

Maíra Macêdo Norões

**A ADMINISTRAÇÃO POR VIA INTRATECAL DOS
IMUNOSSUPRESSORES TERIFLUNOMIDA E METOTREXATO
INIBE A INCAPACITAÇÃO E O EDEMA ARTICULAR
PERIFÉRICOS INDUZIDOS POR LPS EM RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi.

Florianópolis
2015

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

Norões, Maíra Macêdo

A administração por via intratecal dos imunossuppressores teriflunomida e metotrexato inibe a incapacitação e o edema articular periféricos induzidos por LPS em ratas / Maíra Macêdo Norões ; orientador, Carlos Rogério Tonussi - Florianópolis, SC, 2015.

78 p.

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

Inclui referências

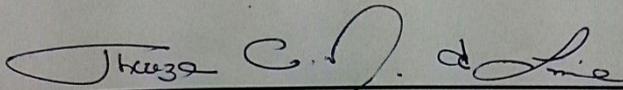
1. Farmacologia. 2. artrite reumatoide. 3. células gliais. 4. inflamação neurogênica. 5. minociclina. I. Tonussi, Carlos Rogério. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

"A administração por via intratecal dos imunossupressores teriflunomida e metotrexato inibe a incapacitação e o edema articular periféricos induzidos por LPS em ratas"

Por

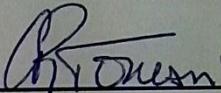
Maíra Macêdo Norões

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (018/PPGFMC/2015) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – UFSC.

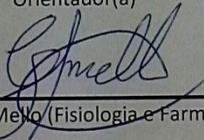


Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Farmacologia

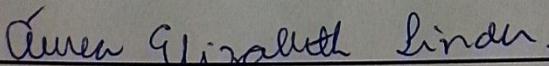
Banca examinadora:



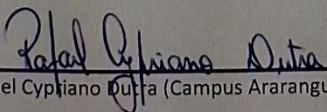
Dr(a) Carlos Rogério Tonussi (FMC/CCB/UFSC)
Orientador(a)



Dr(a) Carlos Fernando de Melo (Fisiologia e Farmacologia/CCS/UFSC)



Dr(a) Áurea Elizabeth Linder (FMC/CCB/UFSC)



Dr(a) Rafael Cypriano Dutra (Campus Araranguá/UFSC)

Florianópolis, 22 de Maio de 2015.

Este trabalho é dedicado aos meus pais
Odair e Aldacy.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi, por ter aceitado me orientar, pela colaboração, paciência, respeito e conhecimentos repassados durante as discussões.

Aos professores Dra. Áurea Elizabeth Linder, Dr. Carlos Fernando de Mello e Dr. Rafael Cypriano Dutra, e ao Dr. Francisney Pinto do Nascimento, por terem aceitado participar da banca examinadora, pela contribuição na correção e pelas valiosas sugestões para o aprimoramento desse trabalho.

Aos colegas do LANEN pela amizade, receptividade e boa convivência. Em especial aos amigos Flora, Lucas, Taci e Vanessa, que gentilmente me ensinaram todas as técnicas utilizadas, além da preocupação, conselhos e ajuda essenciais para a execução desse trabalho.

Aos demais colegas, professores e funcionários do Departamento de Farmacologia da UFSC, pela colaboração e dedicação.

Aos familiares e amigos pelo apoio, amizade e carinho.

Ao CNPq e Capes, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Leflunomida e metotrexato são drogas modificadoras do curso da doença classicamente utilizadas por via sistêmica no tratamento da artrite reumatoide e o sucesso clínico está relacionado com a inibição da proliferação de células imunes e de citocinas na cavidade articular. Baseado nestes potenciais efeitos inibitórios, nossa principal hipótese é que a administração direta dessas drogas na medula é capaz de reduzir a infiltração de leucócitos, edema e incapacitação articular em um modelo de artrite induzida por LPS. Ratos Wistar fêmeas, pesando entre 200 e 220 g, receberam as drogas por via intratecal, 2 horas antes da administração de LPS (30 ng/ 50 µl; i.a.) nas articulações de joelho previamente sensibilizadas com carragenina (300 µg/ 20 µl; i.a.). A incapacitação articular foi avaliada pelo tempo de elevação da pata (TEP; s) durante o deambular de 1 min; o edema pelo aumento do diâmetro articular (DA; cm) e a migração celular pela contagem total de leucócitos (CT; cel/mm³) do fluido sinovial coletado ao final de 5 horas de observação dos parâmetros. As administrações por via intratecal de teriflunomida (metabólito ativo da leflunomida) (0,1 e 20 µg/ 10 µl) e metotrexato (25 µg/ 10 µl) foram capazes de reduzir a migração celular para o fluido sinovial, a incapacitação e o edema articular promovidos pelo LPS, ao contrário de quando administrados por via intraperitoneal, sugerindo que o sítio de interação para os efeitos antiartríticos das drogas foi restrito ao ambiente medular. A coadministração com uridina (10 µg) reverteu apenas os efeitos inibitórios produzidos pela menor dose de teriflunomida, sugerindo que apenas em maiores concentrações o mecanismo de ação da droga independe da inibição da síntese *de novo* de nucleotídeos. A coadministração por via intratecal de teriflunomida (0,1 µg) e bumetanida (60 µg), um bloqueador do reflexo da raiz dorsal, não potencializou o efeito inibitório da teriflunomida na redução da incapacitação, edema e migração celular, sugerindo que a inibição do reflexo da raiz dorsal e consequentemente da inflamação neurogênica estejam envolvidos na ação medular da teriflunomida. A coadministração de teriflunomida (0,1 µg) e metotrexato (25 µg) por via intratecal promoveu um efeito somatório na inibição da inflamação articular, provavelmente pela adição do mecanismo imunomodulador do metotrexato na inibição da síntese de citocinas pelas células gliais. O presente estudo sugere que o tratamento por via intratecal com teriflunomida e metotrexato modula a inflamação periférica provavelmente por reduzir o aumento da quantidade de citocinas inflamatórias na medula, através da inibição da atividade glial que inibe

a sensibilização dos terminais neuronais medulares envolvidos na sinalização nociceptiva e na indução da inflamação neurogênica. Esta estratégia pode representar uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da artrite reumatoide com menos efeitos colaterais sistêmicos.

Palavras-chave: artrite reumatoide, inflamação neurogênica, minociclina, bumetanida, células gliais.

