se subdivide ainda nos ramos hepático, gástrico anterior e celíaco anterior (ou acessório), enquanto o nervo vago subdiafragmático dorsal se subdivide nos ramos gástrico posterior e celíaco posterior, inervando, assim, todo o abdômen e o trato gastrointestinal (TGI).

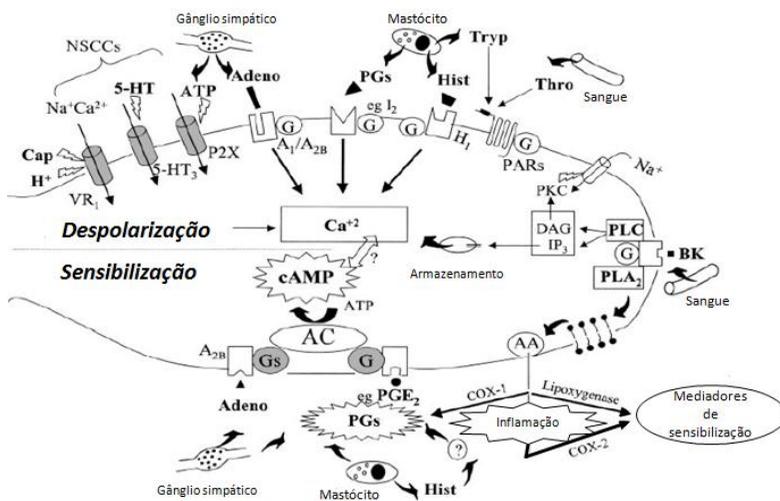
As aferências vagais no TGI são encontradas comumente nas camadas musculares, no plexo mientérico e na lâmina própria da mucosa dos órgãos que inervam, estruturas com a qual os terminais axonais vagais estão intimamente interligados, possibilitando a detecção de substâncias como hormônios, peptídeos e nutrientes, principalmente pelas aferências vagais encontradas no intestino.

A ativação de aferentes viscerais pode se dar em três processos diferentes. O primeiro processo é por ativação direta, geralmente envolvendo canais iônicos, e esse processo pode funcionar como uma via de sinalização sensorial discreta, onde a aferência visceral responde de forma secundária ao estímulo após a liberação de um mediador pela célula sensorial primária, ou ainda como um modulador indiscriminado da sensibilidade visceral, caso que acontece em situações de inflamação ou injúria (Kirkup, Brunsten e Grundy, 2001).

O segundo processo se caracteriza por uma sensibilização, que pode acontecer na ausência de uma estimulação direta, mas que normalmente resulta em uma hiperexcitabilidade tanto a estímulos químicos quanto a estímulos mecânicos. Por fim, o terceiro processo se dá pela modificação do fenótipo da aferência, como, por exemplo, alterações na expressão de canais e receptores presentes na aferência (Kirkup, Brunsten e Grundy, 2001). Não somente os sinais químicos podem estimular as aferências viscerais, como também sinais mecânicos, por exemplo, já que nessas aferências são encontrados mecanorreceptores, termorreceptores e osmoreceptores, além dos quimiorreceptores (Berthoud e Neuhuber, 2000).

Desta forma, substâncias que alcancem o lúmen dos órgãos do TGI podem ativar receptores presentes nas terminações periféricas luminiais das aferências viscerais. Considerando principalmente os quimiorreceptores, diversas substâncias podem ser capazes de despolarizar ou sensibilizar o nervo vago a partir da ativação da vasta gama de receptores encontrados em seus terminais axonais periféricos (Fig. 1) (Kirkup, Brunsten e Grundy, 2001; Berthoud e Neuhuber, 2000).

Logo, qualquer agonista ou antagonista de algum dos receptores encontrados nas aferências vagais pode modular farmacologicamente as funções do nervo vago, desde as funções de motilidade e controle de ingestão alimentar, até as funções imunoprotetoras e antinociceptivas. A ativação vagal por sinais do sistema imune (citocinas pró-inflamatórias), por exemplo, funciona como um aviso para o sistema nervoso central de que um processo patológico está acontecendo nas vísceras (Watkins, Maier e Goehler, 1995), o que levou pesquisadores a desenvolver a tese de que o nervo vago subdiafragmático é uma importante interface neural entre o sistema imune e o cérebro (Goehler et al., 2000).



**Fig. 1:** Terminal axonal vagal presente no Trato Gastro-intestinal e seus receptores. Os receptores dos terminais axonais podem despolarizar ou sensibilizar o nervo vago, dando início a uma resposta neuronal. Figura modificada de Kirkup, Brunnsden e Grundy, 2001.

### 1.2.1 O Nervo Vago e a Inflamação

Os processos protetores iniciados pelo nervo vago são capazes de controlar a inflamação (van der Zanden, Boeckxstaens e De Jonge, 2009; Borovikova et al., 2000a) a partir da estimulação de um reflexo anti-inflamatório colinérgico (Van der Zanden, Boeckxstaens e Jonge, 2009).

A estimulação do nervo vago, que é a principal inervação do Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático, inicia um reflexo vago-vagal anti-inflamatório, conhecido como reflexo anti-inflamatório colinérgico. O nervo vago libera acetilcolina de forma direta, pelas eferências vagais, ou indireta, provocando a liberação de acetilcolina nas sinapses pré-ganglionares de neurônios catecolaminérgicos, ativando o nervo esplênico situado de forma pós-ganglionar, que alcança o baço e provoca a liberação de acetilcolina (Rosas-Ballina et al., 2008; Huston et al., 2006). A acetilcolina liberada age em seus receptores nicotínicos presente em macrófagos e outras células de sistema imunológico, diminuindo a produção e liberação de citocinas e controla o processo inflamatório (Wang et al., 2003; Borovikova et al., 2000).

Recentemente tem-se demonstrado o envolvimento do nervo vago na resolução do quadro de artrite reumatoide. Dados da literatura mostram que a estimulação do nervo vago pode amenizar o curso da artrite, diminuir a produção e a liberação de citocinas e outros mediadores da doença e ainda inibir a formação do edema articular em ratos (Li et al., 2010; van Maanen et al. 2009a,b; Zhang et al., 2008), muitos desses efeitos acontecem a partir da ativação de receptores

nicotínicos encontrados em macrófagos e outras células do sistema imunológico presentes na sinóvia.

Apesar de não haver inervação parassimpática na articulação, dados da literatura mostram que os receptores nicotínicos responsáveis pelo efeito anti-inflamatório relatado são expressos em tecido sinovial e nos sinoviócitos tipo fibroblastos (Van Maneen et al., 2009b), e ainda foi descrito a presença de um sistema colinérgico não-neuronal em células sinoviais humanas, onde células tipo mononucleares e sinoviócitos tipo fibroblastos expressam, em grande número, colina-transferase, enzima que transforma colina em acetilcolina, indicando que a acetilcolina pode ser produzida nessas células (Grimsholm et al., 2008). De toda forma, a ação colinérgica não precisa ser diretamente na articulação, podendo ser regulada pelo timo e o baço, que irão modular a função de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, afetando a inflamação na articulação artrítica.

Todos os estudos sobre a ação da acetilcolina na resolução da artrite foram feitos com nicotina, principal agonista nicotínico, e um agonista nicotínico sintético, o AR-R17779 (Van Maneen, 2009a). Porém a nicotina somente é usada na clínica para auxiliar pessoas a pararem de fumar, pois seus efeitos são principalmente ganglionares e desencadeiam respostas periféricas complexas, e o composto AR-R17779 ainda é usado somente de forma experimental e não é considerado como uma opção de tratamento. Também foram feitas pesquisas com o composto CNI-1493, que tem alta capacidade de estimular o nervo vago e iniciar o reflexo anti-inflamatório colinérgico, e seus efeitos foram vistos inclusive em modelo experimental de artrite (Larsson et al., 2005; Bernik et al., 2002). Porém ainda é desconhecido

como o CNI-1493 ativa o nervo vago e gera o reflexo anti-inflamatório colinérgico.

Além destes, o único agonista nicotínico em testes clínicos é o GTS-21, que é considerado para o tratamento da Doença de Alzheimer, onde foi mostrado que este aumenta a capacidade cognitiva e tem papel neuroprotetor (Kitagawa et.al., 2003; Nanri et al., 1998), porém o GTS-21 não é considerado como tratamento para inflamação, assim como os outros agonistas nicotínicos usados na clínica, como a galamina, deixando em aberto o campo de drogas capazes de estimular o nervo vago e gerar uma resposta anti-inflamatória.

### **1.2.2 O Nervo vago e a Medula Espinhal**

A estimulação do nervo vago também modula a nocicepção (Khasar et al., 2003; Jänig et al., 2000; Gebhart e Randich, 1992) e já foi demonstrado na literatura que a antinocicepção provocada pelo nervo vago sofre modulação de substratos medulares e é influenciada por receptores monoaminérgicos espinais (Randich e Aicher, 1988; Ren, Randich e Gebhart, 1988).

As aferências vagais transmitem a informação sensorial do TGI para o Sistema Nervoso Central através do Núcleo do Trato Solitário (NTS). O NTS faz a interface entre o sistema autônomo e o sistema sensorial. Os neurônios de segunda ordem no NTS projetam-se para outros núcleos centrais, estabelecendo uma via neural bem organizada que alcança, entre outros, o hipotálamo, a amígdala, e os núcleos monoaminérgicos, o *Locus Coeruleus* e o Núcleo da Rafe, além de

projeções diretas para a medula espinhal (Jänig, 1996; Paxinos, 1995; Mtui et al., 1993; Beitz, 1982; Clavier, 1978).

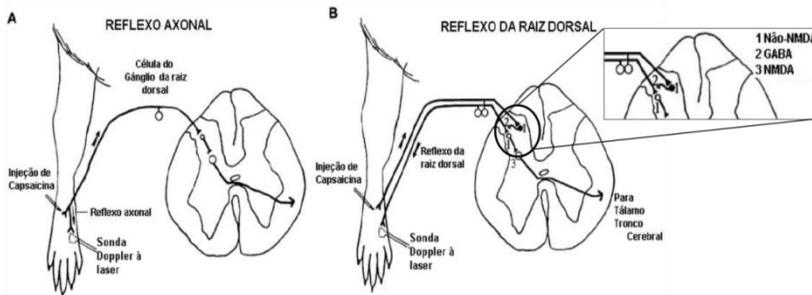
O *Locus Coeruleus* e o Núcleo da Rafe são os núcleos centrais de origem dos neurônios noradrenérgicos e serotoninérgicos, respectivamente, e sua ativação pode iniciar um sinal inibitório medular, que é conhecido como Via Inibitória Descendente Medular, e essa via é responsável pela diminuição da nocicepção (Millan, 2002).

O principal mecanismo antinociceptivo desta via se dá pela ativação de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos pela noradrenalina e de receptores 5HT<sub>1</sub> pela serotonina, ambos receptores encontrados na membrana da terminação central do aferente primário no corno dorsal da medula. Tanto o receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico e o receptor 5HT<sub>1</sub> fazem parte da grande família de receptores acoplados a proteína G (GPCR's) e, no caso destes, a proteína G em questão é a G<sub>i</sub>, proteína com função inibitória que, quando ativada, inibe a ciclase de adenilil solúvel, abre canais de potássio e fecha canais de cálcio, diminuindo o influxo deste, resultando em uma hiperpolarização desta célula neuronal (para revisão ler Starke, Göthert e Kilbinger, 1989). A liberação de neurotransmissores na fenda sináptica é então diminuída e como consequência diminui a neurotransmissão medular, provocando analgesia em diversos modelos experimentais (Saadí, 2012; Shiiba, 2012; Millan, 2002). A medula espinhal não somente participa do controle da nocicepção como também é responsável pela modulação da inflamação periférica.

As fibras aferentes primárias alcançam o corno dorsal da medula espinhal, terminando principalmente nas lâminas I, II e V (Todd e Koeberg, 2006; Millan, 2002), transmitindo a informação sensorial da

periferia para a medula de forma ortodrômica. Substâncias algogênicas são capazes de causar a despolarização do aferente primário (PAD), que transmite esses impulsos para o corno dorsal. O PAD libera neurotransmissores na fenda sináptica que ativam outros receptores no corno dorsal, responsáveis pela ascendência deste sinal até o SNC, porém estímulos sustentados podem causar sensibilização medular que resulta na despolarização de terminais centrais destes mesmos nociceptores e a deflagração de potenciais de ação anterógrados.

Esse processo acontece a partir de um recrutamento de interneurônios gabaérgicos, que ativam receptores GABA<sub>A</sub> nos terminais centrais dos nociceptores, permitindo a saída de íons cloreto e sua consequente despolarização. Este efeito do GABA sobre os nociceptores se deve à expressão de um trocador de íons, o NKCC1, na membrana do aferente primário, que carrega para dentro da célula dois íons Cl<sup>-</sup>, um íon Na<sup>+</sup> e um íon K<sup>+</sup>, aumentando a concentração de cloreto dentro da célula acima do normalmente encontrado em neurônios. Assim, quando o GABA ativa seus receptores, acontece o efluxo de cloreto, ao invés do influxo, tornando a célula mais positiva e despolarizando a membrana, fazendo com que esse aferente primário agora transmita o sinal de forma antidrômica, isto é, da medula espinhal para a periferia. Este processo é conhecido como o Reflexo da Raíz Dorsal (RRD; Fig. 2; Willis, 1999), e é responsável pela liberação de substâncias pró-inflamatórias na periferia (Sluka, Willis e Westlund, 1995) que, considerando um caso de artrite, é capaz de exacerbar o quadro inflamatório na articulação.



**Fig. 2:** Ilustração do Reflexo da Raiz Dorsal. Em A, a injeção intradérmica de capsaicina causa vasodilatação local por um mecanismo denominado Reflexo Axonal e pela ativação da via nociceptiva na medula. Em B, a injeção de capsaicina ativa circuitos medulares que resultam no reflexo da raiz dorsal, o qual produz vasodilatação na região adjacente à lesão. O Reflexo da Raiz Dorsal é dependente de receptores de glutamato não-NMDA e interneurônios e receptores gabaérgicos (Rees et al., 1995), mostrados no detalhe. Imagem modificada de Willis, 1999.

Pelo exposto, temos então, um firme suporte para sustentar que a estimulação vagal e a modulação da transmissão medular podem ser considerados mecanismos alternativos para o tratamento da artrite reumatoide. De um ponto de vista prático, uma ferramenta que permitisse a ativação específica deste mecanismo vagal, que não fosse invasiva como a estimulação elétrica direta que depende de um procedimento cirúrgico, seria de grande valia.

### 1.3 Receptor PAR-2 e o Parenzyme®/Tripsina

Essa introdução nos conduz a um antigo medicamento que embora tenha sido um sucesso de vendas à sua época, foi até hoje pouco

compreendido, o Parenzyme<sup>®</sup>. Uma combinação de tripsina e  $\alpha$ -quimotripsina forma o Parenzyme<sup>®</sup>, que foi um medicamento amplamente utilizado como anti-inflamatório na década de 50, quando Gustav J. Martin, pesquisador e diretor de pesquisa da extinta indústria farmacêutica *National Drug*, acreditou que enzimas proteolíticas poderiam ter ação sistêmica (Scheindlin, 2007).

Estudos usando diretamente o Parenzyme<sup>®</sup> foram feitos mostrando seu efeito anti-inflamatório, inclusive em pós-operatórios (Barney, 1967; Miller et al., 1959). Martin acreditava em um efeito sistêmico completo da enzima e ainda conseguiu mostrar que a tripsina era parcialmente absorvida no intestino, numa proporção de 40% em uma situação ótima (Sullivan e Martin, 1960; Martin, Brendel e Beiler, 1957). A partir daí várias formas farmacêuticas foram desenvolvidas e muitos produtos similares surgiram no mercado, mostrando o sucesso do Parenzyme<sup>®</sup>, levando Martin a declarar que havia chegado a Era da Enzimologia Clínica (Scheindlin, 2007).

Martin e colaboradores acreditavam que a tripsina exercia seu efeito anti-edematogênico a partir da facilitação da drenagem da área inflamada, aumentando a permeabilidade, causando vasodilatação e reduzindo a viscosidade do fluido (Martin, Brendel e Beiler, 1955). Porém, nenhuma outra proposição quanto ao mecanismo de ação da enzima foi feita até hoje, levando à retirada do Parenzyme<sup>®</sup> do mercado.

Até o final da década de 60, a entrada de pedido para comercialização de uma nova droga no FDA (Food and Drug Administration) só exigia prova de segurança, que não incluía testes carcinogênicos nem estudos de reprodução de dados. Entre as décadas de 60 e 70, as exigências do FDA para cadastro e permissão de

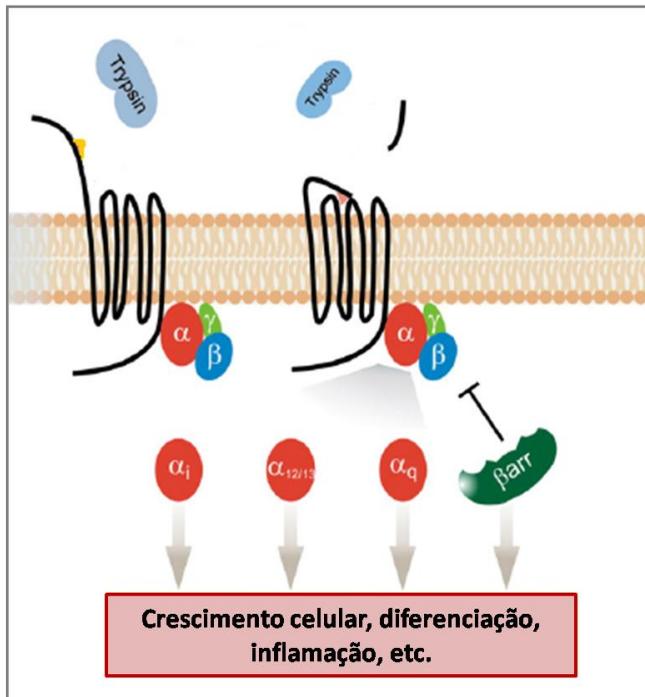
comercialização de uma droga mudaram e uma prova de eficácia, geralmente envolvendo dois testes clínicos, passou a ser requerida, de forma que muitos produtos foram retirados do mercado como consequência (Scheidlin, 2007). No Brasil, o medicamento somente foi retirado do mercado em 2009, pela resolução da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) RE Nº 3.619, de 21 de agosto de 2009.

Na verdade, informações mais recentes sobre as ações farmacológicas da tripsina, tornaram um tanto mais difícil entender como ela poderia ser anti-inflamatória. A tripsina é também um agonista endógeno de receptores ativados por proteases do tipo dois (PAR-2). O receptor PAR-2 faz parte da grande família dos receptores ativados por proteinases, que abrange ainda os receptores PAR-1, PAR-3 e PAR-4. Os PAR's são receptores acoplados a proteínas G que são ativados após a clivagem de uma sequência de aminoácidos da porção extracelular N-terminal, expondo uma nova porção N-terminal, que funciona como ligante para o receptor, ativando-o e iniciando uma resposta celular. Estes receptores são clivados por proteases como a tripsina, principal agonista endógeno do PAR-2 (Nystedt, 1994). Outras proteases capazes de ativar os receptores PAR's são: trombina, triptase de mastócito, plasmina e catepsina G. Todos os PAR's são ativados por tripsina e somente o PAR-2 não é ativado por trombina (Nystedt, 1994).

Os receptores PAR, com exceção do PAR-3, podem ser ativados também por peptídeos ativadores, que são moléculas sintéticas derivadas da sequência de aminoácidos que são revelados após a clivagem da cauda N-terminal pelas proteases (Scarborough et al., 1992; Vu et al., 1991). Além disso, as proteases também podem desarmar os PAR's ao remover a sua sequência ativadora, impedindo que outras

proteases o ativem, mas mantendo a possibilidade de ativação pelos peptídeos ativadores (Ramachandran e Hollemberg, 2008). As proteases tripsina, catepsina G e plasmina também podem desarmar receptores PAR's, além da elastina (Adams et al., 2011). O sistema efetor do PAR-2 se dá pelas proteínas  $G_q$  ou  $G_{12/13}$ , que estimulam uma cascata intracelular que inicia com ativação de fosfolipase C, geração de diacilglicerol e inositol-trifosfato, mobilização do cálcio do retículo endoplasmático para o citosol e ativação de diversas outras cascatas celulares (Soh et al., 2010; Dery et al., 1998; Böhm et al., 1996). Essas cascatas resultam em crescimento celular, diferenciação celular e ativação de vias pró-inflamatórias como a do NF- $\kappa$ B (Fig. 3; Adams et al., 2011).

As proteases podem ainda ter efeitos celulares a partir da ativação de outros receptores além dos PAR's. Dentre os outros mecanismos pelos quais as proteases podem exercer efeito celular estão a regulação de receptores de fatores de crescimento, sinalização por outros alvos que não receptores e ainda um mecanismo não catalítico das mesmas. O primeiro mecanismo, as proteases podem ativar uma sinalização celular tipo hormonal, como uma ação semelhante a da insulina produzida pela tripsina ao ativar receptores para insulina. Em altas concentrações a tripsina pode inclusive inibir a ligação da insulina ao seu receptor (Cuatrecasas et al., 1971). As proteases também podem iniciar respostas celulares a partir da ativação de metaloproteinases e outras proteínas da matriz extracelular após a ruptura da membrana celular. Por fim, as proteases ainda podem exercer efeitos celulares por um mecanismo não catalítico, onde a trombina, por exemplo, é capaz de produzir peptídeos quimiotáticos a partir de sua própria estrutura.



**Figura 3:** Esquema de ativação do Receptor PAR-2. A tripsina cliva uma sequência de aminoácidos da porção N-terminal, permitindo que a nova porção N-terminal se ligue e ative o receptor. A ativação do PAR-2 dá início a uma resposta celular que tem como resultado o crescimento celular, diferenciação celular, início de processo inflamatório, entre outros. Imagem modificada de Adams, 2011.

A estimulação dos receptores PAR-2 por seus agonistas, como já foi dito, dá início a um sistema efetor de resposta celular que se inicia com a ativação de proteínas  $G_q$  ou  $G_{12/13}$ , principalmente, mas também pode se dar por ativação do sistema da RhoA (Russo et al., 2009; Hatziapostolou et al., 2008; Greenberg, Mize e Takayama, 2003; Nguyen et al., 2002) e das  $\beta$ -arrestinas (Defea, 2008; DeFea et al., 2000;

Dery et al., 1999), e estudos vêm demonstrando que a via de sinalização que se segue após a ativação é dependente do agonista (Ramachandran et al., 2009; Al-Ani et al., 2004). Esse processo se chama sinalização tendenciosa (do inglês *biased signalling*) e descreve que diferentes agonistas do mesmo receptor podem dar início a diferentes sistemas efetores (Kenakin e Miller, 2010; Rajagopal, Rajagopal e Lefkowitz 2010) e, conseqüentemente, respostas celulares. Estudos comparativos feitos entre dois peptídeos ativadores de PAR-2 mostraram que eles foram capazes de ativar vias efetoras diferentes (Ramachandran et al., 2009) e também foi demonstrado que a tripsina, quando comprada com um peptídeo ativador, é capaz de expressar 19.000 genes diferentes dos expressos pelo peptídeo ativador (Suen et al., 2010).

Já foi demonstrado que a administração de tripsina na pata de camundongos produz edema de pata e nocicepção espontânea (Paszcuk et al., 2008). Além disso, dados mostrando o envolvimento de PAR-2 na inflamação articular vêm crescendo. Dois trabalhos importantes mostram que a administração de peptídeo ativador de PAR-2 foi capaz de promover inchaço na articulação de animais selvagens, mas não em animais nocaute para PAR-2 (Ferrell et al., 2003), e que animais nocaute para PAR-2 apresentam diminuição dos níveis de anticorpo circulantes e de alterações histológicas em um modelo de artrite induzida por adjuvante (Busso et al., 2007), mostrando que PAR-2 tem papel importante na inflamação crônica articular. Disto tudo, resulta que uma importante vertente da pesquisa anti-inflamatória articular atual está no desenvolvimento de fármacos antagonistas de receptores PAR-2, e não agonistas como a tripsina.

O receptor PAR-2 é expresso de forma numerosa no TGI e em células do sistema imunológico (Böhm et al., 1996). Já é descrito na literatura que a ativação de PAR-2 provoca degranulação de neutrófilos (Howells et al., 1997), gera inflamação neurogênica (Steinhoff et al., 2000) e hiperalgesia periférica (Vergnolle et al., 2001) e participa da ativação de respostas pró-inflamatórias (Cenac et al., 2007, Hoogerwerf et al., 2004; Vergnolle, 1999; Böhm et al., 1996), além de ser peça importante em processos patológicos no TGI, como a Síndrome do Intestino Irritado, diarreia e colite infecciosa, por exemplo (Cenac et al., 2007; Hansen et al., 2005; Vergnolle et al., 2001), deixando uma dúvida atual de: como a tripsina, que ativa receptores pró-inflamatórios, poderia ter efeito anti-inflamatório?



## 2 JUSTIFICATIVA

Unindo as informações anteriormente citadas, e sabendo que o receptor PAR-2 é encontrado na aferência vagal, participando da sinalização do nervo vago a partir da ativação direta do terminal nervoso ou indiretamente pela liberação de outras substâncias ativadoras, como citocinas (Kirkup, Brunsten e Grundy, 2001), propusemos a hipótese de que a tripsina, ativando receptores PAR-2 presentes na mucosa do TGI e nas aferências vagais, estaria excitando o nervo vago, o que levaria a uma eficaz resposta analgésica e anti-inflamatória.

### 2.1 Justificativa para o modelo experimental

#### ❖ Modelo de Artrite Induzida por Adjuvante

A artrite induzida por adjuvante (AIA) foi previamente descrita por Pearson, em 1956, que em seu trabalho a relata como uma doença induzida em ratos por uma simples inoculação de alguma espécie de micobactéria suspensa em óleo mineral, numa substância conhecida como Adjuvante Completo de Freund – do Inglês *Complete Freund's Adjuvant* (CFA).

O CFA consiste numa mistura de óleo mineral (85%), surfactante (15%) e um antígeno ( $\approx 10$  mg/ml), que é sempre alguma bactéria da espécie *Mycobacterium*, inativada pelo calor (Billiau e Matthys, 2001). Freund observou que a adição de óleo à bactéria morta potencializava o efeito de imunização que já tinha sido observado somente com a bactéria, levando os animais a produzirem anticorpos

contra os antígenos da micobactéria, dando início ao uso do CFA como instrumento de indução de doenças autoimunes experimentais (Billiau e Matthys, 2001).

A artrite induzida por CFA pode ser originada mesmo se não houver uma pré-exposição do animal, porém uma primeira exposição dos animais ao CFA, seguida de uma re-exposição após semanas ou até meses, gera uma imunização potencializada no local da segunda exposição, havendo produção de células T responsivas e resposta imune à proteína do choque térmico (HSP) da micobactéria, mostrando que a patogênese da artrite induzida por CFA guarda características semelhantes à da artrite reumatoide (Whitehouse, 2007).

A remoção de uma população de linfócitos de um animal imunizado pela drenagem do ducto torácico foi capaz de inibir o desenvolvimento da AIA nesses animais (Whitehouse, Whitehouse e Pearson, 1969). O mesmo procedimento foi feito com humanos, e se observou que após a retirada dos linfócitos do ducto torácico, o quadro artrítico destes pacientes diminuía, mesmo sem o uso da medicação, dentro de 14 dias (Pearson, 1976). Tanto para o rato quanto para o homem, este efeito não foi duradouro, mostrando que os agentes que provocam a doença, tanto para a AIA em ratos quanto para a artrite reumatóide em humanos, não são inativados e ainda são capazes de reiniciar o processo.

Estas e outras observações foram importantes para estabelecer um paralelo entre a artrite induzida por adjuvante e a artrite reumatoide humana, levando a AIA a ser considerada como uma ferramenta relevante para o estudo experimental de vários aspectos da condição artrítica (Whitehouse, 2007).

### **3 OBJETIVOS**

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito antiartrítico da administração por via oral de tripsina e sua possível mediação pelo nervo vago.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito da tripsina administrada por via oral na incapacitação articular, no aumento do diâmetro articular e na infiltração celular sinovial, induzidos por CFA aplicado no joelho de ratas;
- Investigar o efeito da vagotomia subdiafragmática no efeito da tripsina no modelo de artrite induzida por CFA;
- Investigar o efeito da aplicação intratecal de neurotoxinas para terminais serotoninérgicos e noradrenérgicos no efeito da administração oral de tripsina sobre o modelo de artrite induzida por CFA.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais:

Os animais utilizados para o desenvolvimento do presente projeto foram ratos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, fêmeas, com peso entre 180 - 220 gramas fornecidos pelo Biotério do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (CCB, UFSC). Os animais foram agrupados em caixas contendo 5 animais e mantidos sob temperatura controlada ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ), ciclo claro/escuro (12 horas de claro e 12 horas de escuro) e livre acesso à água e à ração. Os experimentos foram realizados entre 8:00 e 18:00 horas, após ambientação prévia dos ratos por pelo menos 1 hora na sala onde o experimento foi realizado. Os experimentos foram conduzidos seguindo os preceitos éticos definidos pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP, 1983) e aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFSC (PP00723).

### 4.2 Drogas:

Os fármacos utilizados neste projeto estão listados na tabela 1.

Fármaco	Dose/ Via de administração	Veículo
Adjuvante Completo de Freund ( <i>Mycobacterium butiricum</i> ); Marca Difco	0,5 mg/ml, intradérmico e intraarticular.	Óleo Mineral
6-hidroxidopamina (6-OHDA); Marca Sigma	10µg/20µL*, intratecal	PBS e 0,2 mg/ml de ácido ascórbico
5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT); Marca Sigma	20µg/20µL*, intratecal	PBS e 0,2 mg/ml de ácido ascórbico
Tripsina de pâncreas suíno; Marca Sigma	0,75mg; 1,5mg; 2,95mg; 6mg/2mL**, via oral	Solução fisiológica 0,9% estéril
Dexametasona; Marca Sigma	4mg/kg, via oral	Solução fisiológica 0,9% estéril

\* Dose efetiva em degenerar as inervações noradrenérgicas e serotoninérgicas, respectivamente, nos modelos de degeneração usados por *You et al. 2010*.

\*\* Doses estipuladas a partir de Extrapolação Alométrica, baseado na dose do medicamento Parenzyme® usada em humanos.

**Tabela 1:** Lista de fármacos, dose, via de administração e veículo.

### 4.3 Modelo experimental: Artrite Induzida por CFA:

O modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) é uma variação do modelo previamente descrito por Pearson em 1956 e tem como objetivo a indução de uma monoartrite na articulação fêmuro-tibial de ratos. Para isso, os ratos receberam uma injeção inicial de CFA na base da cauda (0,5 mg/ml, 50 µl/rato, intradérmico) com intuito de imunização. Sete dias após o primeiro estímulo, os ratos receberam uma segunda injeção de CFA (0,5 mg/ml, 50 µl/rato) na

cavidade articular da articulação fêmuro-tibial direita, resultando numa reação imune ao CFA e conseqüente inflamação articular.

O procedimento de injeção articular foi feito com o animal imobilizado cuidadosamente com uma flanela, deixando somente o terço inferior do abdômen livre. Na posição de decúbito dorsal, foi flexionada a perna direita do animal e feita a tricotomia da articulação para que se permitisse observar o tendão infrapatelar (uma faixa esbranquiçada longitudinal que ancora a patela ao fêmur e a tíbia). A injeção de CFA foi feita através deste tendão para dentro da cavidade sinovial, com a agulha (BD Ultra fine 8 mm, 29 gauge) introduzida de forma perpendicular.

#### **4.4 Teste Algesimétrico: Medida da Incapacitação Articular:**

A nocicepção articular foi avaliada através do teste de incapacitação articular previamente descrito por Tonussi e Ferreira (1992), que tem como objetivo avaliar o estado funcional e a nocicepção nas articulações. A quantificação da incapacitação articular independe do experimentador, pois é realizada por um sistema de registro computadorizado. O aparelho consiste de um cilindro revestido por malha trançada em aço inox, sapatilhas metálicas e um microcomputador. Assim, os ratos foram submetidos à deambulação neste cilindro giratório (velocidade constante de 3 r.p.m.) pelo período de 1 minuto (Fig. 4).

Para que o computador registre a incapacitação articular, uma sapatilha metálica é acoplada em cada uma das patas traseiras do animal, mas apenas a sapatilha da pata direita é conectada ao computador

através de um fio condutor. Assim, o computador registra o tempo total que a pata direita do rato fica sem tocar a superfície do cilindro durante o período de 1 minuto, o que é denominado de tempo de elevação da pata (TEP; segundos) e constitui a medida de incapacitação articular. Quanto maior o TEP, maior a incapacitação articular, caracterizando um comportamento nociceptivo.

Imediatamente antes da administração do CFA intra-articular, o TEP dos ratos varia entre 8 e 12 segundos (TEP basal). Observa-se um aumento do TEP apenas no lado cuja articulação fêmuro-tibial recebe a injeção de CFA e a sapatilha, por si só, não altera o TEP dos animais (Tonussi e Ferreira, 1992). O TEP foi avaliado nas seguintes etapas: imediatamente antes da injeção intra-articular de CFA, 24 h após a injeção de CFA, 30 min após a administração de tripsina e subsequentemente a cada dia por um período de sete dias. No dia anterior a cada experimento, os animais foram ambientados e treinados no sistema de registro de incapacitação articular para aprenderem a deambular sem cair do cilindro e a se adaptarem ao uso das sapatilhas.



**Figura 4:** Figura da esquerda: aparelho para avaliação da incapacitação articular. Figura da direita: foto ilustrativa de uma sapatilha acoplada na pata direita do rato.

#### 4.5 Mensuração do Edema Articular:

O edema articular induzido pelo CFA foi quantificado através da medida do diâmetro da articulação fêmuro-tibial (eixo médio-lateral), com auxílio de um paquímetro (Fig. 5). As medidas do edema articular foram realizadas imediatamente após cada registro do tempo de elevação da pata, seguindo as mesmas etapas previamente descritas. Para tal medida, os ratos foram imobilizados rapidamente com auxílio de uma flanela, da mesma forma descrita para a injeção de CFA intraarticular, apenas pelo período necessário para a medida do diâmetro articular. Os dados estão apresentados como a diferença entre o diâmetro articular mensurado imediatamente antes da injeção intra-articular de CFA e as medidas subsequentes obtidas ao longo de sete dias de avaliação.