ABSTRACT

Leflunomide and methotrexate are disease-modifying antirheumatic drugs classically used systemically in the treatment of rheumatoid arthritis and clinical success is related to inhibition of proliferation of immune cells and cytokines in the joint cavity. Based on these potential inhibitory effects, our central hypothesis is that the direct administration of these drugs on the spinal cord is able to reduce articular incapacitation, edema and synovial leukocyte infiltration induced in a model of LPS-induced arthritis. Female Wistar rats, weighing between 200 and 220 g were given the drugs intrathecally 2 hours before administration of LPS (30 ng/ 50 μ l; i.a.) in the knee joints previously sensitized with carrageenan (300 μ g/ 20 μ l; i.a.). Inflammation-induced incapacitation was measured hourly by the paw elevation time (TEP; s) in 1-min period of observation, and edema was evaluated by the articular diameter increase (DA; cm) taken just after each incapacitation measurement. After the 5-h period of observation parameters the synovial fluid was collected from articular capsule for total leukocyte count (CT; cells/ mm³). Intrathecal administration of teriflunomide (active metabolite of teriflunomide) (0.1 and 20 μ g/ 10 μ l) and methotrexate (25 μ g/ 10 μ l) were able to reduce cell migration to the synovial fluid, incapacitation and joint edema induced by LPS, unlike when given by intraperitoneal route, suggesting that the interaction site for antiarthritic effects of drugs was restricted to spinal cord microenvironment. Co-administration with uridine (10 μ g) just reverses the inhibitory effects produced by the lower dose of intrathecal teriflunomide, suggesting that only in the higher concentrations of the drug mechanism of action independent from inhibition of *de novo* synthesis of nucleotides. Co-administration of intrathecal teriflunomide (0.1 μ g) and bumetanide (60 μ g), a blocker of the dorsal root reflex did not potentiate the inhibitory effect of teriflunomide on the reduction of incapacitation, edema and cell migration, suggesting that inhibition of dorsal root reflex and neurogenic inflammation are involved in spinal action of teriflunomide. Co-administration of teriflunomide (0.1 μ g) and methotrexate (25 μ g) intrathecally caused a summation effect on inhibition of joint inflammation, probably due to the addition of methotrexate immunomodulatory mechanism of inhibition on cytokine synthesis released by glial cells. Thus, this study proposes that the intrathecal methotrexate and leflunomide modulates the peripheral inflammation by inhibiting on increase of cytokines in spinal cord that sensitizes neuronal terminals involved in nociceptive signaling and

induction of neurogenic inflammation. This strategy may represent a novel therapeutic approach for the treatment of rheumatoid arthritis with fewer systemic side effects.

Keywords: rheumatoid arthritis, neurogenic inflammation, minocycline, bumetanide, glial cells.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura química da leflunomida e de seu metabólito ativo teriflunomida (A77 1726).....27
- Figura 2:** Protocolo experimental.....40
- Figura 3:** Curva dose-resposta dos efeitos do LPS no TEP (s) e no DA (cm) em ratas sensibilizadas com carragenina.....44
- Figura 4:**Efeitos da administração por via intratecal de baixas concentrações de TFM na incapacitação, diâmetro articular e migração de leucócitos46
- Figura 5:** Efeitos da coadministração por via intratecal de TFM e uridina na incapacitação, diâmetro articular e migração de leucócitos.....48
- Figura 6:** Efeitos da coadministração por via intratecal de TFM e bumetanida na incapacitação, diâmetro articular e migração de leucócitos.....50
- Figura 7:** Efeitos da administração por via intraperitoneal de MTX na incapacitação, diâmetro articular e migração de leucócitos.....52
- Figura 8:** Efeito da administração por via intratecal de MTX e de coadministrações de TFM com MTX e minociclina na incapacitação, diâmetro articular e migração de leucócitos.....54
- Figura 9:** Efeitos da administração por via intraperitoneal das doses de teriflunomida e MTX efetivas no tratamento por via intratecal, na incapacitação, diâmetro articular e migração de leucócitos.....56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AICAR: 5-aminoimidazole-4-carboxamida ribonucleotídeo
- AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AR: artrite reumatoide
- ATIC:5-aminoimidazole-4-carboxamida ribonucleotídeo transformilase
- BTN: bumetanida
- CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (do inglês, *calcitonin gene-related peptide*)
- COX: ciclo-oxigenase
- CT: contagem total
- DA: diâmetro articular
- DF: diidrofolato
- DHODH: diidroorotato desidrogenase (do inglês, *dihydroorotate dehydrogenase*)
- DMCDs: drogas modificadoras do curso da doença
- DMSO: dimetilsulfóxido
- E.P.M.: erro padrão da média
- EUA: Estados Unidos da América
- EULAR: Liga Europeia contra o Reumatismo (“*European League Against Rheumatism*”)
- FDA: agência reguladora de fármacos e alimentos dos Estados Unidos (“*Food and Drug Administration*”)
- GABA: ácido gama-aminobutírico
- GFAP: proteína glial fibrilar ácida (do inglês, *glial fibrillary acidic protein*)
- i.a.: intra-articular
- i.p.: intraperitoneal
- i.t.: intratecal
- IASP: Associação Internacional para Estudo da Dor (“*International Association for the Study of Pain*”)
- IL: interleucina
- LANEN: Laboratório de Neurobiologia da Nocicepção
- LFM: leflunomida
- LPS: lipopolissacarídeo
- MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês, *mitogen-activated protein kinases*)

- MTX: metotrexato
- MTX-PGs: poliglutamatos de metotrexato (do inglês, *methotrexate polyglutamates*)
- NFAT: fator nuclear ativador de linfócitos (do inglês, *nuclear factor of activated T-cells*)
- NK1: receptor da neurocinina-1 (do inglês, *neurokinin-1 receptor*)
- NKCC1: cotransportador de cloreto, sódio e potássio (do inglês, *Na-K-Cl cotransporter*)
- PAD: despolarização do aferente primário (do inglês, *primary afferent depolarization*)
- PBS: tampão fosfato salina (do inglês, *phosphate buffered saline*)
- PTKs: proteínas tirosina quinases (do inglês, *protein tyrosine kinases*)
- rUMP: ribonucleotídeo de uridina monofosfato
- RRD: reflexo da raiz dorsal
- SNC: sistema nervoso central
- SP: substância P
- SUS: Sistema Único de Saúde
- TF: tetraidrofolato
- TFM: teriflunomida
- TNF- α : fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *tumor necrosis factor alpha*)

SUMÁRIO

1. Introdução	17
1.1 Artrite reumatoide.....	17
1.2 O envolvimento da medula espinhal na modulação da dor e da inflamação periférica.....	20
1.3 A inibição da atividade glial como um potencial alvo para a modulação da dor e inflamação periférica.....	24
1.4 Leflunomida.....	26
1.5 Metotrexato.....	29
2. Objetivo Geral	33
2.1 Objetivos específicos.....	33
3. Material e Métodos	35
3.1. Animais.....	35
3.2. Drogas utilizadas.....	35
3.3. Modelo experimental de artrite induzida por LPS.....	36
3.4. Avaliação da fase do ciclo estral.....	37
3.5 Administração por via intra-articular.....	37
3.6 Administração por via intratecal.....	38
3.7 Teste algométrico (Teste de Incapacitação Articular).....	38
3.8 Mensuração do diâmetro articular (DA).....	39
3.9 Coleta de fluido sinovial e contagem total (CT) de leucócitos.....	39
3.10 Protocolo experimental.....	40