**Figura 5:** Foto ilustrativa da

#### 4.6 Contagem de Leucócitos no Líquido Sinovial:

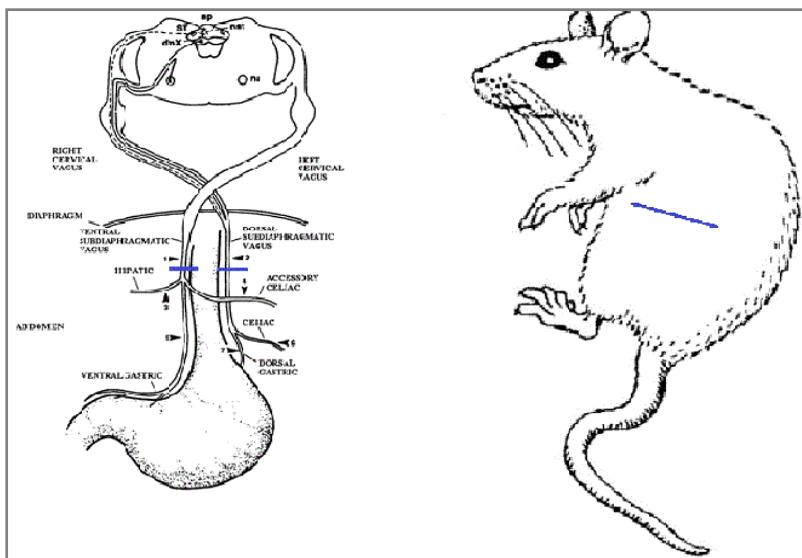
A quantificação de leucócitos no fluido sinovial foi realizada segundo a técnica previamente descrita por Bressan e colaboradores (Bressan et al., 2006). Sete dias após a injeção intraarticular de CFA,

logo após a última medida do tempo de elevação de pata e do diâmetro articular, os animais foram eutanasiados com anestesia profunda de hidrato de cloral (15%) seguida de deslocamento cervical e tiveram sua articulação direita abertas para o processo de lavado sinovial. Foram coletados 5 µl do fluido sinovial puro da articulação inflamada para o preparo de lâminas de esfregaço, as quais posteriormente foram coradas com May-Grünwald/Giemsa e então utilizadas para a contagem diferencial de leucócitos (mononucleares: monócitos, linfócitos e macrófagos; polimorfonucleares: neutrófilo, basófilos e eosinófilos) em microscópio óptico e objetiva de imersão com 100x de aumento. Em seguida, a cavidade sinovial foi lavada com 100 µl de solução fisiológica 0,9 % contendo 4 µl de EDTA 5%. Este lavado sinovial foi diluído em líquido de Turk (1:20; solução feita com ácido acético glacial, azul de metileno e água destilada) por 5 minutos e uma alíquota foi colocada em câmara de Neubauer para a contagem de leucócitos (leucócitos/mm<sup>3</sup>).

#### **4.7 Vagotomia Subdiafragmática:**

O modelo de vagotomia subdiafragmática foi usado para se esclarecer a influência do nervo vago na ação da tripsina através da dissecação de seus ramos no trato digestório. O procedimento cirúrgico foi adaptado da técnica de Miao e colaboradores (1994), onde o animal, após anestesia com xilazina-ketamina 1:1 (5 mg/kg, 90 mg/kg, respectivamente), 1,5 mL/kg i.p, foi submetido a uma incisão no quadrante superior esquerdo da parede abdominal, logo abaixo da última costela (Fig. 6), para que o esôfago a nível subdiafragmático fosse

exposto por total, permitindo a visualização dos ramos vagais subdiafragmáticos. Primeiramente se dissecou o vago anterior, ou vago ventral, cortando seus ramos hepático, celíaco ventral e gástrico ventral, e em seguida se dissecou o vago posterior, ou vago dorsal, cortando seus ramos celíaco dorsal e gástrico dorsal. Para o protocolo de vagotomia subdiafragmática ainda foi utilizado um grupo de animais falso-operados (*sham*), onde os animais passaram pelo procedimento cirúrgico mas não tiveram o nervo vago dissecado. Os animais foram utilizados entre três a quatro dias após a cirurgia.

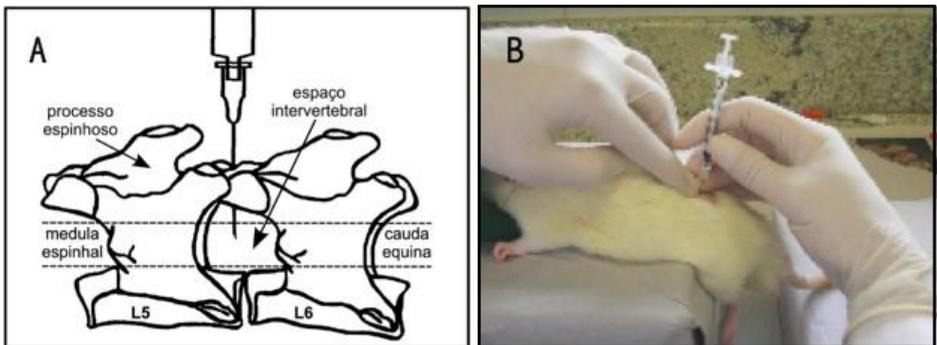


**Fig. 6:** Ilustração esquemática do local da dissecação do nervo vago e local de incisão da cirurgia. Modificado de Pocai et al., 2005.

#### 4.8 Lesão das vias Serotoninérgicas e Noradrenérgicas Medulares:

As vias serotoninérgicas e noradrenérgicas foram lesionadas a partir do uso das neurotoxinas 5,7-DHT e 6-HODA, respectivamente,

como descrito por You e colaboradores (2010). A injeção intratecal foi feita no espaço intervertebral entre L5-L6 da medula com o auxílio anestésico de isofluorano 2%. O sítio de injeção foi alcançado com o auxílio de uma agulha 29 gauge, 12,7 mm de comprimento, inserida perpendicularmente no espaço intervertebral e as toxinas somente foram injetadas após se observar um leve bater de cauda (*flick*), indicando que a agulha estava localizada no espaço subaracnoídeo, isto é, o canal vertebral foi atingido corretamente. O volume máximo injetado via intratecal foi de 20  $\mu$ L. O procedimento está demonstrado na Figura 7. Foi dado um intervalo de três a quatro dias entre o procedimento e os experimentos.



**Figura 7:** (A) Diagrama mostrando o local da inserção da agulha. (B) Foto ilustrativa da administração intratecal.

#### 4.9 Administração de drogas por gavagem

A administração de drogas por via oral foram feitas 24 horas após o CFA intra-articular, e 30 min após sua administração se iniciou a medição diária dos parâmetros supracitados, com duração de sete dias.

Todas as administrações de drogas por via oral foram feitas com o auxílio de uma agulha de gavagem e os animais passaram aproximadamente 24hs em jejum para evitar refluxo e possibilitar que a droga alcance o TGI.

#### **4.10 Cálculo de Extrapolação Alométrica**

O Cálculo de Extrapolação Alométrica foi feito como descrito por Pachaly (2006).

O método alométrico compara matematicamente organismos de tamanhos diferentes, colocando-os dentro do mesmo padrão numérico. Desta forma torna-se possível a extrapolação de doses farmacológicas obtidas para um animal modelo (neste caso, o humano) para o uso em um animal alvo (ratos).

Para tal, é preciso inicialmente se calcular a Taxa Metabólica Basal (TMB), valor medido em um animal endotérmico quando parado e sem digerir alimentos, para o animal modelo e o animal alvo.

Onde:

K= Constante teórica de proporcionalidade;

M= massa corporal em Kg.

A constante teórica de proporcionalidade (K) é baseada na temperatura corporal média, e equivale às quilocalorias utilizadas em um período de 24 hs por um animal com peso hipotético de 1 kg em condições de metabolismo basal. Para mamíferos placentários, que inclui o homem e os roedores,  $K=70$ .

A TMB para um humano com peso médio de 70 kg é igual a 10.373 e a TMB para ratas com peso médio de 180 g é igual a 26,7.

Com conhecimento da TMB do animal modelo, se faz necessário dividir a dose total do medicamento indicado por sua TMB. A dose do medicamento em questão (Parezyme®) indicada para humanos é de dois comprimidos de 40.000 UI quatro vezes ao dia, resultando em um total de 320.000 UI/dia. A dose total dividida pelo TMB do humano é igual a 30,85.

Em seguida, multiplica-se o resultado anterior pela TMB do animal alvo, isto é, 30,85 multiplicado por 26,7, resultando em 802. Por fim, divide-se o resultado obtido anteriormente, 802, pelo peso médio do animal alvo, 180 mg, e o resultado é a dose, por quilogramas, para o animal alvo. A fórmula do cálculo de extrapolação alométrica está demonstrada abaixo.

$$\frac{[TMB(m) \div dose\ total] \times TMB(a)}{Peso(a)} = Dose/Kg$$

Em nossos cálculos obtivemos o resultado de 4.456 UI/kg, o que significa, aproximadamente, 2,95 mg/kg, considerando que em 1 mg de tripsina purificada se tem entre 1.000-2.000 UI.

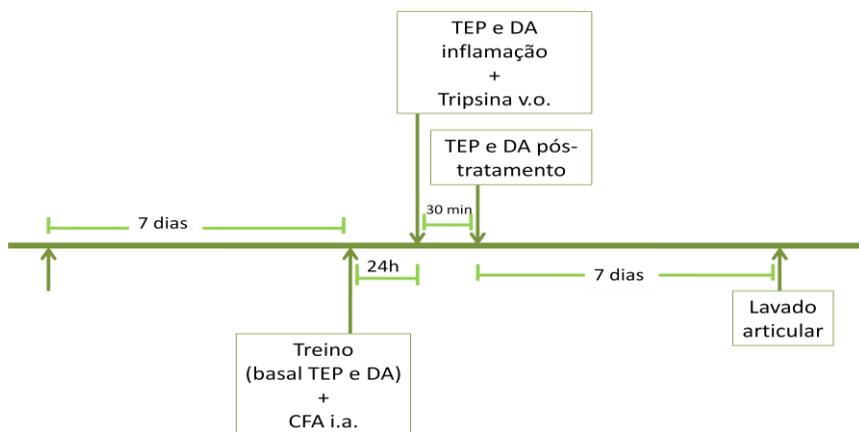
#### **4.11 Protocolo Experimental**

Foi avaliado o efeito da tripsina administrada por via oral (sistêmica) na incapacitação articular, edema, extravasamento plasmático e acúmulo de leucócitos induzidos pelo CFA. Para isso, foi realizada uma curva dose-resposta de tripsina seguindo a dose obtida a partir de cálculo de extrapolação alométrica baseado na dose de

Parenzyme<sup>®</sup> usada por humanos. O Esquema 1 demonstra o protocolo experimental da curva dose-efeito.

### Tripsina oral

- CFA intra-articular + 24 horas + salina oral
- CFA intra-articular + 24 horas + tripsina 0,75 mg/kg
- CFA intra-articular + 24 horas + tripsina 1,5 mg/kg
- CFA intra-articular + 24 horas + tripsina 2,95 mg/kg



**Esquema 1.** Protocolo experimental Curva dose-efeito da tripsina.

Após definição da dose efetiva de tripsina foi realizado o experimento com animais vagotomizados. Os animais foram usados entre três e quatro dias após cirurgia, que foi feita no intervalo da imunização. No sétimo dia após a imunização os animais foram re-expostos ao CFA e então, inicialmente, foi feito um perfil de resposta para a vagotomia neste modelo, com protocolo semelhante ao descrito

no Esquema 2, exceto a administração das drogas via oral, e os grupos experimentais estão descritos abaixo:

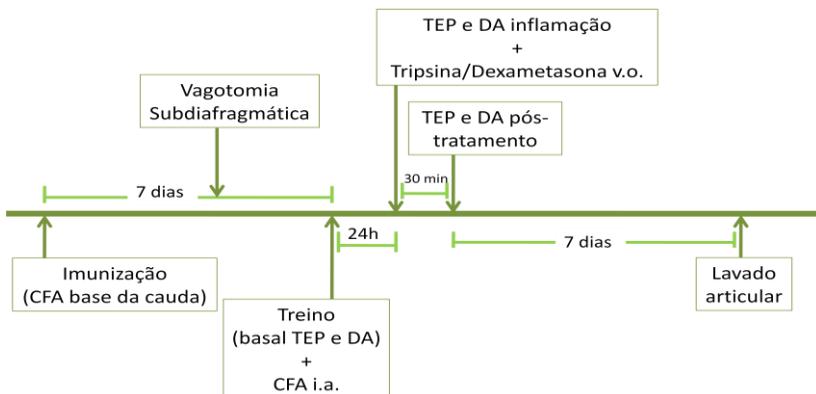
### Vagotomia

- Naive + salina
- Sham + salina
- Vagotomia + salina

Em seguida foi feito o protocolo experimental descrito pelo Esquema 2 aonde após 24 h completas da re-exposição ao CFA, os animais receberam a administração de tripsina ou dexametasona, 4 mg/kg v.o., e 30 min após se iniciou a avaliação diária do TEP e do diâmetro articular. A dexametasona é um corticosteroide com mecanismo de ação já conhecido, que não sofre influência vagal e por isso usado como controle positivo neste protocolo.

### Vagotomia

- Vagotomia + CFA intraarticular + 24 horas + salina oral
- Vagotomia + CFA intraarticular + 24 horas + tripsina 2,95 mg/kg oral
- Vagotomia + CFA intraarticular + 24 horas + dexametasona 4mg/kg oral
- Sham + CFA intraarticular + 24 horas + salina oral
- Sham + CFA intraarticular + 24 horas + tripsina 2,95 mg/kg oral
- Sham + CFA intraarticular + 24 horas + dexametasona 4 mg/kg oral



**Esquema 2.** Protocolo experimental para vagotomia subdiafragmática.

Três a quatro dias após a imunização, os animais receberam injeção intratecal das neurotoxinas, tiveram um tempo de recuperação até completar os sete dias de imunização e então se seguiu a mesma sequência de acontecimentos descritos no protocolo da vagotomia. Os grupos experimentais para o perfil temporal foram:

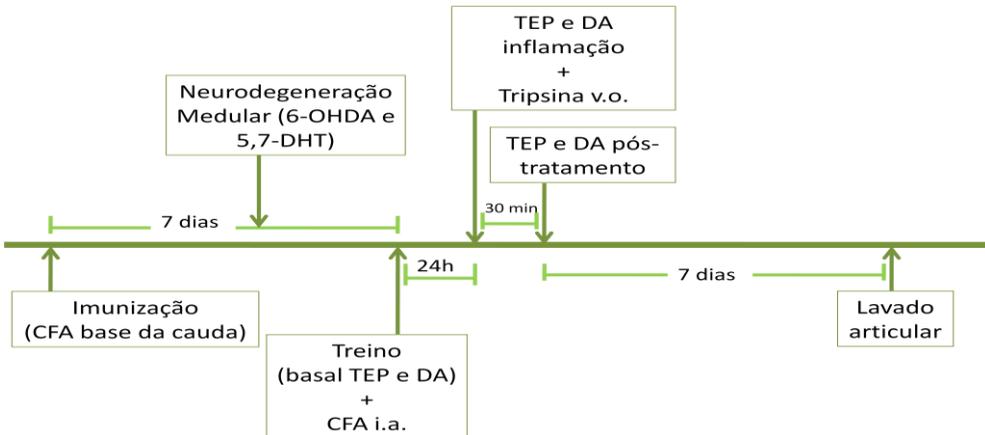
### Neurotoxinas

- PBS + CFA intraarticular + 24 horas + salina
- 6-OHDA + CFA intraarticular + 24 horas + salina
- 5,7-DHT + CFA intraarticular + 24 horas + salina

Os experimentos com a tripsina e as neurotoxinas tem seu protocolo experimental mostrados no Esquema 3 e tiveram os seguintes grupos:

### Neurotoxinas

- PBS + CFA intraarticular + 24 horas + salina oral
- PBS + CFA intraarticular + 24 horas + tripsina 2,95 mg/kg oral
- 6-OHDA + CFA intraarticular + 24 horas + tripsina 2,95 mg/kg oral
- 5,7-DHT + CFA intraarticular + 24 horas + tripsina 2,95 mg/kg oral



**Esquema 3.** Protocolo experimental para as Neurotoxinas.

#### **4.12 Análise Estatística:**

A análise estatística foi realizada utilizando o software *StatSoft Statistica 7<sup>®</sup>* para a análise das curvas de incapacitação e diâmetro articular. O teste utilizado foi ANOVA de duas vias com a aplicação do post-hoc Duncan sempre que a diferença de  $p < 0,05$  foi detectada. Para a avaliação da contagem de leucócitos sinoviais foi utilizado ANOVA de

uma via com aplicação do post-hoc de Dunnett sempre que a diferença de  $p < 0,05$  foi detectada. A ANOVA de uma via foi feito no software *GraphPad Prism 5*<sup>®</sup>, mesmo software utilizado para a elaboração dos gráficos apresentados neste trabalho. Os grupos experimentais foram compostos de 6-12 animais ( $n = 6 - 12$ ) e os dados são apresentados como a Média  $\pm$  E.P.M. (Erro Padrão da Média).



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito da tripsina via oral:

Para a primeira bateria de experimentos foi avaliado o efeito da tripsina administrada por via oral nos testes de incapacitação articular, diâmetro articular e contagem de leucócitos sinoviais, utilizando as doses de 0,75 mg/kg, 1,5 mg/kg e 2,95 mg/kg.

Os gráficos do Tempo de Elevação de Pata estão todos representados como a figura 8A, onde o eixo Y marca o TEP, em segundos, e o eixo X marca o tempo, em dias, onde a marca “+30min” representa a primeira medição do TEP pós-tratamento. Todas as avaliações estatísticas tiveram início no ponto 1 do eixo X, isto é, no dia 1, ponto onde se instalou a inflamação articular provocada pelo CFA.

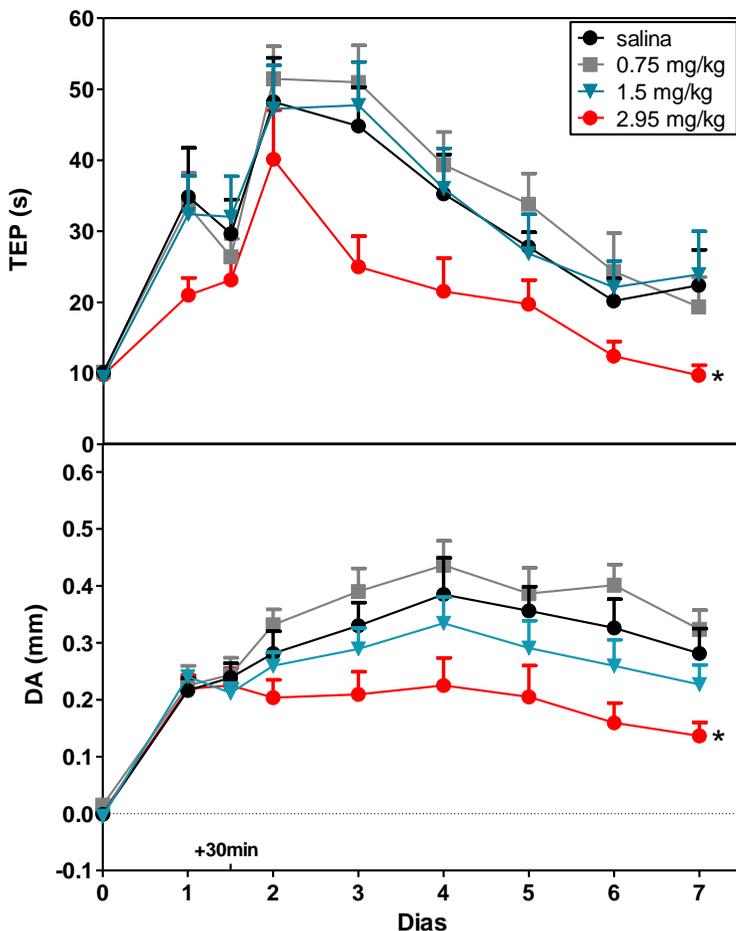
No teste de incapacitação articular, a administração por via oral de tripsina foi capaz de diminuir significativamente o tempo de elevação de pata causada pelo CFA ( $p < 0,0001$ ) na dose de 2,95 mg/kg, mostrando um efeito analgésico da enzima quando comparada à curva controle (Fig. 8A). Esse efeito teve duração de sete dias, mesmo após uma única administração. As doses de 0,75 mg/kg e 1,5 mg/kg não mostraram diferença da curva controle, não sendo capazes de diminuir a incapacitação articular.

Os gráficos do Diâmetro Articular estão representados como a figura 8B, onde o eixo Y marca a diferença do DA basal e das medidas subsequentes, em milímetros, e o eixo X marca o tempo em dias, onde a marca “+30min” representa a primeira medição do DA pós-tratamento.

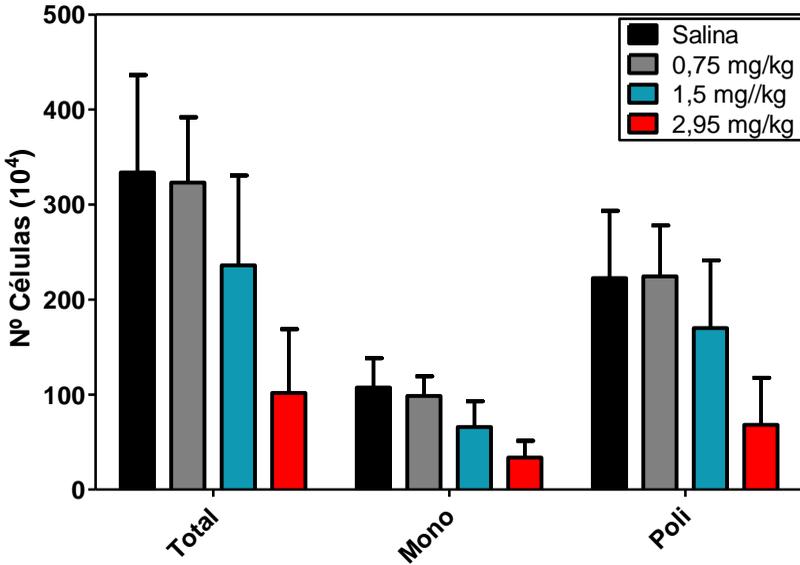
Os resultados obtidos a partir da mensuração do diâmetro articular mostram que a dose de 2,95 mg/kg também diminui o edema provocado pelo CFA ( $p < 0,0001$ ) quando comparada à curva controle, (Fig. 8B). O efeito também se manteve durante os sete dias de avaliação. Novamente, as doses de 0,75 mg/kg e 1,5 mg/kg não foram capazes de diminuir a formação do edema articular, não se mostrando efetivas neste modelo.

Por fim, os gráficos de contagem de leucócitos estão representados como na figura 9, onde o eixo Y marca o número de células  $\times 10^4$ , e o eixo X marca o tipo de contagem, total, mononuclear ou polimorfonuclear. A contagem total e diferencial de leucócitos para a curva dose-efeito da tripsina via oral mostrou que a dose de 2,95 mg/kg tem uma tendência a diminuir o infiltrado celular para a cápsula sinovial quando comparada com o grupo controle, apesar de este resultado não ser estatisticamente significativo (Fig. 9).

Desta forma, a dose de 2.95 mg/kg foi escolhida para ser usada nos experimentos subsequentes, já que causou diminuição tanto da incapacitação quanto do diâmetro articular neste modelo, mantendo o seu efeito durante os sete dias de tratamento, mesmo após uma única administração de tripsina.



**Figura 8:** Efeito da tripsina via oral na incapacitação articular (A) e no Diâmetro Articular (B). As medidas foram feitas durante sete dias após a injeção de CFA com o tratamento se iniciando no ponto “+30min”. Nos gráficos estão representados os resultados dos grupos experimentais: salina; 0,75; 1,5 e 2,95mg/kg. Os pontos da curva representam Média  $\pm$  E.P.M. de 7-8 animais. \* indica a diferença estatística da curva em relação ao grupo salina com  $p < 0,001$  (ANOVA de duas vias seguida de post-hoc Duncan).



**Figura 9:** Efeito da tripsina via oral nas contagens total e diferencial de leucócitos do líquido sinovial. A contagem foi feita no sétimo dia após a injeção de CFA. Nos gráficos estão representados os resultados dos grupos experimentais: salina; 0,75; 1,5 e 2,95mg/kg. As barras representam Média  $\pm$  E.P.M. de 7-8 animais.

## 5.2 Efeito da Vagotomia Subdiafragmática na resposta da tripsina via oral:

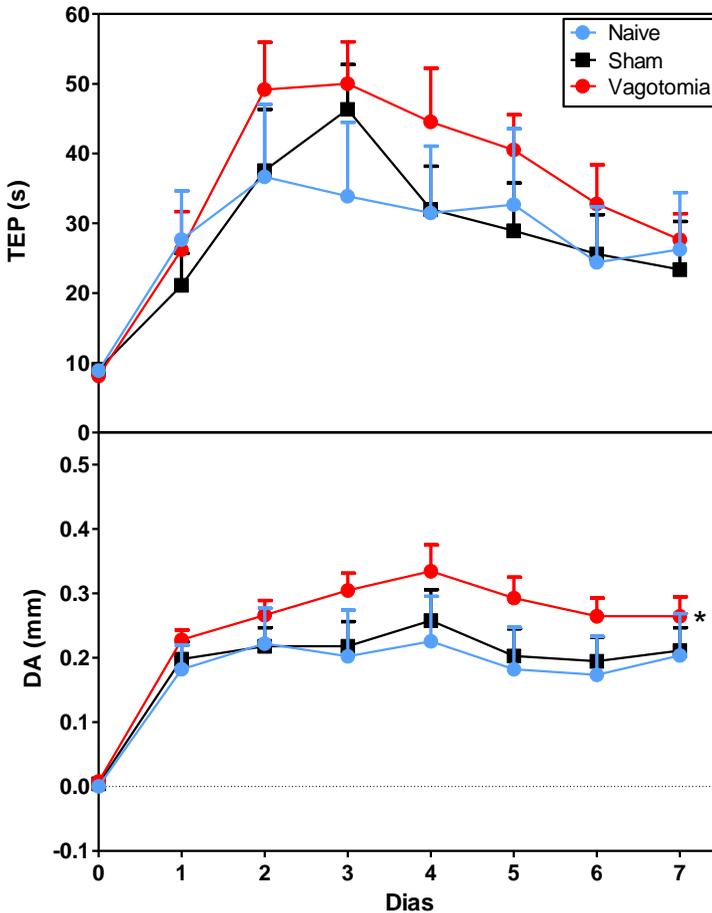
O procedimento cirúrgico de vagotomia subdiafragmática foi utilizado para esclarecer a influência do nervo vago na ação da tripsina via oral.

De início foi feito uma curva de perfil de resposta para a vagotomia no teste de incapacitação articular, na mensuração do diâmetro articular e na contagem de leucócitos sinovial.

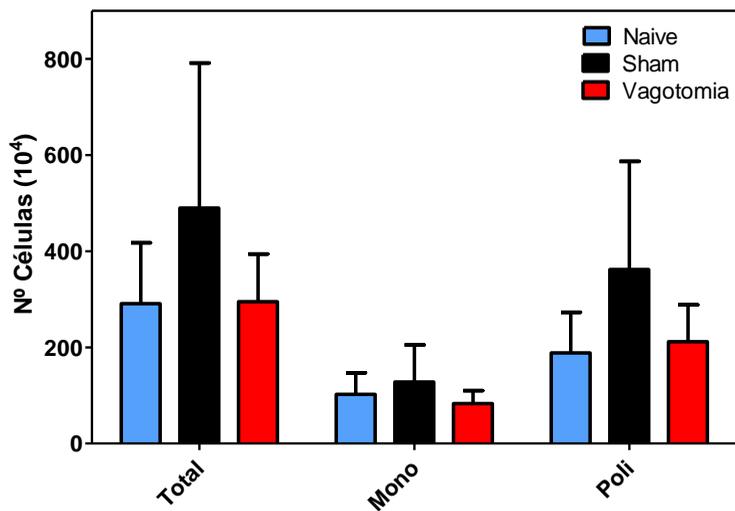
O grupo vagotomia teve uma tendência a aumentar o tempo de elevação de pata quando comparado ao grupo naive, isto é, uma tendência a ser hipernociceptiva por si só. Quando comparado ao grupo naive, o grupo *sham* não provocou alteração significativa no TEP (Fig. 10A).

Na curva do diâmetro articular foi possível observar um aumento no diâmetro articular ( $p < 0,0003$ ) do grupo vagotomia quando comparado ao grupo naive, neste modelo. Novamente, o grupo de animais *sham* não provocou alteração no parâmetro avaliado, mostrando uma curva de resposta semelhante à curva do grupo naive (Fig. 10B).

Quanto às células, as contagens total e diferencial não mostraram diferença estatística significativa entre nenhum dos grupos experimentais, apesar de o grupo *sham* ter um aumento aparente no número de células (Fig 11).



**Figura 10:** Perfil de resposta da vagotomia subdiafragmática na incapacitação articular (A) e no diâmetro articular (B). As medidas foram feitas durante sete dias após a injeção de CFA. Nos gráficos estão representados os resultados dos grupos experimentais: naive, sham e vagotomia. Os pontos da curva representam Média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais. \* indica a diferença estatística da curva em relação ao grupo naive com  $p < 0,001$  (ANOVA de duas vias seguida de post-hoc Duncan).



**Figura 11:** Perfil de resposta da vagotomia subdiafragmática nas contagens total e diferencial de leucócitos do líquido sinovial. As contagens foram feitas no sétimo dia após a injeção de CFA. Nos gráficos estão representados os resultados dos grupos experimentais: naive, sham e vagotomia. As barras representam Média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais.

Em seguida foi avaliada a influência da vagotomia na presença de tripsina via oral.

Para os resultados do Tempo de Elevação de Pata, o perfil de resposta da vagotomia neste modelo mostrou uma elevação do TEP dos animais, apesar deste não ter sido estatisticamente significativo, tanto quando comparado com o grupo naïve, quanto com o grupo *sham*. Ao se administrar tripsina ou dexametasona neste protocolo, tivemos os seguintes resultados:

A curva Vagotomia + Tripsina aumentou o TEP dos animais, tendo sua curva próxima a curva do grupo Sham + Salina, controle deste protocolo, mostrando que a vagotomia foi capaz de abolir o efeito analgésico ( $p < 0,0001$ ) da tripsina. Como esperado, a dexametasona, mesmo nos animais vagotomizados, manteve o seu efeito analgésico ( $p < 0,0001$ ) quando comparada com a curva Sham + Salina, e teve resultados semelhantes à curva do grupo Sham + Dexametasona ( $p < 0,521$ ), confirmando que o nervo vago não tem influência no efeito terapêutico da dexametasona. Os animais que receberam salina (Sham+Salina e Vagotomia+Salina) mantiveram suas respostas hiperalgésicas já observadas no perfil mostrado anteriormente (Fig. 12A).

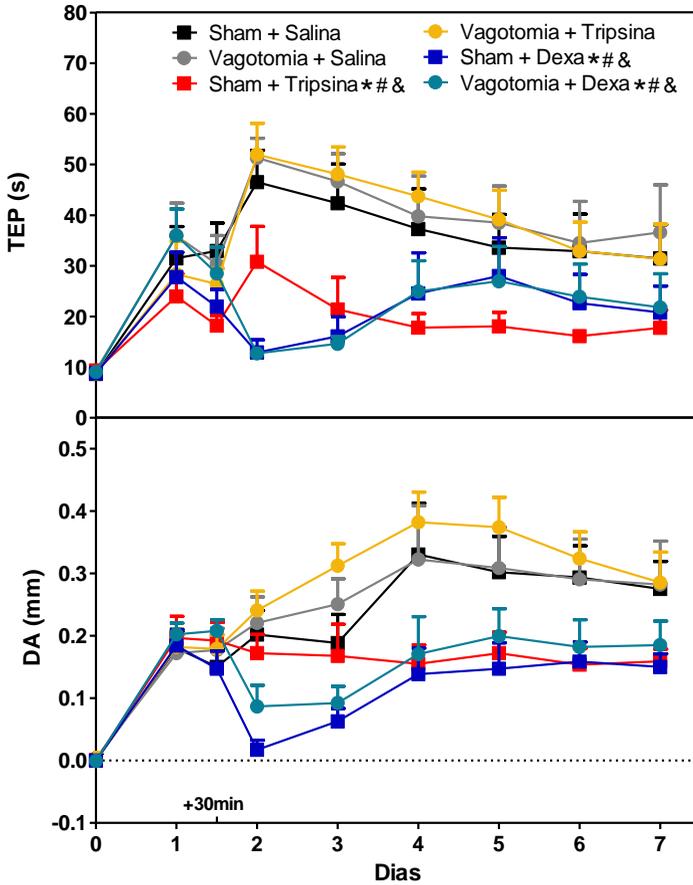
No perfil de resposta da vagotomia, os animais operados tiveram um aumento significativo do diâmetro articular quando comparados com ambos os grupos naïve e *sham*. Ao se administrar tripsina ou dexametasona por via oral, os resultados observados foram:

Quando comparado com o grupo Sham + Tripsina, a vagotomia, mais uma vez, foi capaz de abolir o efeito da tripsina, aumentando o diâmetro articular dos animais, tendo um efeito

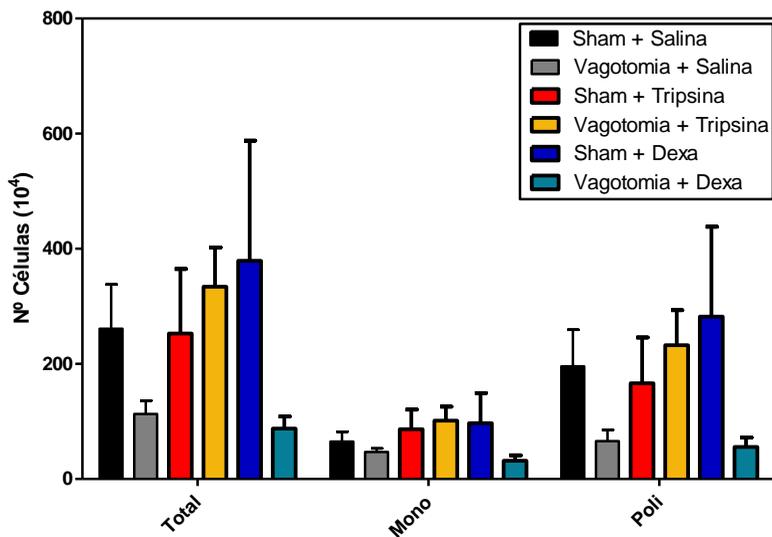
edematogênico ( $p < 0,0001$ ). A dexametasona manteve o seu efeito antiedematogênico tanto no grupo Sham ( $p < 0,0001$ ), quanto no grupo Vagotomia ( $p < 0,0001$ ) quando comparados com o grupo Sham + Salina, mais uma vez mostrando que o efeito terapêutico da dexametasona não é via nervo vago. Os animais que receberam salina (Sham + Salina e Vagotomia + Salina) continuaram a mostrar um aumento do diâmetro articular (Fig. 12B).