3.11 Análises Estatísticas.....	41
4. Resultados.....	43
4.1 Efeitos de diferentes concentrações de LPS na incapacitação e edema articular em ratas sensibilizadas com carragenina.....	43
4.2 Efeitos da administração por via intratecal de baixas concentrações de TFM na incapacitação, diâmetro articular e migração de leucócitos.....	45
4.3 A coadministração de uridina e TFM reverte apenas os efeitos inibitórios produzidos pela menor dose do imunossupressor.....	47
4.4 TFM administrado por via intratecal não inibe incapacitação, diâmetro articular e migração de leucócitos, em animais tratados com bumetanida.....	49
4.5 A administração por via intraperitoneal de MTX inibe incapacitação e diâmetro articular.....	51
4.6 Efeito da administração por via intratecal de MTX e de coadministrações de TFM com MTX e minociclina na incapacitação, diâmetro articular e migração de leucócitos.....	53
4.7 O tratamento sistêmico com as doses de teriflunomida e de metotrexato que foram efetivas quando administradas por via intratecal não é capaz de inibir a incapacitação, diâmetro articular e migração de leucócitos.....	55
5. Discussão.....	57
6. Considerações Finais.....	65
7. Conclusões.....	67
8. Referências bibliográficas.....	69

INTRODUÇÃO

1.1 ARTRITE REUMATOIDE

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica de caráter autoimune que afeta simetricamente as articulações ocasionando uma destruição progressiva do tecido, inchaço, dor, e deformidades que em conjunto são responsáveis pelo quadro característico de incapacidade física de seus portadores (CHOY, 2012; LEE; WEINBLATT, 2001).

A AR é o tipo mais prevalente de artrite inflamatória, afetando aproximadamente 0,5 a 1,0 % da população mundial adulta, existindo uma maior incidência no sexo feminino (2 a 3 vezes maior em relação ao sexo masculino) e pico de incidência na faixa etária entre 30 e 50 anos (ALAMANOS; DROSOS, 2005).

Apesar do alto impacto econômico gerado devido ao caráter incapacitante progressivo e do acompanhamento médico e farmacológico permanente, poucos inquéritos de prevalência da AR foram realizados no Brasil. O primeiro e único estudo multicêntrico realizado com amostras populacionais de diferentes regiões afirma que a prevalência da AR varia entre 0,2 e 1,0 % nas regiões norte, nordeste, centro-oeste e sul do Brasil (MARQUES NETO *et al*, 1993).

Embora a sua etiologia ainda não esteja totalmente elucidada, vários estudos ao longo dos últimos anos têm demonstrado que a patogênese da AR está associada com interações entre fatores de risco genéticos e ambientais que ocasionam a perda da tolerância imunológica com o aumento do número de células T autorreativas e a produção de autoanticorpos (IAIN M.B., SCHETT, 2011).

A principal característica da fisiopatologia da AR é a inflamação da membrana sinovial que ocorre principalmente devido à infiltração de leucócitos no compartimento articular. A infiltração ocorre após a ativação local de células T autorreativas, que aumentam a quantidade de quimocinas no compartimento sinovial, ocasionando mudanças no padrão de expressão de moléculas de adesão no endotélio sinovial e o influxo de leucócitos para a região (CHOY, 2012).

Outra característica histológica da sinóvia inflamada inclui a proliferação de sinoviócitos, que aumenta a quantidade local de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) e proteases, e posteriormente forma uma camada característica denominada *pannus*,

que é responsável pela destruição da cartilagem e erosão óssea (LEE; WEINBLATT, 2001).

Os principais sintomas da AR são a rigidez, dor e inchaço das articulações acometidas que levam a redução da mobilidade e da qualidade de vida do paciente. O curso da doença varia de um estado mais brando e autolimitante até a instalação de um quadro inflamatório progressivo e disseminado, com afecção das articulações simétricas e a sua subsequente deformidade, além de manifestações extra-articulares como a perda de peso, insônia e fadiga, caracterizando a morbidade da doença e a diminuição da expectativa de vida (LEE; WEINBLATT, 2001).

Com os avanços no entendimento sobre os mecanismos patofisiológicos envolvidos aliado a novas ferramentas que possibilitam o diagnóstico precoce, os principais objetivos do atual tratamento da AR incluem a prevenção ou a interrupção do dano ósseo-cartilaginoso (evitando a evolução para um quadro de deformidade e debilitante da doença) e a redução dos sintomas locais, como a dor e o edema, e dos sintomas extra-articulares. Essas medidas melhoram o prognóstico da doença e evitam a incapacidade física do paciente (GUIDELLI et al., 2015; MARIA et al., 2012; MOTA; LAURINDO; SANTOS NETO, 2010).

Nos últimos anos, a principal mudança no manejo clínico do tratamento da AR foi a revogação da antiga pirâmide de condução para a terapia da doença, onde se prescrevia para o tratamento inicial somente anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e corticoides. Esses fármacos eram eficazes na redução dos sintomas de dor e inchaço articulares, mas não eram capazes de reduzir o potencial dano estrutural que o processo inflamatório causa às articulações, além dos efeitos colaterais com o uso prolongado, como distúrbios gastrointestinais e osteoporose que dificultam a aderência ao tratamento (MARIA et al., 2012).

Atualmente o uso de drogas modificadoras do curso da doença (DMCDs) já nos estágios iniciais da AR, no período que compreende o diagnóstico laboratorial da presença de autoanticorpos relacionados no soro e antes dos primeiros sintomas da instalação do quadro inflamatório, são fortemente recomendados. Estudos relatam que tais agentes quando prescritos nas fases iniciais da AR (9 meses antes do início dos sintomas) são capazes de reduzir em 33% a progressão radiológica no decorrer de 3 anos (BREEDVELD; KALDEN, 2004; KRAAN et al., 2000; MOTA; LAURINDO; SANTOS NETO, 2010).

As primeiras DMCDs surgiram no início dos anos 80 com o propósito de reduzir, suprimir ou eliminar a atividade da AR por impedir a progressão do dano articular que é responsável pela condição debilitante do paciente (PAULUS, 1982). As DMCDs são divididas em duas classes: os compostos sintéticos, como o metotrexato, leflunomida e sulfassalazina e os novos agentes biológicos desenvolvidos para atuarem em alvos específicos envolvidos na imunopatologia da AR, como por exemplo, o infliximabe e o abatacepte, que inibem especificamente TNF- α e a coestimulação de linfócitos T, respectivamente (KOENDERS; VAN DEN BERG, 2015).

No Brasil, a Sociedade Brasileira de Reumatologia estabelece diretrizes para o tratamento da AR de acordo com as recomendações da Liga Europeia contra o reumatismo (EULAR). Nestas diretrizes, as DMCDs sintéticas são recomendadas como primeira linha de escolha para o tratamento da AR, sendo o padrão-ouro estabelecido a monoterapia com metotrexato ou a sua associação com corticoides ou AINES, que serão utilizados para tratar de imediato os sintomas inflamatórios de dor e inchaço articular. Caso a remissão ou a diminuição de atividade da doença não sejam alcançadas, recomenda-se a troca por outra DMCD sintética (geralmente leflunomida ou sulfassalazina) ou o uso de combinações (na maioria dos casos, metotrexato e leflunomida). O acompanhamento e os ajustes de doses devem ser feitos no decorrer dos seis primeiros meses após o tratamento ser instituído e a resposta ao tratamento no final desse período deve ser estabelecida (MARIA et al., 2012; SMOLEN et al., 2010).

As DMCDs biológicas bloqueadoras do TNF- α (adalimumabe, certolizumabe, etanercepte, infliximabe e golimumabe) constituem a segunda linha de tratamento em casos de pacientes que não apresentam remissão dos sintomas após a monoterapia ou a combinação de DMCDs sintéticos. Dentre as DMCDs biológicas, essas possuem maior quantidade de informação sobre toxicidade, bem como estudos que comprovem a sua eficácia (KOENDERS; VAN DEN BERG, 2015; MOTA; LAURINDO; SANTOS NETO, 2010).

Outras DMCDs biológicas utilizadas no tratamento da AR, incluem o abatacepte (bloqueador da coestimulação de células T), o rituximabe (depletor de linfócitos B) e o tocilizumabe (bloqueador do receptor de interleucina-6). Esses agentes foram desenvolvidos mais recentemente e constituem a terceira linha de escolha para o tratamento de pacientes onde ocorre falha terapêutica ou intolerância à DMCD

biológica bloqueadora de TNF- α em uso. Esses agentes apresentam custos ainda mais elevados e são poucos os dados sobre a segurança e eficácia do uso em longo prazo (KOENDERS; VAN DEN BERG, 2015; MARIA et al., 2012).

No Brasil, todas as DMCDs biológicas são aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e são obtidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS), mediante prescrição médica. A distribuição de medicamentos para o tratamento da AR corresponde a principal despesa do SUS, principalmente em relação às DMCDs biológicas como o infliximab, onde a mediana de gasto mensal per capita com esse agente, entre 2003 e 2006 foi de R\$ 3.466,03, enquanto os gastos com DMCDs sintéticas não ultrapassou o valor de R\$ 143,85 per capita (COSTA et al., 2014).

Apesar das DMCDs biológicas representarem um grande avanço no tratamento da AR, cerca de 30% dos pacientes não respondem adequadamente ao tratamento (KOENDERS; VAN DEN BERG, 2015). Além dessa falha terapêutica, os efeitos colaterais como a imunossupressão grave, o alto custo e poucos estudos que comprovem a segurança do uso em longo prazo, levam à constante busca de novos alvos e abordagens terapêuticas (KRAAN et al., 2000; LEE; WEINBLATT, 2001).

Estudos relatam que a dor e o edema característicos de processos inflamatórios crônicos periféricos podem ser modulados pela manipulação do sistema nervoso central (SNC), especificamente da medula espinhal (BOETTGER et al., 2010; DAHER; DE MELO; TONUSSI, 2005; SLUKA; WESTLUND, 1993).

O melhor entendimento de como o SNC pode regular a resposta imune periférica pode ter implicações no desenvolvimento de novos tratamentos para a AR, além de representar uma nova perspectiva para o controle da dor e da progressão do estado inflamatório nas articulações afetadas pela doença (BOYLE et al., 2006).

1.2 O ENVOLVIMENTO DA MEDULA ESPINHAL NA MODULAÇÃO DA DOR E DA INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA.

A interação entre um processo inflamatório periférico e o SNC é caracterizada por uma ativação bidirecional: da periferia para o SNC, com a chegada do sinal de estímulo doloroso até os neurônios medulares, e do SNC para a periferia, com a descarga de mediadores

inflamatórios que constituem o componente neurogênico da inflamação periférica (SCHAIBLE; DEL ROSSO; MATUCCI-CERINIC, 2005).

Inflamação neurogênica é a denominação dada ao conjunto de eventos inflamatórios promovidos pela liberação de neuropeptídeos por terminações periféricas de aferentes primários tais como, vasodilatação, extravasamento plasmático (edema), quimiotaxia para leucócitos e degranulação de mastócitos. A inflamação neurogênica pode iniciar ou exacerbar um processo inflamatório periférico pré-existente e, portanto, é apontada como a principal via de modulação da inflamação periférica pelo SNC (XANTHOS; SANDKÜHLER, 2014).

Os principais neuropeptídeos liberados pelas fibras aferentes são a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Ambos possuem ação vasodilatadora, porém a taquicinina SP apresenta uma ação mais demorada que promove extravasamento plasmático e ainda possui função quimiotática que promove o influxo de leucócitos para a região (BIRKLEIN; SCHMELZ, 2008).

A SP também pode interagir diretamente com as células imunes presentes no ambiente inflamatório periférico via ativação de seu receptor NK1 presente na superfície dessas células. A ativação do NK1 promove aumento na liberação de histamina e TNF- α em mastócitos e de IL-6 e TNF- α em monócitos. O aumento das citocinas pró-inflamatórias promovido pela ação da SP pode exacerbar a sensibilização dos nociceptores periféricos e fortalecer a sinalização dolorosa do processo inflamatório (BIRKLEIN; SCHMELZ, 2008).

A inflamação neurogênica ocorre, em grande parte, devido ao fenômeno conhecido como reflexo da raiz dorsal (RRD) que consiste na transmissão do impulso sensorial de forma antidrômica da medula espinhal em direção à periferia, através dos neurônios aferentes primários peptidérgicos do tipo C ou A δ (SLUKA; WILLIS; WESTLUND, 1995). O mecanismo responsável pela deflagração do RRD é a despolarização dos aferentes primários (PAD) iniciada em suas terminações medulares, em situações patológicas (SLUKA; WILLIS; WESTLUND, 1995; WILLIS, 1999).

Em condições normais, uma ação inibitória é mantida devido a uma despolarização moderada exercida pela liberação contínua de GABA por interneurônios da lâmina II, sobre os receptores GABA_A nos terminais centrais destes aferentes primários (RUDOMIN; SCHMIDT, 1999).

Neste tipo de inibição pré-sináptica, parte da população de canais de sódio ativados por voltagem (NaV) está inativada devido à despolarização peculiar que se dá em nociceptores quando da ativação de receptores GABA_A, pois nestas células ocorre uma corrente de íons cloreto (Cl⁻) orientada para fora. Essa despolarização moderada diminui as chances de potenciais de ações vindos da periferia invadirem a porção sináptica destes nociceptores, conseqüentemente diminuindo o influxo de Ca²⁺ e a liberação de neurotransmissores pelo terminal pré-sináptico (WILLIS, 2006).