Na contagem de leucócitos do líquido sinovial (Fig. 13), não houve diferença significativa no infiltrado celular na cápsula sinovial em nenhuma contagem, para nenhum dos grupos experimentais.

Estes resultados confirmam, então, que o efeito analgésico e anti-edematogênico da tripsina via oral é mediada pela ativação do nervo vago.



**Figura 12:** Bloqueio do efeito da tripsina via oral pela vagotomia na incapacitação articular (A) e no diâmetro articular (B). As medidas foram feitas durante sete dias após a indução de artrite por CFA com o tratamento se iniciando no ponto “+30min”. Os pontos da curva representam Média  $\pm$  E.P.M. de 6-7 animais. \* indica a diferença estatística da curva em relação ao grupo Sham + salina com  $p < 0,001$ ; # indica a diferença estatística da curva em relação ao grupo Vagotomia + salina com  $p < 0,001$ ; & indica a diferença estatística da curva em relação ao grupo Vagotomia + tripsina com  $p < 0,001$  (ANOVA de duas vias seguida de post-hoc Duncan).



**Figura 13:** Antagonismo do efeito da tripsina via oral pela vagotomia nas contagens total e diferencial de leucócitos do líquido sinovial. As contagens foram feitas no sétimo dia após a injeção de CFA. No gráfico estão representados os resultados dos grupos experimentais: Sham + Salina, Vagotomia + Salina, Sham + Tripsina, Vagotomia + Tripsina, Sham + Dexametasona e Vagotomia + Dexametasona. As barras representam Média  $\pm$  E.P.M. de 6-7 animais.

### **5.3 Efeito das neurotoxinas 6-hidroxidopamina e 5,7-diidroxitriptamina na resposta da tripsina via oral:**

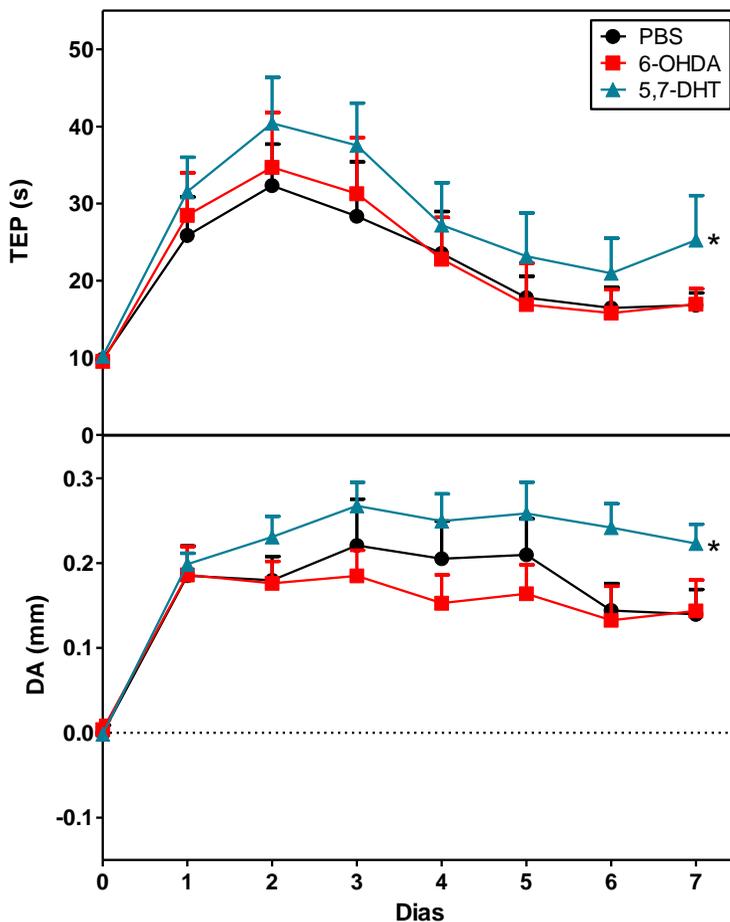
Para avaliar o envolvimento das vias descendentes inibitórias serotoninérgica e noradrenérgica espinhais na resposta da tripsina administrada por via oral, foi feito o uso de neurotoxinas.

Inicialmente, uma avaliação do perfil de resposta no modelo de incapacitação articular, tal como no diâmetro articular e na contagem total e diferencial de leucócitos foi feita para avaliar a resposta temporal das neurotoxinas.

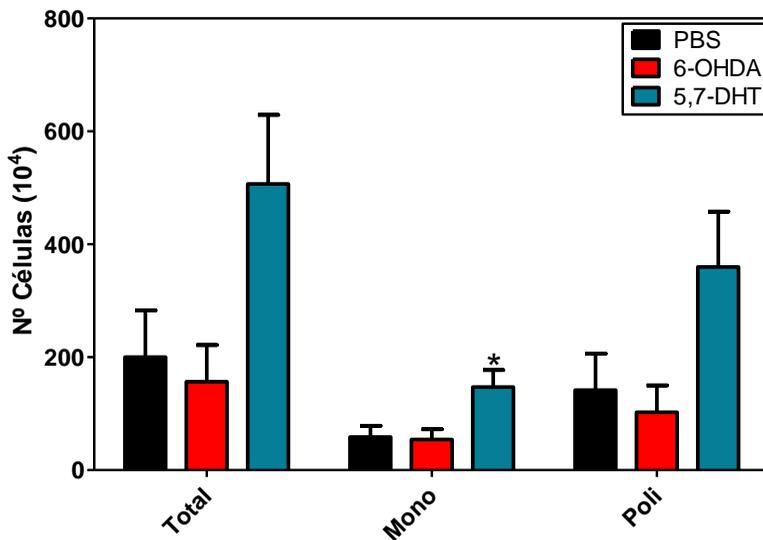
No teste de incapacitação articular, a lesão de fibras serotoninérgicas provocou um aumento na incapacitação por si só, quando comparada ao grupo PBS ( $p < 0,026$ ), aumentando o TEP dos animais. Diferentemente, a depleção de fibras noradrenérgicas não teve diferença estatística na mesma comparação, tendo sua curva próxima a curva do grupo PBS (Fig. 14A).

Concordando com os resultados da incapacitação articular, o diâmetro articular do grupo 5,7-DHT aumentou, quando comparado com o grupo PBS ( $p < 0,0001$ ), sendo edematogênico. Enquanto o grupo 6-OHDA, de forma contrária, continua sem mostrar grande influência neste modelo (Fig. 14B).

Na contagem dos leucócitos na cápsula sinovial (Fig. 15), a lesão das fibras serotoninérgicas mostra uma tendência a aumentar o número de células totais e polimorfonucleares, e aumenta significativamente o número de células mononucleares ( $p < 0,0269$ ), enquanto a depleção de fibras noradrenérgicas parece não ter influência na migração celular neste modelo.



**Figura 14:** Perfil de resposta das neurotoxinas 6-OHDA e 5,7-DHT na incapacitação articular (A) e no diâmetro articular (B). As medidas foram feitas durante sete dias após a injeção de CFA. No gráfico está representado o resultado dos grupos: PBS, 6-OHDA e 5,7-DHT. Os pontos da curva representam Média  $\pm$  E.P.M. de 9 animais. \* indica a diferença estatística da curva em relação ao grupo PBS com  $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias seguida de post-hoc Duncan).



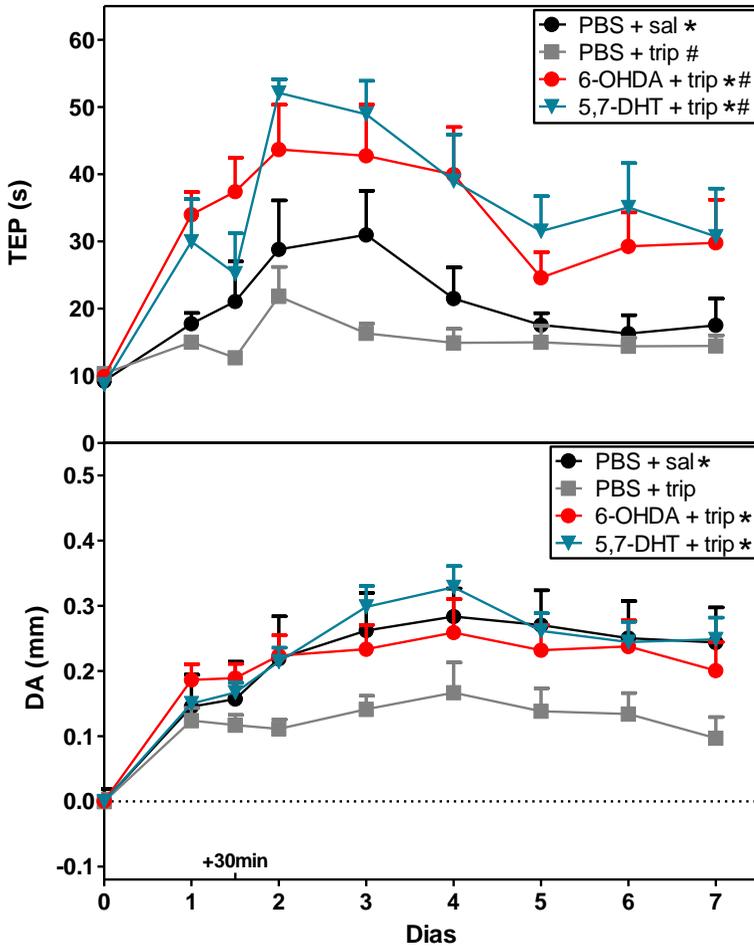
**Figura 15:** Perfil de resposta das neurotoxinas 6-OHDA e 5,7-DHT nas contagens total e diferencial de leucócitos do líquido sinovial. A contagem foi feita no sétimo dia após a injeção de CFA. No gráfico está representado o resultado dos grupos: PBS, 6-OHDA e 5,7DHT. As barras representam Média  $\pm$  E.P.M. de 9 animais. \* indica a diferença estatística da curva em relação ao grupo PBS com  $p < 0,05$  (Teste  $t$  de Student não-pareado).

Em seguida foi avaliada a resposta da tripsina via oral na presença das neurotoxinas, para investigar a participação dos sistemas descendentes inibitórios serotoninérgico e noradrenérgico no efeito provocado pela enzima. No perfil de resposta os animais que tiveram a via serotoninérgica lesionada mostraram um aumento tanto no Tempo de Elevação de Pata quanto no diâmetro articular. Após a administração da tripsina por via oral foram observados os seguintes resultados:

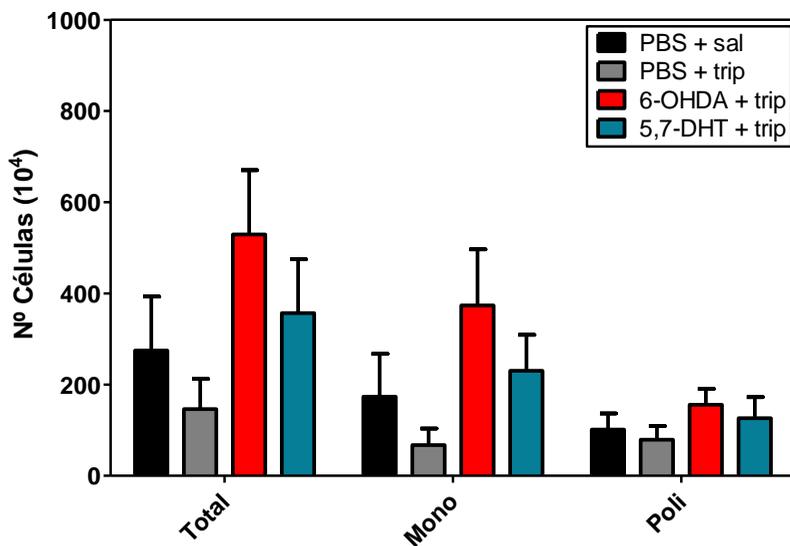
No teste de incapacitação articular, tanto a 6-OHDA quanto a 5,7-DHT bloquearam o efeito analgésico da tripsina ( $p < 0,0002$ ;  $p < 0,0001$ , respectivamente), aumentando o TEP dos animais. O efeito analgésico da tripsina foi mantido quando se compara a curva PBS + Salina e PBS + Tripsina ( $p < 0,0172$ ) (Fig. 16A).

Quando avaliado o diâmetro articular, novamente ambas as neurotoxinas, 6-OHDA e 5,7-DHT, foram capazes de bloquear o efeito antiedematogênico da tripsina (Fig. 16B), aumentando o diâmetro articular dos animais quando comparadas ao grupo PBS + Tripsina ( $p < 0,0002$ ;  $p < 0,0001$ , respectivamente).

A contagem de leucócitos na cápsula sinovial não mostrou diferença estatística para o infiltrado celular em nenhuma das contagens, para nenhum dos grupos (Fig. 17).



**Figura 16:** Antagonismo do efeito da tripsina via oral pelas neurotoxinas 6-OHDA e 5,7-DHT no teste de incapacitação articular (A) e no diâmetro articular (B). As medidas foram feitas durante sete dias após a indução de artrite por CFA com o tratamento se iniciando no ponto “+30min”. As barras representam média  $\pm$  E.P.M. de 7 animais. \* indica a diferença estatística da curva em relação ao grupo PBS + tripsina com  $p < 0,001$ ; # indica a diferença estatística da curva em relação ao grupo PBS + salina com  $p < 0,001$  (ANOVA de duas vias seguida de post-hoc Duncan).



**Figura 17:** Antagonismo do efeito da tripsina via oral pelas neurotoxinas 6-OHDA e 5,7-DHT nas contagens de leucócitos do líquido sinovial. As medidas foram feitas no sétimo dia após a indução de artrite por CFA. No gráfico estão representados os resultados dos grupos experimentais: PBS + Salina, PBS + Tripsina, 6-OHDA + Tripsina e 5,7-DHT + Tripsina. As barras representam média  $\pm$  E.P.M. de 7 animais.



## 6 DISCUSSÃO

O modelo de artrite induzida por CFA é um modelo que foi inicialmente descrito por Pearson em 1956, referida como artrite induzida por antígeno (AIA), onde uma reação imune contra uma espécie de micobactéria diluída em um óleo adjuvante é capaz de instalar um quadro inflamatório que guarda semelhanças com a artrite humana. Como uma variação deste modelo produzimos uma monoartrite induzida por imunização ao CFA contendo *Mycobacterium butyricum*. Por ser uma reação de duração relativamente longa, o modelo é útil para estudos de processos inflamatórios subcrônicos e dor persistente. A indução da inflamação na articulação foi feita também para se ajustar ao teste nociceptivo usado, o teste de incapacitação articular (Tonussi e Ferreira, 1992), que, após a re-exposição ao CFA, aumenta o tempo normal de elevação de pata dos animais, assim como permite aferir o edema articular pós re-exposição, que também se eleva dos valores normais. O modelo de artrite induzida por CFA na articulação fêmuro-tibial, então, permite se observar uma potencialização inicial e possível diminuição, após um tratamento, do tempo de elevação de pata e do edema articular.

Optou-se pelo uso de fêmeas, pois em caso de pesquisa com animais, é preferível que se consiga extrapolar o máximo para a realidade da condição estudada, no nosso caso, a artrite reumatoide, que acomete principalmente mulheres. Estudos diversos mostram a influência do ciclo estral das fêmeas e produção hormonal neste período na modulação da nocicepção, podendo potencializar ou amenizar a sensibilidade (Terner, Lomas e Picker, 2005; Vinogradova, Zhukov e

Batuev, 2003). Considerando que a fêmea passa por todas as fases do ciclo num período de 4 a 5 dias (Maeda, Ohkura e Tsukamura, 2000), os experimentos feitos neste trabalho, que duraram sete dias, abrange todas as fases, sendo praticamente impossível verificar a fase do ciclo para todos os animais dos grupos estudados. Além disso, todos os grupos passaram por uma randomização desde o momento do treino, de forma que a variância do ciclo estral dentro da randomização do grupo faz com que uma possível alteração na nocicepção pela fase do ciclo seja potencialmente descartada.