Na inflamação crônica periférica, os aferentes primários estão em contínua ativação, levando a informação sensorial do dano tecidual até as terminações medulares com a liberação constante de neurotransmissores excitatórios como o glutamato. O glutamato além de estimular os neurônios de segunda ordem na continuação do impulso da transmissão nociceptiva, também estimula os interneurônios inibitórios gabaérgicos a liberarem o GABA. O GABA ao se ligar em seus receptores GABA_A presentes nos terminais dos aferentes primários, intensifica o efluxo de Cl⁻ aumentando o PAD e esse efeito se sobrepõe à inibição pré-sináptica resultando na deflagração do RRD (SLUKA; WILLIS; WESTLUND, 1995).

A alta concentração de Cl⁻ nos terminais pré-sinápticos é mantida pelo cotransportador NKCC1, através do coinfluxo de Cl⁻, Na⁺ e K⁺. Estudos relatam que durante um processo inflamatório crônico a atividade do NKCC1 está elevada, o que sugere a sua importância para a manutenção do gradiente de Cl⁻, despolarização do terminal aferente e o contínuo RRD nestas condições patológicas (WEI et al., 2010).

Em modelos animais de inflamação, a administração por via intratecal de bloqueadores do NKCC1, como furosemida e bumetanida (BTN), reduz a inflamação periférica provavelmente devido à inibição da despolarização e o conseqüente enfraquecimento do RRD. Essas drogas também promovem a redução da nocicepção, visto que além da liberação de neuropeptídeos na periferia, o RRD também promove a liberação de neuropeptídeos no corno da raiz dorsal, fortalecendo a propagação sináptica da dor durante processos inflamatórios periféricos (BRESSAN; PERES; TONUSSI, 2012; GRANADOS-SOTO; ARGUELLES; ALVAREZ-LEEFMANS, 2005; WEI et al., 2010).

A inflamação crônica mantém a ativação persistente dos aferentes primários devido à sensibilização e ativação de seus nociceptores pelos mediadores inflamatórios presentes no sítio da lesão

(sensibilização periférica) (FUGGLE et al., 2014). Essa ativação persistente dos aferentes primários promove a liberação contínua de neurotransmissores (glutamato, SP e CGRP) no corno da raiz dorsal da medula levando a hiperexcitabilidade e alterações na sensibilidade dos neurônios secundários da transmissão nociceptiva (sensibilização central) (RICHARDSON; VASKO, 2002).

Em conjunto, a sensibilização periférica e a central causam o estado de hiperalgesia mecânica (onde estímulos mecânicos normalmente não dolorosos agora causam dor) e hiperalgesia térmica (diminuição do limiar de ativação ao calor ou frio) que são fenômenos bem característicos de processos inflamatórios periféricos (SCHAIBLE; DEL ROSSO; MATUCCI-CERINIC, 2005).

A sensibilização central é a amplificação do processo de transmissão nociceptiva na medula e esse aumento na eficácia sináptica também pode levar a alterações de plasticidade na medula, como o surgimento da hiperalgesia secundária devido ao aumento de resposta para áreas adjacentes (SCHAIBLE; DEL ROSSO; MATUCCI-CERINIC, 2005).

Estudos relatam que após a denervação das fibras sensoriais primárias peptidérgicas ocorre diminuição na concentração de neuropeptídeos no fluido sinovial e inibição do edema e da hiperalgesia em modelos animais de artrite, sugerindo que os processos de inflamação neurogênica e RRD estão fortemente relacionados com a indução ou a exacerbação do processo artrítico periférico (CRUWYS; GARRETT; KIDD, 1995).

Outros estudos demonstraram que a presença de SP no fluido sinovial está relacionada com o aumento na produção de collagenases e radicais livres pelos sinoviócitos e de histamina, TNF- α e interleucinas pró-inflamatórias por mastócitos e macrófagos. O aumento dessas substâncias no fluido sinovial amplifica a sensibilidade dolorosa e o inchaço das articulações, além de estarem relacionadas com as lesões articulares características do quadro artrítico (SCHAIBLE; DEL ROSSO; MATUCCI-CERINIC, 2005).

Nos últimos anos, a busca pelo melhor entendimento dos fenômenos neuronais de RRD e sensibilização central medulares evidenciou a participação de células não-neuronais vizinhas que poderiam ser ativadas ou ter sua atividade amplificada quando esses processos estivessem ativos. Essas células, especificamente microglia e astrócitos, participam ativamente da modulação desses fenômenos e a

inibição da atividade dessas células constitui uma nova perspectiva para o tratamento de estados dolorosos neuropáticos e de doenças inflamatórias crônicas como a AR (GRACE et al., 2014; WATKINS; MAIER, 2003).

1.3 A INIBIÇÃO DA ATIVIDADE GLIAL COMO UM POTENCIAL ALVO PARA A MODULAÇÃO DA DOR E INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA.

O termo glia é referido ao conjunto de diferentes tipos de células não-neuronais que podem ser encontradas no sistema nervoso periférico (células de Schwann, células satélites, glia perineural) e central (microglia, astrócitos, oligodentrócitos e glia perivascular) (JHA; JEON; SUK, 2012).

As células gliais representam 70% do SNC e por muito tempo foi considerado que a única função exercida por essas células seria a sustentação e proteção dos neurônios. Entretanto, atualmente já está bem descrito que a ativação da microglia e astrócitos pode sensibilizar a atividade neuronal através da liberação de moléculas sinalizadoras, além da modulação da captação de neurotransmissores na fenda sináptica. (AUSTIN; MOALEM-TAYLOR, 2010; GRACE et al., 2014).

Vários estudos já demonstraram a ativação da microglia e dos astrócitos em diferentes modelos animais de neurite, neuropatia periférica e artrite e a contribuição das citocinas liberadas por essas células ativadas para o aumento dos comportamentos de dor associados aos modelos (GRACE et al., 2014).

As células microgлияis são os macrófagos residentes do SNC que em condições normais encontram-se na sua forma quiescente e sua estrutura é caracterizada por numerosas ramificações denominadas de processos microgлияis. Quando ocorre uma perturbação da homeostase no meio, a microglia é rapidamente ativada e a sua transição para uma forma ativa fagocítica envolve diferentes processos, como a perda dos processos microgлияis e mudança da estrutura para o formato ameboide, que a caracterizam como uma célula imunocompetente com funções de migração, proliferação, expressão de proteínas de membrana e liberação de citocinas. A ativação microgлияl é caracterizada pela expressão de proteínas como CD11b (OX-42) e Iba1 (AUSTIN; MOALEM-TAYLOR, 2010; GRACE et al., 2014).

Os astrócitos apresentam uma atividade basal no SNC que está relacionada com a manutenção da homeostase do meio extracelular, através da regulação de íons, prótons e da concentração de neurotransmissores (AUSTIN; MOALEM-TAYLOR, 2010). Em resposta a alterações do meio extracelular, os astrócitos aumentam a sua atividade e da mesma forma que a microglia, ocorrem mudanças morfológicas como a hipertrofia e a retração de suas ramificações, aumento na síntese de proteína glial fibrilar ácida (GFAP), além do aumento da taxa de proliferação e a liberação de citocinas, que caracterizam o astrócito como uma célula imunocompetente (ABBOTT; RÖNNBÄCK; HANSSON, 2006; JHA; JEON; SUK, 2012).

As fibras aferentes primárias ao realizarem a transdução do estímulo nociceptivo persistente induzido por uma lesão periférica, também iniciam a sinalização imune no corno dorsal medular devido à liberação contínua de glutamato, ATP, SP e quimiocinas neuronais como a fractalcina (CX3CL1) que em elevadas concentrações são estressoras para o meio extracelular medular e ativam seus receptores presentes nas células microgлияis e nos astrócitos (GRACE et al., 2014; JHA; JEON; SUK, 2012).

A minociclina é uma droga bastante utilizada como ferramenta experimental para a inibição seletiva de células microgлияis, pois inibe fortemente a proliferação e a síntese de citocinas como o TNF- α e IL-1 β . O mecanismo de ação sugerido para a minociclina seria a inibição do fator nuclear ativador de linfócitos (NFAT), enfraquecendo a sinalização inicial necessária para a ativação da microglia, o que interfere na migração, proliferação e transcrição de citocinas (SZETO et al., 2011). Outro mecanismo sugerido está relacionado com a inibição da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) p38, que regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores como a COX-2 (LEDEBOER et al., 2005).

As substâncias liberadas pela microglia e astrócitos incluem TNF- α , IL-1 β , IL-6, quimiocinas, óxido nítrico, prostaglandinas e ATP. Essas substâncias liberadas pela microglia podem aumentar a ativação dos astrócitos e promover a diminuição da atividade dos transportadores de glutamato, o que reduz a captação desse neurotransmissor na fenda sináptica e modula a neurotransmissão (BRESSAN; PERES; TONUSSI, 2012; JHA; JEON; SUK, 2012).

Os produtos liberados pelas células gлияis (denominação geral para microglia e astrócito utilizada neste trabalho) podem modular os

fenômenos do RRD e sensibilização central, por promover mudanças no padrão de ativação dos neurônios, como *up-regulation* dos receptores NMDA do glutamato, aumentando a condutividade para esse neurotransmissor excitatório que fortalece a sinalização do processo nociceptivo no neurônio pós-sináptico (sensibilização central) e a despolarização dos terminais pré-sinápticos intensificando o PAD e a manutenção do RRD (BRESSAN; PERES; TONUSSI, 2012).

A administração por via intratecal de drogas que possuem efeito inibitório na ativação ou em outras características de células gliais ativadas (migração, proliferação ou liberação de citocinas), parece ser um mecanismo vantajoso para o controle da dor e da inflamação crônica periférica em casos de neuropatias e artrite.

1.4 LEFLUNOMIDA

Leflunomida (N-(4-trifluorometilfenil)-5-metilisoxazol-4-carboxamida) é um derivado isoxazol de baixo peso molecular (270 g/mol), sintetizado pela primeira vez na década de 80 durante um programa de desenvolvimento de novas drogas anti-inflamatórias realizado pela empresa alemã Hoechst (FOX et al., 1999a).

Os primeiros estudos com a leflunomida (LFM) foram conduzidos em modelos animais murinos de artrite e doenças autoimunes que revelaram um potencial efeito da molécula como uma droga imunossupressora e de modificação da doença (BARTLETT; SCHLEYERBACH, 1985). Esses efeitos foram posteriormente comprovados em estudos de eficácia e segurança clínica, e em 1998, a empresa Hoechst recebeu a aprovação do FDA (*Food and Drug Administration*) para a comercialização da LFM (Arava®) como uma nova DMCD sintética para o tratamento da AR e de outras doenças imunomediadas (FOX et al., 1999a, 1999b).

A LFM é um pró-fármaco que no plasma e no trato gastrointestinal sofre rápida conversão não-enzimática em seu metabólito ativo denominado teriflunomida (TFM) ou A77 1726 [(2-ciano-3-hidroxi-N-(4-trifluorometil-fenil) butanamida], uma malononitrilamida responsável pelos efeitos farmacológicos (Figura 1) (BREEDVELD; DAYER, 2000).

Embora não seja uma conversão enzimática, estudos farmacocinéticos sugerem que após a administração por via oral, o fígado é o local onde ocorre a maior parte da conversão da LFM em

TFM, que possui elevado tempo de meia vida (15 dias) devido a sua alta ligação com proteínas plasmáticas (99,5%) (FOX et al., 1999a).

Os mecanismos de ação através dos quais a TFM produz seus efeitos imunossupressores observados na clínica (redução dos sintomas e da progressão das lesões articulares) foram elucidados durante os estudos de fase clínica para a aprovação da LFM e consistiam na maior parte de ensaios *in vitro* e de análises por citometria de fluxo do conteúdo de enzimas e de nucleotídeos presentes em células imunes cultivadas na presença da TFM (BREEDVELD; DAYER, 2000).

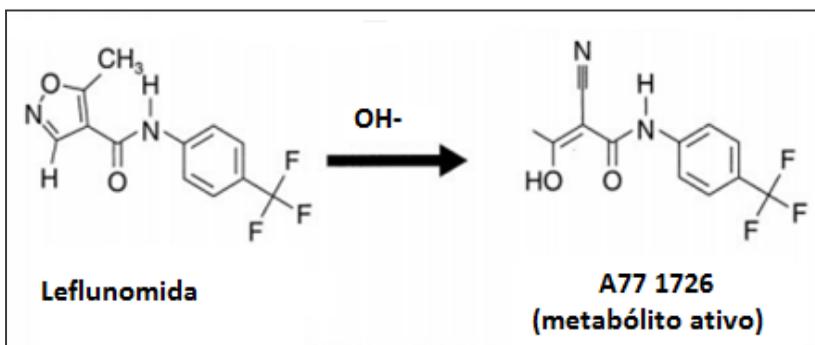


Figura 1: Estrutura química da leflunomida e de seu metabólito ativo teriflunomida (A77 1726). A conversão ocorre após a perda de uma hidroxila da molécula da LFM que ocasiona a quebra do anel isoxazol e a formação do metabólito ativo TFM (Adaptado de FOX et al., 1999a; MANNA; MUKHOPADHYAY; AGGARWAL, 2000).

Esses estudos apontam que a TFM possui dois mecanismos de ação dependentes da concentração da droga no meio de cultura e do tipo de célula imune utilizado. O primeiro mecanismo seria a inibição da enzima mitocondrial diidroorotato desidrogenase (DHODH) em concentrações nanomolares (~15nM em ratos, ~80nM em camundongos e ~650nM em humanos), ocasionando um efeito antiproliferativo dose-dependente em células imunes estimuladas que pode ser revertido com a suplementação com uridina monofosfato (HERRMANN et al., 2000).