O teste de incapacitação articular já está bem descrito na literatura (Bressan et al., 2006; Martins et al., 2010; Tonussi e Ferreira, 1992) e ele não somente é sensível a todos as classes de analgésicos, como já descrito anteriormente (Tonussi e Ferreira, 1992), como também se mostra capaz de avaliar a incapacitação articular de animais que passaram por protocolos cirúrgicos e neurodegeneração medular, como foi mostrado neste trabalho. A vagotomia teve uma tendência a aumentar o tempo de elevação de pata e foi capaz de aumentar o diâmetro articular dos animais neste modelo, confirmando dados da literatura que mostram a influência do nervo vago na nocicepção (Khasar et al., 2003; Jänig et al., 2000) e no controle da inflamação (van der Zanden, Boeckxstaens e De Jonge, 2009; Borovikova et al., 2000a), mostrando a sensibilidade do modelo.

O teste também se mostrou sensível ao protocolo de aplicação intratecal de neurotoxinas medulares. You e colaboradores, em 2011, demonstraram que após lesão medular com as neurotoxinas 5,7-DHT ou 6-OHDA, há diminuição dos níveis de serotonina e noradrenalina na medula por pelo menos sete dias, tanto em machos quanto em fêmeas. A

lesão por 5,7-DHT registrou um aumento tanto no tempo de elevação de pata quanto no diâmetro articular dos animais que tiveram suas fibras medulares serotoninérgicas lesionadas, enquanto os animais com as fibras noradrenérgicas lesionadas por injeção de 6-OHDA não mostraram alterações nos parâmetros estudados em uma curva temporal. Com esses resultados, este trabalho mostrou a influência das vias medulares descendentes serotoninérgica e noradrenérgica neste modelo. Em outros trabalhos encontrados na literatura já foi demonstrado o papel de antagonistas de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos e de 5-HT em uma curva temporal de formalina na pata, avaliando o número de *flinches* espontâneos (Omote et al., 1998), e ainda em modelos de dor neuropática, hiperalgesia térmica e alodinia (Zhao et al., 2011). Porém, até então, não havia sido demonstrado o papel da degradação das vias descendentes medulares em modelo de artrite de longa duração. Foi possível observar que a presença de fibras serotoninérgicas medulares é necessária para que não ocorra uma piora do quadro artrítico, enquanto as fibras noradrenérgicas parecem ter menos importância nesse controle.

Neste estudo avaliamos o efeito da administração por via oral de tripsina nos parâmetros de incapacitação articular e diâmetro articular, que condizem, respectivamente, com a nocicepção e o edema na articulação. Foi possível observar que a tripsina foi capaz de diminuir a incapacitação articular e o diâmetro articular dos animais, isto é, a nocicepção e o edema, durante os sete dias de avaliação mesmo após uma única administração da enzima. Esse resultado confirma o efeito terapêutico da tripsina e ainda mostra que esse efeito terapêutico é duradouro, tendo ação mais estendida do que a da dexametasona, que após o terceiro dia começa a perder seu efeito. Esses dados mostram que

o tratamento com a tripsina é bastante eficaz, mesmo em casos de inflamação e nocicepção crônica.

Com a intenção de investigar como a tripsina, que possivelmente estaria ativando receptores pró-inflamatórios PAR-2, poderia estar apresentando este efeito terapêutico, foi feito o uso de algumas abordagens experimentais. A abordagem inicial que propusemos foi a da participação do nervo vago neste processo, já que ele inerva o TGI, onde a enzima estava sendo diretamente administrada, e é um importante ponto de ligação do TGI com o Sistema Nervoso Central. Além disso, já é bem descrito na literatura a sua participação no controle da dor (Khasar et al., 2003; Jänig et al., 2000). Para isto, os animais passaram pelo processo cirúrgico de vagotomia subdiafragmática.

Tem sido mostrado que a vagotomia não altera de forma negativa o funcionamento geral do TGI. Os principais resultados observados foram o aumento da ingestão e também da defecação (Neya, Takaki e Nakayama, 1979) e, logo após a cirurgia, o esvaziamento gástrico é diminuído, mas retorna ao normal após um certo intervalo de tempo (Gutierrez, Kocak e Cox, 1971). Nossos resultados mostraram que a vagotomia foi capaz de bloquear o efeito da tripsina na incapacitação articular, no diâmetro articular e na contagem de leucócitos, aonde o grupo vagotomizado que recebeu tripsina aumentou o número de células quando comparado com o grupo sham que recebeu tripsina.

O papel do vago no efeito da tripsina pode ser explicado pela ativação de receptores PAR-2 presentes nas aferências vagais, que podem excitar o vago de duas maneiras (Kirkup, Brunsten e Grundy,

2001). A primeira é de forma direta, por ativação de receptores PAR-2 no terminal axonal de fibras aferentes sensoriais do nervo vago no TGI. A segunda é de forma indireta, onde a ativação de PAR-2 nas células da mucosa do TGI iniciaria uma cascata de resposta celular que tem como um de seus resultados o aumento da produção de mediadores inflamatórios, instalando um quadro de inflamação no TGI. Essa indução da inflamação ativa e sensibiliza neurônios sensoriais do TGI, inclusive o nervo vago (Yu et al., 2009), iniciando um processo de hiperexcitabilidade (Kayssi et al., 2007; Kirkup et. al, 2003). Nossos resultados corroboram dados da literatura que demonstram a participação do nervo vago no processo de controle do quadro artrítico (Li et al., 2010; Van Maanen et al., 2009a; Zhang et al., 2008; Larsson et al., 2005; Bernik et.al., 2002), e sugerem que a tripsina possa ser um importante ativador no nervo vago quando administrada via oral.

A comprovação do envolvimento dos receptores PAR-2 neste processo é difícil. Imaginamos que a tripsina exerça seu efeito a partir da ativação de receptores nas aferências vagais e que para isso ela não precise ser absorvida. Ao usar antagonistas de receptores PAR-2, estes poderiam ser absorvidos e apresentarem efeitos sistêmicos que não necessariamente representariam um antagonismo direto dos receptores ativados pela tripsina. Na verdade, o único antagonista específico PAR-2, o GB88 (Barry et al., 2010), é ativo por via oral e diminui ativação de macrófagos e degranulação de mastócitos em um modelo de artrite induzida por colágeno (Lohman et al., 2012).

Uma abordagem que pode ser seguida para confirmar se a tripsina age em receptores PAR-2 é o uso de métodos bioquímicos de detecção de ativação de receptores, como *western blotting*. Porém, esses

métodos são mais comuns para demonstrar a expressão de receptores PAR-2. Em nosso caso precisaríamos de um anticorpo que marcasse a sequência de aminoácidos clivado no momento da ativação pela tripsina, o que seria uma forma fidedigna de demonstrar a ativação destes receptores.

Se a hipótese de que o efeito da tripsina é mediado pelo nervo vago, que leva o sinal do TGI para o SNC é verdadeira, outra via seria responsável pela comunicação deste sinal do SNC com a periferia. Por isso decidimos avaliar o papel das vias espinhais descendentes na resposta à administração de tripsina por via oral. Nossos resultados mostraram que a degeneração das vias serotoninérgica e noradrenérgica bloqueia o efeito da tripsina, aumentando a incapacitação articular e o diâmetro articular dos animais, indicando que essas fibras são importantes no efeito terapêutico da enzima. Com esses resultados, podemos especular que o reflexo anti-inflamatório colinérgico não tem importância no efeito terapêutico da tripsina.

Evidências consistentes na literatura apontam que a ativação vagal causa um reflexo vago-vagal parassimpático anti-inflamatório (Van der Zanden, Boeckxstaens e Jonge, 2009), e que essa via colinérgica teria influência no curso da artrite reumatoide, já sendo considerada como uma alternativa de tratamento para essas doenças (Koopman et. al, 2011; Das, 2011; van Maanen, Vervoordeltonk e Tak, 2009). Dados mostram que essa ativação não somente diminui o processo de artrite em camundongos (van Maanen et al., 2009a) como também inibe o desenvolvimento da artrite em ratos (Zhang et al., 2008). A via anti-inflamatória colinérgica parece ter como seu principal mediador os receptores nicotínicos presentes em macrófagos, reduzindo

assim a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-18, bem como em mastócitos e células dendríticas (Tracey, 2007; Borovikova, Ivanova e Zhang, 2000). Alguns estudos mostram inclusive a presença de receptores nicotínicos na sinóvia de pacientes com artrite (van Maanen et al., 2009b). Frente a nossos resultados, no entanto, essa explicação tem menos vigor, já que todo o efeito da tripsina foi prevenido pela destruição prévia de terminações espinhais serotoninérgicas e noradrenérgicas, que não estão relacionadas ao sistema parassimpático. Se o reflexo anti-inflamatório colinérgico fosse importante para o efeito terapêutico da tripsina, seria esperado que, mesmo após a degeneração das vias descendentes medulares, a diminuição da incapacitação e o diâmetro articular dos animais fossem mantidos após administração da enzima, ou ao menos que a inibição do efeito da enzima fosse menor, mas não totalmente bloqueado, como foi observado. Se isto tivesse acontecido, poderíamos especular que as vias descendentes inibitórias e o reflexo anti-inflamatório colinérgico estariam trabalhando de forma sinérgica no efeito terapêutico da tripsina. Porém nossos resultados mostram que a inibição foi completa, e uma possível participação do sistema parassimpático no efeito da enzima precisaria ser comprovado com a manipulação farmacológica dos receptores nicotínicos.

Os dados na literatura sobre o papel das monoaminas no controle da nocicepção são divergentes, mostrando que elas podem participar tanto do processo facilitatório quanto do processo inibitório da dor (para revisão ver Millan, 2002). Contudo, existem trabalhos que mostram que a antinocicepção causada pelo nervo vago pode se dar a nível de medula espinhal e ser mediada por receptores monoaminérgicos

(Ren, Randich e Gebhart, 1988; Randich e Aicher, 1987), o que reforça os nossos resultados e fortalece a compreensão de uma sequência de respostas que se inicia a partir da ativação do vago e tem como consequência a ativação das vias descendentes inibitórias da dor.

As aferências vagais conduzem a informação sensorial do TGI para o Sistema Nervoso Central através do Núcleo do Trato Solitário (NTS). O NTS faz conexões com vários outros núcleos centrais que controlam a produção e liberação de neurotransmissores importantes na modulação da nocicepção, como o Núcleo da Rafe (Beitz, 1982), onde se origina os neurônios serotoninérgicos, e o *Locus Coeruleus* (Clavier, 1978), origem dos neurônios noradrenérgicos. Além desses núcleos, o NTS ainda faz conexão direta com a Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG) (Blander e Tork, 1987) e a porção Rostroventral da Medula (RMV) (Zagon, 2001). Todos esses sítios centrais são importantes para a ativação e modulação das vias descendentes serotoninérgica e noradrenérgica da nocicepção (Zhao et al., 1999; Stamford, 1995; Eide e Hole, 1993; Behbehani, 1992; Fields e Basbaum, 1978).

As vias espinhais descendentes inibitórias monoaminérgicas se caracterizam por inibirem a neurotransmissão ascendente na medula a partir da ativação de receptores específicos como o receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico e o receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub>, principalmente (Millan, 2002). Ambos os receptores são inibitórios e sua ativação faz com que a liberação de neurotransmissores presentes nas vesículas dos neurônios seja inibida.

O modelo de AIA, como já dito antes, é um modelo de longa duração, com estímulo persistente, capaz de causar intensa atividade dos aferentes primários articulares e, conseqüentemente, o reflexo da raiz

dorsal (RRD; Rees et al., 1996; Sluka e Westlund, 1993). A atividade aumentada dos nociceptores se origina na articulação, de forma persistente, como resultado da ação de inúmeros mediadores do processo inflamatório que tem ação direta e indireta sobre os nociceptores articulares, como por exemplo, prostaglandinas, bradicinina, serotonina, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , etc. Consideramos aqui que o fenômeno de RRD aumenta a liberação de neuropeptídeos vasoativos dos nociceptores periféricos, como substância P e CGRP, agravando o quadro inflamatório no sítio de injeção do adjuvante (para revisão ver Willis, 1999).

Trabalhos prévios na literatura mostram a potencial influência do RRD na inflamação periférica, e que a injeção de substâncias na medula espinhal pode modular positiva ou negativamente a deflagração do RRD (Foletto, Martins e Tonussi, 2012; Bressan et al., 2012; 2010; Brock e Tonussi, 2008; Daher, Melo e Tonussi, 2005; Daher e Tonussi, 2003). Os resultados do presente estudo mostraram que a degeneração das fibras da via descendente inibitória piora artrítico. Em outras palavras, se há a ausência de um estímulo inibitório na medula, frente a um estímulo persistente do CFA, o RRD provavelmente é deflagrado mais intensamente, levando à transmissão antidrômica com liberação de mediadores inflamatórios na articulação, piorando o processo artrítico.

Podemos inferir então que após a ativação vagal, os núcleos centrais responsáveis pela ativação da via descendente inibitória também são ativados, dando início à inibição nociceptiva e conseqüente redução da neurotransmissão medular. Uma vez que a medula tem sua transmissão diminuída a partir do sinal inibitório descendente do encéfalo, a probabilidade de deflagração do RRD é diminuída também.

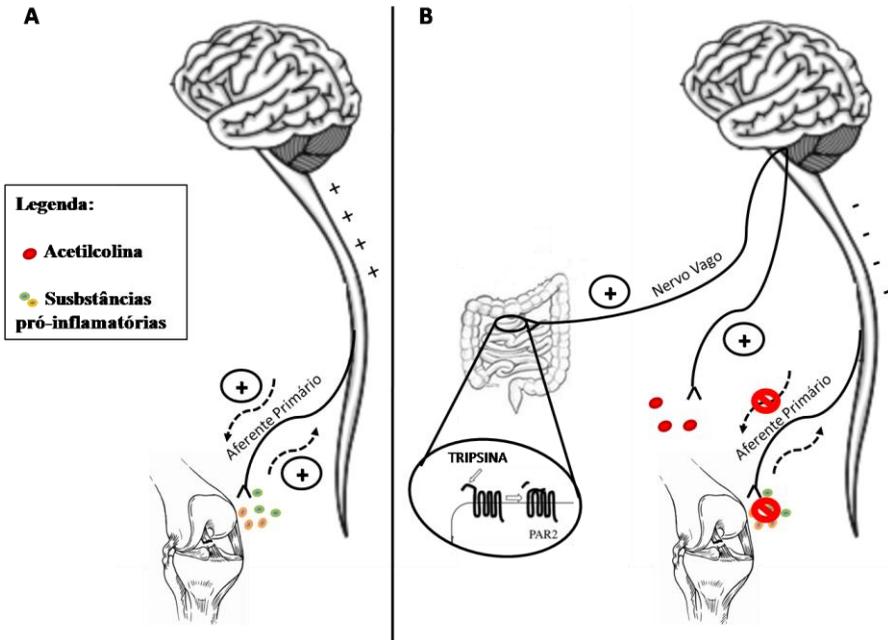
Resultados apresentados anteriormente pelo nosso grupo mostram um controle serotoninérgico espinhal, com papel inibitório importante dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>4</sub> na deflagração do RRD (Daher, Melo e Tonussi, 2005), dados que reforçam a compreensão deste mecanismo proposto. Com isso, podemos destacar a importância das vias descendentes inibitórias para a resposta antiartrítica da tripsina, já que ela não somente produz analgesia como também parece inibir o RRD, proporcionando um efeito anti-inflamatório para o modelo.

Em resumo, nossos resultados sugerem que a tripsina, por possível agonismo em receptores PAR-2, ativaria o nervo vago e essa ativação produziria analgesia e efeito anti-inflamatório a partir da ativação das vias descendentes inibitórias serotoninérgica e noradrenérgica.

Atualmente existem dois medicamentos que tem a tripsina em sua fórmula sendo utilizados amplamente na Alemanha, o *Phlogenzym*<sup>®</sup> e o *Wobenzym*<sup>®</sup>. O primeiro é uma mistura da tripsina, bromelaina (enzima proteolítica) e rutina (flavonóide), e o segundo tem a mesma mistura adicionada ainda de quimo-tripsina (endopeptidase), papaína (enzima proteolítica) e pancreatina (extrato pancreático que contém enzimas pancreáticas). Ambos os medicamentos são usados amplamente como suplemento para atletas na Alemanha, porém dificilmente utilizados nos EUA e em outros países (Ranchordas et al., 2012). Atribui-se a esses medicamentos a capacidade de promover efeitos analgésicos, fibrinolíticos e anti-inflamatórios e, apesar de não haver estudos da eficácia de ambos na medicina do esporte, diversos estudos relacionando-os com a recuperação em situações de injúria e doença podem ser encontrados na literatura (Kerkhoffs, Struijs e de Wit, 2004;

Hollmann, 1998). Inclusive, estudos clínicos sugerem que o *Phlogenzym*<sup>®</sup> se mostrou mais efetivo que o diclofenaco em diminuir a dor de pacientes por até três semanas (Singer, Singer e Oberleitner, 2001). Ainda, a combinação deste composto com a ciclosporina A inibiu o desenvolvimento da artrite em um modelo de AIA (Rovenská et al., 1999). Todos esses dados concordam com os nossos, porém neste trabalho conseguimos mostrar que uma única administração por via oral de tripsina já é capaz de produzir esses efeitos.