A DHODH é a enzima chave da síntese de ribonucleotídeos rUMP (uridina monofosfato) e de outros ribonucleotídeos de pirimidina através da via *de novo* de síntese de pirimidinas, utilizada por células com alta taxa proliferativa para a obtenção de pools de nucleotídeos suficientes para a síntese de DNA e RNA. Ao bloquear essa enzima a TFM impede a proliferação de células T autorreativas, macrófagos e seus produtos inflamatórios, além de diminuir a produção de anticorpos através da supressão do número de células B. Outras células que possuem estados de proliferação consideráveis (células hematopoiéticas medulares e as gastrointestinais) são pouco afetadas pela ação da TFM, pois utilizam a via de salvação (que independe da DHODH) para obter nucleotídeos pirimidínicos necessários para a manutenção da sua taxa basal de proliferação e divisão celular (BREEDVELD; DAYER, 2000).

O segundo mecanismo de ação sugerido para a TFM é a inibição de enzimas proteínas tirosina quinases (PTKs) quando as concentrações de TFM são aproximadamente de 100 a 300 vezes maiores que as efetivas em inibir a enzima DHODH. Em relação à inibição das PTKs p56^{lck} e p59^{fyn} e a diminuição da síntese e sinalização estimulatória por IL-2, os estudos *in vitro* realizados em células imunes apresentam controvérsias relacionadas com a concentração de TFM, período de incubação, tipo de célula e de estímulo utilizado e, portanto, ainda não está claro o papel da TFM no enfraquecimento do sinal inicial de ativação e na inibição do fator nuclear ativador de linfócitos (NFAT) (HERRMANN et al., 2000).

Outros estudos *in vitro* já demonstram que os efeitos inibitórios da TFM relacionados com a inibição das PTKs são dose-dependentes, como o bloqueio da ativação do fator de transcrição de citocinas NFκβ (~50-10 μM), a supressão da expressão de TNF-α, IL-1β e COX-2 (~1-30 μM/L), diminuição de IL-4 (125 μM), óxido nítrico e metaloproteinases (3 μg/ml) (BUSCH-DIENSTFERTIG et al., 2012; CUTOLO et al., 2003; ELKAYAM et al., 2003; MANNA; AGGARWAL, 1999; MANNA; MUKHOPADHYAY; AGGARWAL, 2000; YAO et al., 2004).

Após a descrição *in vitro* do mecanismo de ação da TFM via inibição de PTKs, surgiu o questionamento sobre a sua participação no efeito terapêutico produzido pela LFM em estudos experimentais *in vivo* e na clínica. Apesar do mecanismo de inibição da enzima DHODH apresentar maior potência em relação à concentração de TFM necessária para esse efeito, o mecanismo de inibição das PTKs pode ser mais

relevante, pois parece estar relacionado com a inibição da ativação e a modulação da expressão de citocinas pelas células imunes reativas no tecido sinovial (CHONG et al., 2000; KRAAN et al., 2000).

CHONG et al., 2000 demonstraram em modelos *in vivo* de autoimunidade induzida por xenotransplante em ratos Lewis, que ambos os mecanismos de ação eram necessários para o efeito terapêutico da TFM, onde a uridina administrada reverteu parcialmente o efeito da maior dose de LFM administrada (35mg/kg/dia). Em outro estudo utilizando um modelo de esclerose múltipla em ratos Lewis, a uridina não foi capaz de reverter a supressão dos sinais da doença realizada pela administração de TFM, sugerindo que neste modelo, o efeito terapêutico da droga não é dependente do mecanismo de inibição da DHODH (CHONG et al., 2000; CLAUSSEN; KORN, 2012; KORN et al., 2004).

É observável que em relação ao *in vitro*, o mecanismo de ação imunossupressor da TFM *in vivo* é mais complexo de ser estudado e envolve vários fatores como o tipo e intensidade da resposta imunológica, disponibilidade de uridina para o uso da via de salvação para a síntese de DNA e transcrição, espécie investigada e a concentração de TFM no plasma (CHONG et al., 2000).

O potencial efeito da TFM na inibição da expressão de substâncias que sensibilizam os nociceptores causando a exacerbação dos estados de dor, como o TNF- α , IL-1 β , óxido nítrico, COX-2, espécies reativas de oxigênio e produtos da peroxidação lipídica (MANNA; MUKHOPADHYAY; AGGARWAL, 2000; WATKINS; MAIER, 2003) sugere que a LFM possa ter relevância terapêutica no tratamento da dor.

Ainda não existem estudos que verificaram o efeito da LFM na reversão de quadros de dor exagerados ou na inibição de seu desenvolvimento inicial e o uso da LFM por via sistêmica como tratamento exclusivo da dor deve ser cauteloso visto que se trata de uma droga imunossupressora e efeitos tóxicos podem ser mais consideráveis que os benefícios do tratamento.

1.5 METOTREXATO

O MTX é um agente citotóxico e imunossupressor utilizado no tratamento do câncer e considerado uma DMCD padrão-ouro para o tratamento da AR e de outras doenças inflamatórias autoimunes como a doença de Crohn e a psoríase (CHAN; CRONSTEIN, 2013).

Em 1940, foi originalmente comercializado para o tratamento de neoplasias devido ao seu potente efeito inibitório sobre a replicação de células malignas. Dez anos mais tarde, a administração de baixas doses de MTX também promoveu efeito terapêutico no tratamento de alguns casos de AR e esse efeito parecia ser devido a sua ação citostática sobre as células imunes envolvidas na fisiopatologia da doença. No final dos anos 80, após estudos clínicos mais precisos confirmarem a segurança e a eficácia do tratamento, o MTX foi aprovado para o tratamento da AR em doses efetivas menores do que as recomendadas para o tratamento quimioterápico (CHAN; CRONSTEIN, 2013; CRONSTEIN; NAIME; OSTAD, 1993; CRONSTEIN, 1996).

O MTX (ácido 4-amino-n-10-metilpteroilglutâmico) é um análogo do ácido fólico (ácido pteroilglutâmico) que ao ser transportado para dentro das células sofre um processo enzimático de poliglutamação resultando em compostos ativos denominados poliglutamatos de MTX (MTX-PGs). O principal alvo dos MTX-PGs é a enzima diidrofolato redutase (DFR) envolvida na redução do diidrofolato (DF) em tetraidrofolato (TF). O TF é o precursor das formas ativas de cofatores de folato que são necessários para a síntese de constituintes do DNA (timina, purinas, metionina e serina). A redução na quantidade de TF pela ação do MTX está relacionada com o mecanismo antineoplásico da droga que resulta na apoptose de células malignas com altas taxas de proliferação devido à falta de constituintes para a síntese de DNA (CHABNER et al., 1985; ŚWIERKOT; SZECHIŃSKI, 2006).