O presente estudo sugere, portanto, que uma ativação farmacológica do nervo vago com efeitos analgésicos e anti-inflamatório é possível e que, pelos resultados da enzima neste modelo, a tripsina poderia ser considerada como tratamento para quadros de artrite, tanto de forma isolada ou como adjuvante aos fármacos tradicionais. Um esquema da proposta do mecanismo de ação da enzima está demonstrado na figura 18.



**Figura 18:** Esquema demonstrativo do mecanismo de ação da tripsina. (A) A estimulação persistente do aferente primário leva a deflagração do Reflexo da Raiz Dorsal, que provoca a liberação de substâncias pró-inflamatórias na articulação, piorando o quadro de artrite. (B) A ativação de PAR-2 após a administração de tripsina gera uma sequência de acontecimentos que diminuem o quadro artrítico, iniciando com a ativação do nervo vago, seguida da ativação das vias descendentes inibitórias, reduzindo assim a probabilidade de deflagração do RRD e a nocicepção. Além disso, a liberação de acetilcolina pela ativação da via anti-inflamatória colinérgica também pode diminuir a inflamação articular.

## 7 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

- A tripsina administrada por via oral, em uma única dose, é capaz de promover um efeito em modelo de artrite induzida por imuno-complexo;
- Estes efeitos necessitam da integridade das aferências vagais subdiafragmáticas;
- Estes efeitos necessitam da integridade de terminais adrenérgicos e serotoninérgicos na medula espinhal;
- Este trabalho sugere que a tripsina administrada por via oral promove ativação das aferências vagais no trato gastrointestinal, com subsequente ativações de projeções monoaminérgicas inibitórias do tronco cerebral para a medula espinhal;
- Essa proposta de mecanismo de ação constitui uma abordagem inovadora para o tratamento de inflamações articulares e, portanto, merece estudos mais aprofundados.



**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADAMS, MN., RAMACHANDRAN, R., YAN, MK., SUEN, JY., FAIRLIE, DP., HOLLENBERG, MD., HOOPER, JD. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. **Pharmacology & Therapeutics** (2011); 130:248-282.

AL-ANI, B., HANSEN, KK., HOLLENBERG, MD. Proteinase-activated receptor-2: key role of amino-terminal dipeptide residues of the tethered ligand for receptor activation. **Molecular Pharmacology** (2004); 65:149–156.

BARNEY, BB. A study of Parenyzyme and varidase on the postoperative rhinoplasties of two set of identical twins. **Plastic and Reconstructive Surgery** (1967); 40:263-267.

BARRY, GD., SUEN, JY., LE, GT., COTTRELL, A., REID, RC., FAIRLIE, DP. Novel agonists and antagonist for human protease activated receptor 2. **Journal of Medicinal Chemistry** (2010); 53:7428-7440.

BEHBEHANI, MM. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal Gray. **Progress in Neurobiology** (1992); 46:575-605.

BEITZ, AJ. The nuclei of origin of brainstem enkephalin and substance P projections to the rodent nucleus raphe magnus. **Neuroscience**. (1982); 7:2753-2768.

BERNIK, TR., FRIEDMAN, SG., OCHANI, M., DIRAIMO, R., ULLOA, L., YANG, H., SUDAN, S., CZURA, CJ., IVANOVA, SM., TRACEY, KJ. Pharmacological stimulation of the cholinergic anti-inflammatory pathway. **The Journal of Experimental Medicine** (2002); 195:781-8.

BERTHOUD, HR., NEUHUBER, WL. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. **Autonomic Neuroscience** (2000); 85:1-17.

BILLIAU, A., MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental model of autoimmune diseases. **Journal of Leukocyte Biology** (2001); 70:849-860.

BLANDER, R., TORR, I. Midbrain periaqueductal grey region in the cat has afferent and efferent connections with solitary tract nuclei. **Neuroscience Letters** (1987); 74:1-6.

BOERS, M. NSAIDs and selective COX-2 inhibitors: competition between gastroprotection and cardioprotection. **Lancet** (2001); 357:1222-1223.

BÖHM, SK., KONG, W., BRÖMME, D., SMEEKENS, SP., ANDERSON, DC., CONNOLLY, A., KAHN, M., NELKEN, NA., COUGHLIN, SR., PAYAN, DG., BUNNETT, NW. Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. **Biochemical Journal** (1996); 314:1009-1016.

BONDERSON, J. The mechanisms of action of disease modifying antirheumatic drugs: a review with emphasis on macrophage signal transduction and the induction of proinflammatory cytokines. **General Pharmacology** (1997); 29:127-150.

BOROVIKOVA, LV., IVANOVA, S., NARDI, D., ZHANG, M., YANG, H., OMBRELINO, M., TRACEY, KJ. Role of the vagus nerve signaling in cni-1493-mediated suppression of acute inflammation. **Autonomic Neuroscience** (2000); 85:141-7.

BOROVIKOVA, LV., IVANOVA, S., ZHANG, M. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**. (2000a); 405:458-62.

BRESSAN, E., CUNHA, FQ., TONUSSI, CR. Contribution of TNF-alpha, IL-1beta, and CINC-1 for articular incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis. **Cytokine**. (2006); 36:83-89.

BUSSO, N., FRASNELLI, M., FEIFEL, R., CENNI, B., STEINHOFF, M., HAMILTON, J., SO, A. Evaluation of protease-activated receptor 2 in murine models of arthritis. **Arthritis & Rheumatism** (2007); 56:101-107.

CARTERTON, NL. Cytokines in rheumatoid arthritis: trials and tribulations. **Molecular Medicine Today** (2000); 6:315-323.

CENAC, N., ANDREWS, CN., HOLZHAUSEN, M., CHAPMAN, K., COTTREL, G., ANDRADE-GORDON, P., STEINHOFF, M., BARBARA, G., BECK, P., BUNNETT, NW., SHARKEY, KA., FERRAZ, JG., SHAFFER, E., VERGNOLLE, N. Role of protease activity in visceral pain in Irritable Bowel Syndrome. **Journal of Clinical Investigation** (2007); 117(3):636-47.

CHOY, EHS., PANAYI, GS. Cytokine pathways and joint inflammation in reumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine** (2001); 344:907-916.

CLAVIER, RM. Afferent projections to the lócus coeruleus of the rat as demonstrated by the horseradish peroxidase thechnique. **Anatomical Record** (1978); 190:365.

CUATRECASAS, P. Properties of the insulin receptor of isolated fat cell membranes. **The Journal of Biological Chemistry** (1971); 246: 7265–7274.

CVETKOVIC, JT, WALLBERG-JONSSON, S, STEGMAYR, B, RANTAPAA-DAHLQVIST, S, LEFVERT, AK. Susceptibility for and clinical manifestation of rheumatoid arthritis are associated with polymorphisms of the TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-1Ra genes. **The Journal of Rheumatology** (2002); 29:212-19.

DAHER, JB., MELO, MD., TONUSSI, CR. Evidence for a spinal serotonergic control of the peripheral inflammation in the rat. **Life Sciences**. (2005); 76:2349—2359.

DAHER, JB., TONUSSI, CR. A spinal mechanism for the peripheral anti-inflammatory action of indomethacin. **Brain Research** (2003) 962:207-212.

DAS, UN. Can vagus nerve stimulation halt or ameliorate rheumatoid arthritis and lupus? **Lipids in Health and Disease**. (2011); 10:19.

DAYER, JM., BEUTLER, B., CERAMI, A. Cachectin/Tumor Necrosis Factor stimulates collagenase and prostaglandin E<sub>2</sub> production by human synovial cells and dermal fibroblasts. **The Journal of Experimental Medicine** (1985); 162:2163-68.

DEFEA, K. Beta-arrestins and heterotrimeric G-proteins: collaborators and competitors in signal transduction. **British Journal of Pharmacology** (2008); 153(Suppl 1): S298–S309.

DEFEA, K.A., ZALEVSKY, J., THOMA, MS., DERY, O., MULLINS, RD., BUNNETT, NW. Beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. **The Journal of Cell Biology** (2000); 148:1267–1281.

DERY, O., CORVERA, CU., STEINHOFF, M., BUNNETT, NW. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. **American Journal of Physiology Cell Physiology** (1998); 274:C1429-C1452.

DERY, O., THOMA, MS., WONG, H., GRADY, EF., BUNNETT, NW. Trafficking of proteinase-activated receptor-2 and beta-arrestin-1 tagged with green fluorescent protein. beta-Arrestin-dependent endocytosis of a proteinase receptor. **The Journal of Biological Chemistry** (1999); 274:18524-18535.

DICKSON, DJ. A Double blinded evaluation of topical peroxicam gel with oral ibuprofen in osteoarthritis of the knee. **Current Therapeutic Research** (1991); 49:199-207.

EIDE PK., HOLE, K. The role of 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor subtypes and plasticity in the 5-HT systems in the regulation of nociceptive sensitivity. **Cephalgia**. (1993); 13:75-85.

FERRELL, WR., LOCKHART JC., KELSO, EB., DUNNING, L., PLEVIN, R., MEELX, SE., SMITH, AJH., HUNTER, GD., MC LEAN, JS., MC GARRY, F. Essential role for proteinase-activated receptor 2 in arthritis. **The Journal of Clinical Investigation** (2003); 111:35-41.

FIELDS, HL., BASBAUM, AI. Brainstem control of spinal pain-transmission neurons. **Annual Review of Physiology** (1978); 40:217-248.

FOLETTTO, VR., MARTINS, MA., TONUSSI, CR. The involvement of potassium channels in the peripheral antiedematogenic effect of intratecally injected morphine in rats. **Anesthesia & Analgesia** (2013); 116:232-8.

GEBHART, GF., RANDICH, A. A vagal modulation of nociception. **American Pain Society** (1992) 1:26-32.

GOEHLER, LE., GAYKEMA, RP., HANSEN, MK., ANDERSON, K., MAIER, SF., WATKINS, LR. Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. **Autonomic Neuroscience** (2000); 85:49-59.

GRACE, D., ROGERS, J., SKEITH, K., ANDERSON, K. Topical diclofenac versus placebo: a double blind, randomized clinical trial in patients with osteoarthritis of the knee. **The Journal of Rheumatology** (1999); 26:2659-63.

GREENBERG, DL., MIZE, GJ., TAKAYAMA, TK. Protease-activated receptor-mediated RhoA signaling and cytoskeletal reorganization in LNCaP cells. **Biochemistry** (2003); 42:702-709.

GRIMSHOLM, O., RANTAPAA-DAHLQVIST, S., DALEN, T., FORSGREN, S. Unexpected finding of a marked non-neural cholinergic system in human knee joint synovial tissue. **Neuroscience Letters** (2008); 442:128-33.

GUTIERREZ, LV., KOCAK, N., COX, AG. Alimentary transit and supersensitivity after vagotomy in the rat. **Gut** (1971); 121:625-628.

GUYTON, AC., HALL, JE. Textbook of Medical Physiology. 10<sup>th</sup> ed. 2000. Philadelphia, PA: **WB Sanders Company**. 1064 pp.

HAIBEL, H., SPECKER, C. Disease-modifying anti-rheumatic drugs in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. **Clinical and Experimental Rheumatology** (2009); 27, Suppl 55, S159-S163.

HANSEN, KK., SHERMAN, PM., CELLARS, L., ANDRADE-GORDON, P., PAN, Z., BARUCH, A. A major role for proteolytic activity and proteinase-activated receptor-2 in the pathogenesis of infectious colitis. **Proceedings of the National Academy of Science USA** (2005); 102:8363-8368.

HARRIS, DE., SCHUR, PH., MAINI, RN. Overview of the management of rheumatoid arthritis. In: ROSE, BD, editor. *Up To Date*, 14. 1<sup>st</sup> ed. Wellesley, MA: **Up To Date** (2006).

HATZIAPOSTOLOU, M., POLYTARCHOU, C., PANUTSOPULOS, D., COVIC, L., TSICHLIS, P N. Proteinase-activated receptor-1-triggered activation of tumor progression locus-2 promotes actin cytoskeleton reorganization and cell migration. **Cancer Research** (2008); 68:1851–1861.

HOLLMAN, W. Efficacy and safety of hydrolytic enzymes and rutin in patients with distortions of the ankle joint. Clinical study report MU-694411 (1998); **Idv – Datenanalyse und Versuchsplanung Gauting**.

HOOGERWERF, WA., SHENOY, M., WINSTON, JH., XIAO, SY., HE, Z., PASRICHA, PJ. Trypsin mediates nociception via the proteinase-activated reseptor 2: a potentially novel role in pancreatic pain. **Gastroenterology** (2004); 127(3):883-91.

HOWELLS, GL., MACEY, MG., CHINNI, C., HOU, L., FOX, MT., HARRIOTT, P., STONE, SR. Proteinase-activated receptor 2: expression by human neutrophils. **Journal of Cell Science** (1997); 110:881-887.

HUSTON, JM., OCHANI, M., ROSAS-BALLINA, M., LIAO, H., OCHANI, K., PAVLOV, VA., GALLOWITSCH-PUERTA, M., ASHOK, M., CZURA, CJ., FOXWELL, B., TRACEY, KJ., ULLOA, L. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. **The Journal of Experimental Medicine** (2006); 203:1623-1628.

JÄNIG, W., KHASAR, SG., LEVINE, JD., MIAO, FJ. The role of vagal visceral afferents in the control of nociception. **Progress in Brain Research** (2000); 122:273-87.

JORDAN, KM., ARDEN, NK., DOHERTY, M., BANNWARTH, B., BIJLSMA, JW., DIEPPE, P., GUNTHER, K., HAUSELMANN, H., HERRERO-BEAUMONT, G., KAKLAMANIS, P., LOHMANDER, S., LEEB, B., LEQUESNE, M., MAZIERES, B., MARTIN-MOLA, E., PAVELKA, K., PENDLETON, A., PUNZIL, L., SERNI, U., SWOBODA, B., VERBRUGGEN, G., ZIMMERMAN-GORSKA, I., DOUGADOS, M. EULAR recommendations 2003: na evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: reporto f a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). **Annals of the Rheumatic Diseases** (2003); 62:1145-1155.

KAYSSI, A., AMADESI, S., BAUTISTA, F., BUNNETT, NW., VANNER, S. Mechanisms of protease activated receptor 2-evoked hiperexcitability of nociceptive neurons innervating the mouse colon. **The Journal of Physiology** (2007); 580(3):977-91.

KENAKIN, T., MILLER, LJ. Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. **Pharmacological Reviews** (2010); 62:265–304.

KERKHOFFS, GM., STRUIJS, PA., DE WIT, C. A double blinded, randomized, parallel group study an the efficacy and safety of treating acute lateral ankle sprain with oral hydrolytic enzymes. **British Journal of Sports Medicine** (2004); 38:431-5.

KHASAR, SG., MIAO, FJ., GEAR, RW., GREEN, PG., LEVINE, JD. Vagal modulation of bradykinin-induced mechanical hyperalgesia in the female rat. **The Journal of Pain** (2003); 4(5):278-83.

KHURANA, R., BERNEY, SM. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. **Patophysiology** (2005); 12:153-165.

KIRKUP, AJ., BRUNSDEN, AM., GRUNDY, D. Receptors and transmission in the brain-gut axis: potential for novel therapies. I. Receptors on visceral afferents. **American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology** (2001); 280:G787-94.

KIRKUP, AJ., JIANG, W., BUNNETT, NW., GRUNDY, D. Stimulation of proteinase-activated receptor 2 excites jejuna afferent nerves in anaesthetized rats. **The Journal of Physiology** (2003); 552:589-601.

KITAGAWA,H., TAKENOUCI, T., AZUMA, R., WESNES, KA., KRAMER, WG., CLODY, DE., BURTNETT, AL. Safety, pharmacokinetics and effects on cognitive function of multiple doses of GTS-21 in healthy, male volunteers. **Neuropsychopharmacology** (2003); 28:542-51.

KOOPMAN, FA., STOOF, SP., STRAUB, RH., VAN MAANEN, MA., VERVOORDELDONK, MJ., TAK, PP. Restoring the balance of the autonomic nervous system as an innovative approach to the treatment of rheumatoid arthritis. **Molecular Medicine** (2011); 17:937-948.

LARSSON, E., HARRIS, HE., PALMBLAD, K., MANSSON, B., SAXNE, T., KLARESKOG, L. CNI-1493, an inhibitor of pro-inflammatory cytokines, retards cartilage destruction in rats with collagen induced arthritis. **Annals of Rheumatic Diseases** (2005); 64:494-6.

LEE, DM., WEINBLATT, WE. Rheumatoid Arthritis. **Lancet** (2001); 358: 903-911.

LI, T., ZUO, X., ZHOU, Y., WANG, Y., ZHUANG, H., ZHANG, H., XIAO, X. The vagus nerve and nicotinic receptors involve inhibition of HMGB1 release and early pro-inflammatory cytokines function in collagen-induced arthritis. **Journal of Clinical Immunology** (2010); 30:213-220.

LOHMAN, R.J., COTTRELL, A.J., BARRY, G.D., LIU, L., SUEN, JY., VESEY, DA., FAIRLIE, DP. An antagonist of human protease activated receptor 2 attenuates PAR2 signaling, macrophage activation, mast cell degranulation and collagen-induced arthritis in rats. **The FASEB Journal** (2012); 26:2877-87.

MAEDA, K., OHKURA, S., TSUKAMURA, H. Physiology of reproduction. In: Krinke, GJ. The Laboratory Rat. **Academic Press, London.** (2000); p.154.

MAINI RN., TAYLOR, PC. Anti-cytokine therapy for reumathoid arthritis. **Annual Review of Medicine** (2000); 51:207-229.

MARTEL-PELLETIER, J., MC COLLUM, R., FUJIMOTO, N., OBATA, K., CLOUTIER, JM., PELLETIER, JP. Excess of metalloproteinases over tissue inhibitor of metalloproteinase may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **Laboratory Investigation** (1994); 70:807-15.

MARTIN, GJ., BRENDEL, R., BEILER, JM. Mechanism of the antiinflammatory action of trypsin. **American Journal of Pharmacy** (1955); 125-128.

MARTIN, GJ., BRENDEL, R., BEILER, JM. Absorption of enzymes from the intestinal tract. **American Journal of Pharmacy** (1957); 11:194-197.

MARTINS MA., DE CASTRO BASTOS, L., MELO, NE., TONUSSI, CR. Dependency of nociception facilitation or inhibition after periaqueductal Gray matter stimulation on the context. **Behavioural Brain Research** (2010); 214(2):260-7.

MCKENNA, F., BORENSTEIN, D., WENDT, H., WALLEMARK, C., LEFKOWITH, JB., GEIS, GS. Celecoxib versus diclofenac in the management

of osteoarthritis of the knee. **Scandinavian Journal of Rheumatology** (2001); 30:11-18.

MELZAK & WALL: Text-book of Pain. 5ed. **Churchill Livingstone**, Edinburg (2006).

MIAO, FJ., JÄNIG, W., DALLMAN, MF., BENOWITZ, ML., HELLER, PH., BASBAUM, AI., LEVINE, GD. Role of vagal afferents and spinal pathways modulating inhibition of bradykinin-induced plasma extravasation by intratecal nicotine. **Journal of Neurophysiology** (1994); 72:1199-1207.

MILLAN, MJ. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**. (2002); 66:355-474.

MILLER, JM., GINSBERG, M., MCELFRATRICK, GC., SALDANASCHMIER, R. The use of Parenzyme Buccal and Parenzyme Ointment in the treatment of inflammation and edema. **Experimental Medicine and Surgery** (1959); 17:229-33.

MORRIS, RE. Mechanisms of action of new immunosuppressive drugs. **Therapeutic Drug Monitoring** (1995); 17:564-569.

MOTA, LNH., CRUZ, BA., BREND, CV., PEREIRA, IA., REZENDE-FRONZA, LS., BERTOLO, MB., FREITAS, MVC., SILVA, NA., LOUZADA-JUNIOR, P., GIORGI, RDN., LIMA, RAC., PINHEIRO, GRC. 2012 Brazilian Society of Rheumatology consensus for the treatment of rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia** (2012); 52:135-174.

MTUI, EP., ANMAR, M., GOMEZ, R., REIS, DJ., RUGGIERO, DA. Projections from the nucleus tractus solitarius to the spinal cord. **Journal of Comparative Neurology** (1993); 337:231-252.

MURRAY, CJL., LOPEZ, AD. The global burden of disease. **World Health Organization.** (2007) Genova.

NANRI, M., KASAHARA, N., YAMAMOTO, J., MIYAKE, H., WATANABE, H. A comparative study on effects of nicotine and GTS-21, a new nicotinic agonist, on the locomotor activity and brain monoamine levels. **The Japanese Journal of Pharmacology** (1998); 78:385-9.

NEYA, T., TAKAKI, M., NAKAYAMA, S. Effects of vagotomy on feeding and defecation in guinea pigs. **Acta Medica Okayama** (1979); 33:371-7.

NGUYEN, QD., FAIYRE, S., BRUYNEEL, E., RIVAT, C., SETO, M., ENDO, T. RhoA- and RhoD-dependent regulatory switch of Galpha subunit signaling by PAR-1 receptors in cellular invasion. **The FASEB Journal** (2002); 16:565–576.

NYSTEDT, S., EMILSSON, K., WAHLESTEDT, C., SUNDELIN, J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. **Proceedings of the National Academy of Science USA** (1994); 91:9208-9212.

OMOTE, K., KAWAMATA, T., KAWAMATA, M., NAMIKI, A. Formaline-induced nociception activates a monoaminergic descending inhibitory system. **Brain Research** (1998); 814:194-198.

PACHALY, JR. Terapêutica por Extrapolação Alométrica. In: CUBAS, ZS., SILVA, JCR & CATÃO-DIAS, JL. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária.** 1ªed. São Paulo: Roca, 2006, p.1215-1223.

PASZCUK, AF, QUINTÃO, NLM, FERNANDES, ES, JULIANO, L, CHAPMAN, K, ANDRADE-GORDON, P, CANUPOS, MM, VERGNOLLE, N, CALIXTO, JB. Mechanisms underlaing the nociceptive and inflammatory

responses induced by trypsin in the mouse paw. **European Journal of Pharmacology** (2008); 581:204-215.

PAXINOS, G. The Rat Nervous System. **Academic Press** San Diego (1995).

PEARSON, CM. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. **Proceeding of the Society of Experimental Biology and Medicine** (1956); 91-95.

PEARSON, CM. Lymphocyte depletion in patients with rheumatoid arthritis. **Agent Actions** (1976); 6:28-31.

POCAI, A., LAM, TKT., GUTIERREZ-JUAREZ, R., OBICI, S., SCHWARTZ, GJ., BRYAN, J., AGUILAR-BRYAN, L., ROSSETTI, L. Hypotalamic  $K_{ATP}$  channels control hepatic glucose production. **Nature** (2005); 434:1026-1031.

RAJAGOPAL, S., RAJAGOPAL, K., LEFKOWITZ, RJ. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. **Nature Reviews Drug Discovery** (2010); 9:373–386.

RAMACHANDRAN, R., HOLLEMBERG, MD. Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. **British Journal of Pharmacology** (2008); 153:S263-S282.

RAMACHANDRAN, R., MIHARA, K., MATHUR, M., ROCHDI, MD., BOUVIER, M., DEFEA, K. Agonist-biased signaling via proteinase activated receptor-2: differential activation of calcium and mitogen-activated protein kinase pathways. **Molecular Pharmacology** (2009); 76:791–801.

RANCHORDAS, MK., BURD, N., SENCHINA, DS., BURKE, LM., STEAR, SJ., CASTELL, LM. A-Z of nutritional foods and ergogenic aids for health and performance – part 29. **British Journal of Sports Medicine** (2012); 46:155-156.

RANDICH, A., AICHER, S. Medullary substrates mediating antinociception produced by electrical stimulation of the vagus in the rat. **Soc. Neuroscience Abstracts** (1987); 13:581.

RANG, HP., DALE, MM., RITTER, JM., FLOWER, R. Rang & Dale Farmacologia. 6ed. **Elsevier** (2007) Rio de Janeiro; 844p.

REES, H., SLUKA, KA., WESTLUND, KN., WILLIS, WD. The role of glutamate and GABA receptors in the generation of dorsal root reflexes by acute arthritis in the anaesthetized rat. **The Journal of Physiology** (1995); 484:437-445.

REN, K., RANDICH, A., GEBHART, GF. Vagal afferent modulation of a nociceptive reflex in rats: involvement of spinal opioid and monoamine receptors. **Brain Research** (Apr 1988); 446(2):285-94.

ROSAS-BALLINA, M., OCHANI, M., PARRISH, WR., OCHANI, K., HARRIS, YT., HUSTON, JM., CHAVUN, S., TRACY, KJ. Splenic nerve is required for cholinergic anti-inflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. **Proceedings of the National Academy of Science USA** (2008); 105:11008-11013.

ROVENSKÁ, E., SVÍK, K., STANCÍKOVÁ, M., ROVENSKÝ, J. Enzyme and combination therapy with cyclosporin A in the rat developing adjuvant arthritis. **International Journal of Tissue Reaction** (1999); 21:105-11.

RUSSO, A., SOH, U J., PAING, M M., ARORA, P., TREJO, J. Caveolae are required for protease-selective signaling by protease-activated receptor-1. **Proceedings of the National Academy of Science USA** (2009); 106: 6393–6397.

SAADÍ, NE., AL AMIN, MA., BARCHINI, J., TCHACHAGHIAN, S., SHAMAA, F., JABBUR, SJ., ATWEH, SF. Brainstem injection of lidocaine releases the descending pain-inhibitory mechanisms in a rat model of mononeuropathy. **Experimental Neurology** (2012); 237:180-190.

SCARBOROUGH, RM., NAUGHTON, MA., TENG, W., HUNG, DT., ROSE, J., VU TK. Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. **The Journal of Biological Chemistry** (1992); 267:

SCHAKE, H., DOCKE, WD., ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology and Therapeutics** (2002); 96: 23-43.

SCHEINDLIN, S. Clinical enzymology: enzymes as medicine. **Molecular Interventions** (2007); 7:59-64.

SCHOELS, M., WONG, J., SCOTT, DL., ZINK, A., RICHARDS, P., LANDEWE, R., SMOLEN, JS., ALETAHA, D., Economic aspects of treatment options in rheumatoid arthritis: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases** (2010); 69:996-1004.

SHIIBA, S., YAMAMOTO, S., SASAKI, H., NISHI, M., ISHIKAWA, K., YASUDA, S., TOKUDA, N., NAKANISHI, O., ISHIKAWA, T. Cutaneous Magnetic Stimulation Reduces Rat Chronic Pain via Activation of the Spinal Descending Pathway. **Cellular and Molecular Neurobiology** (2012); 32:245-253.

SHIOZAWA, S., SHIOZAWA, K., FUJITA, T. Morphologic observations in the early phase of the cartilage-pannus junction: light and electron microscopic studies of active cellular pannus. **Arthritis & Rheumatism** (1983); 26:472-78.

SILMAN, AJ. Epidemiology of the rheumatic diseases. 2<sup>nd</sup> ed., **Oxford University Press.** (2001) Oxford.

SINGER, F., SINGER, C., OBERLEITNER, H. Phlogenzym versus diclofenac in the treatment of activated osteoarthritis of the knee. A double blinded prospective randomized study. **International Journal of Immunotherapy** (2001); XVII:135-41.

SLUKA, KA., WESTLUND, KN. Behavioral and immunohistochemical changes in an experimental arthritis model in rats. **Pain** (1993); 55:367-377.

SLUKA, KA., WILLIS, WD., WESTLUND, KN. The role of dorsal root reflexes in neurogenic inflammation. **Pain Forum** (1995); 4:141-149.

SOH, UJ., DORES, MR., CHEN, B., TREJO, T. Signal transduction by protease-activated receptor. **British Journal of Pharmacology** (2010); 160:191-203.

STAMFORD, JÁ. Descending control of pain. **British Journal of Anaesthesia** (1995); 75:217-227.

STARKE, K., GÖTHERT, M., KILLINGER, M. Modulation of transmitter release by presynaptic receptors. **Physiological Reviews** (1989); 69:864-989.

STEINHOFF, M., VERGNOLLE, M., YOUNG, SH., TOGNETTO, M., AMADESI, S., ENNES, HS. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by neurogenic mechanism. **Nature Medicine** (2000); 6:151-158.

SUEN, JY., GARDINER, B., GRIMMOND, S., FAIRLIE, DP. Profiling gene expression induced by protease-activated receptor 2 (PAR2) activation in human kidney cells. **PLoS ONE** (2010); e13809.

SULLIVAN, MJ. AND MARTIN, GJ. Stabilized trypsin compositions containing partially hydrolyzed gelatin. **US Patent 2,930,736**. (mar 1960; assigned to National Drug Company).

SURESH, E. Recent advances in rheumatoid arthritis. **Postgraduate Medical Journal** (2010); 86(1014):243-50.

TERNER, JM., LOMAS, LM., PICKER, MJ. Influence of estrous cycle on gonadal hormone depletion on nociception and opioid antinociception in female rat of four strains. **The Journal of Pain**. (2005); 6:372-383.

TODD, AJ., KOEBERG, HR. Neuroanatomical substrates of spinal nociception. In: MELZAK & WALL: Text-book of Pain. 5ed. **Churchill Livingstone**, Edinburg (2006).

TONUSSI, CR., FERREIRA, SH. Rat knee joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**. (1992); 48:421-427.

TRACEY, KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. **The Journal of Clinical Investigation** (2007); 117:289-96.

VAN DER ZANDEN, EP., BOECKXSTAENS, GE., DE JONGE, WJ. The vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation. **Neurogastroenterology and Motility** (2009); 21:6-17.

VAN MAANEN, MA., LEBRE, MC., VAN DER POLL, T., LA ROSA, GJ., ELBAUM, D., VERVOORDELDONK, MJ., TAK, PP. Stimulation of nicotinic acetylcholine receptors attenuates collagen-induced arthritis in mice. **Arthritis & Rheumatism**. (2009a); 60:114-122.

VAN MAANEN, MA., STOOFF, SP., VAN DER ZANDEN, EP., DE JONGE, WJ., JANSSEN, RA., FISCHER, DF., VANDEGHINSTE, N., BRYNS, R., VERVOORDELDONK, MJ., TAL, PP. The  $\alpha_7$ nicotinic acetylcholine receptor on the fibroblast like synoviocytes and in synovial tissue from rheumatoid arthritis patients: a possible role for a key neurotransmitter in synovial inflammation. **Arthritis & Rheumatism** (2009b); 60:1272-81.

VAN MAANEN, MA., VERVOORDELDONK, MJ., TAK, PP. The cholinergic anti-inflammatory pathway: towards innovative treatment of rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology** (2009); 5:229-32.

VANE, JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biology** (1971); 231:232-239.

VANE, JR., BAKHLE, YS., BOTTING, RM. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** (1998); 38:97-120.

VANE, JR., BOTTING, RM. Therapeutic roles of selective COX-2 inhibitors. **William Harvey Press**, London (2001); p584.

VERGNOLLE, N. Proteinase-activated receptor 2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion and extravasation *in vivo*. **The Journal of Immunology** (1999); 163:5064-5069.

VERGNOLLE, N., BUNNETT, NW., SHARKEY, KA., BRUSSEE, V., COMPTON, S., GRADU, EF. Proteinase-activated receptors-2 and hyperalgesia: a novel pain pathway. **Nature Medicine** (2001); 7:821-826.

VINOGRADOVA, EP., ZHUKOV, DA., BATUEV, AS. The effects of stages of the estrous cycle on pain thresholds in female white rats. **Neuroscience and Behavioral Physiology**. (2003); 33:269-72.

VU, TK., HING, DT., WHEATON, VI., COUGHLIN, SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. **Cell** (1991); 64: 10571068.

WANG, H., YU, M., OCHANI, M., AMELLA, CA., TANOVIC, M., SUSARLA, S., LI, JH., WANG, H., YANG, H., ULLOA, L., AL ABED, Y., CZURA, CJ., TRACEY, KJ. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature** (2003); 421:384-8.

WATKINS, LR., MAIER, SF., GOEHLER, LE. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. **Pain** (1995); 63:289-302.

WEIR, MR., SPERLING, RS., REICIN, A., GERTZ, BJ. Selective COX-2 inhibition and cardiovascular effects: a review of the rofecoxib development program. **American Heart Journal** (2003); 146:591-604.

WHITEHOUSE, DJ., WHITEHOUSE, MW., PEARSON, CM. Passive transfer of adjuvant-induced arthritis and allergic encephalomyelitis in rats using thoracic duct lymphocytes. **Nature** (1969); 224:1322.

WHITEHOUSE, MW. Adjuvant arthritis 50 year on: the impact of 1956 article by C. M. Pearson, 'Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants'. **Inflammation Research** (2007); 56:133-138.

WILKENS, T. Glucocorticoids and immune function: physiological relevance and pathogenic potential of hormonal dysfunction. **Trends in Pharmacological Sciences** (1995); 16:193-197.

WILLIS, WD. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. **Experimental Brain Research** (1999); 124:395-421.

YOU, HJ., LEI, J., SUI, MY., HUANG, L., TAN, YX., TJØLSEN, A., ARENDT-NIELSEN, L. Endogenous descending modulation: spatiotemporal effect of dynamic imbalance between descending facilitation and inhibition of nociception. **The Journal of Physiology** (2010); 588:4177-4188.

YU, S., GAO, G., PETERSON, VZ., OUYANG, A. TRPA1 in mast cell activation-induced long-lasting mechanical hypersensitivity of vagal afferent C-fibers in guinea pig esophagus. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology** (2009); 297:G34-G42.

ZAGON, A. Sciatic and vagal sensory inputs converge onto non-baroreceptive neurones of the rostral ventrolateral medulla. **Brain Research** (2001); 896:64-68.

ZHANG, P., HAN, D., TANG, T., ZHANG, X., DAI, K. Inhibition of the development of collagen-induced arthritis in wistar rats through vagus nerve suspension: a 3-month observation. **Inflammation Research** (2008); 57:322-328.

ZHAO, Y., ZHANG, CE., KANG, YM., QIAO, JT., DAFNY, N. Endogenous adenosine involved in the mediation of spinal antinociception produced by stimulating locus coeruleus. **Life Sciences** (1999); 65:67-74.