A ação imunossupressora da droga é relatada em estudos com modelos murinos de artrite induzida por colágeno, onde tratamento com MTX reduziu a síntese de TNF- α (NEURATH et al., 1999) e em estudos clínicos que relatam níveis de metaloproteinases, TNF- α e NF κ B reduzidos e a secreção da citocina anti-inflamatória IL-10 aumentada em amostras de tecido sinovial de pacientes tratados com MTX (KRAAN et al., 2000; RUDWALEIT et al., 2000; SPURLOCK et al., 2014).

Atualmente, ainda não está totalmente claro o mecanismo bioquímico pelo qual o MTX exerce seus efeitos anti-inflamatórios no tratamento da AR (STAMP et al., 2012). Os primeiros estudos clínicos do uso de MTX no tratamento da AR relataram que o desenvolvimento de imunossupressão e aplasia medular durante o uso da droga foi prevenido com a administração concomitante de ácido fólico o que não reduziu os efeitos terapêuticos. Esse fato sugere que a inibição da

proliferação de células imunes reativas não seria um mecanismo essencial para a sua eficácia (CRONSTEIN; NAIME; OSTAD, 1993).

A principal hipótese sobre o mecanismo anti-inflamatório do MTX sugere que, em menores concentrações a droga inibe outras enzimas do ciclo do folato, como as necessárias para a metabolização da adenosina. A expressão endógena de adenosina está aumentada em doenças crônicas inflamatórias como a AR e sua ação está relacionada com a redução da síntese de TNF- α e IL-12 e com a estimulação da transcrição da citocina anti-inflamatória IL-10 em células imunes ativadas (ERNST; GARRISON; THOMPSON, 2010).

Estudos em modelos animais de AR subsequentes reforçaram essa hipótese, pois demonstravam que o tratamento com MTX ao reduzir o quadro de lesão articular e edema também aumentava os níveis endógenos de adenosina (CRONSTEIN; NAIME; OSTAD, 1994) e antagonistas dos receptores de adenosina eram capazes de reverter os efeitos do MTX (MONTESINOS et al., 2000). Em outro estudo, o efeito anti-inflamatório do MTX é relacionado ao aumento da concentração de adenosina, menor influxo de leucócitos e redução na expressão de TNF- α presentes nos exudatos de camundongos naïves, fato que não ocorreu em camundongos *knockout* para o receptores de adenosina A2 e A3 (MONTESINOS et al., 2003).

O mecanismo proposto através do qual o MTX aumenta os níveis endógenos de adenosina está relacionado com a inibição de outra enzima envolvida na metabolização do folato chamada 5-aminoimidazole-4-carboxamida ribonucleotídeo (AICAR) transforamilase (ATIC). A inibição da enzima ATIC resulta no acúmulo de AICAR que promove a inibição das enzimas adenosina desaminase e adenosina monofosfato desaminase, necessárias para a conversão da adenosina em inosina. A adenosina em excesso dentro da célula é posteriormente transportada para o meio extracelular, onde pode ativar seus receptores A₂ e A₃ que estão presentes na superfície celular, gerando o aumento da concentração de AMP cíclico que promove redução na expressão e síntese de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-12 e IL-1 β de células imunes ativas (ERNST; GARRISON; THOMPSON, 2010; HIDER; BRUCE; THOMSON, 2007).

Considerando o exposto nas seções acima, a inibição farmacológica da atividade glial na medula espinhal pode representar uma nova abordagem para o tratamento da AR e, uma vez que o TFM e o MTX possuem ação antiproliferativa e promovem a redução de

citocinas inflamatórias que estão relacionadas com a sensibilização neuronal promovida pela ativação glial, a aplicação intratecal destes imunossupressores pode constituir nova estratégia para o tratamento dessa doença.

OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da administração por via intratecal da teriflunomida (metabólito ativo da droga leflunomida) e do metotrexato na inflamação periférica articular através dos parâmetros de incapacitação articular, edema e migração leucocitária em um modelo de artrite induzida por LPS.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito da administração por via intratecal de diferentes concentrações de TFM na incapacitação e diâmetro articulares e na migração de leucócitos para o fluido sinovial no modelo de artrite induzida por LPS;
- Verificar o efeito da coadministração por via intratecal de TFM e BTN na incapacitação e diâmetro articulares e na migração de leucócitos para o fluido sinovial no modelo de artrite induzida por LPS;
- Verificar se a coadministração por via intratecal de uridina com diferentes concentrações de TFM é capaz de alterar os efeitos da TFM na incapacitação e diâmetro articulares e na migração de leucócitos para o fluido sinovial no modelo de artrite induzida por LPS;
- Analisar o efeito da administração por via intraperitoneal de MTX na incapacitação e diâmetro articulares e na migração de leucócitos para o fluido sinovial no modelo de artrite induzida por LPS;
- Analisar o efeito da administração por via intratecal de MTX e minociclina, e a coadministração destes com TFM, na incapacitação e diâmetro articulares e na migração de leucócitos para o fluido sinovial no modelo de artrite induzida por LPS.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar da linhagem *Rattus norvegicus* fêmeas (200-220 gramas) com aproximadamente 90 dias de idade. Os animais foram criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (BIC-UFSC), transferidos após o desmame para o Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia e encaminhados com idade aproximada de 75 dias ao biotério do Laboratório de Neurobiologia da Nocicepção (LANEN), onde os experimentos foram realizados.

No biotério do LANEN, os animais foram agrupados em gaiolas de polipropileno forradas com serragem (6 animais por gaiola) e mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com o acesso livre à água e ração comercial.

Imediatamente após a chegada dos animais ao biotério do LANEN, iniciou-se um tratamento para prevenir afecções parasitárias com o anti-helmíntico ivermectina (suspensão 5 mg/mL) dissolvido na água disponibilizada em cada gaiola (500mL) por um período de 5 dias consecutivos.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados entre 8:00 e 17:00 horas, após ambientação prévia dos animais na sala onde os experimentos foram realizados por pelo menos 1 hora. Os protocolos experimentais utilizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFSC (número de protocolo: PP00723) e, também, respeitando as recomendações éticas definidas pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP, 1983).

3.2. DROGAS UTILIZADAS

As drogas e seus respectivos veículos utilizados para a diluição estão listados abaixo:

- Carragenina do tipo múltiplo kappa / lambda (BDH Chemicals LTDA, Inglaterra): solução salina 0,9%;
- Lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* sorotipo 055:B5 (Difco, EUA): solução salina 0,9%;

- Teriflunomida (A77 1726) (metabólito ativo da droga leflunomida) (Sigma-Aldrich, EUA): solução de PBS 10% DMSO;
- Metotrexato (Sigma-Aldrich, EUA): solução de PBS 10% DMSO;
- Minociclina (Sigma-Aldrich, EUA): solução de PBS 10% DMSO;
- Bumetanida (Sigma-Aldrich, EUA): solução de bicarbonato de sódio 1,29%;
- Uridina (Sigma-Aldrich, EUA): solução de PBS 10% DMSO;
- Anestésico inalatório isoflurano (Isoflurine®): 2% em oxigênio hospitalar.

3.3. MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR LPS

A indução da artrite pelo LPS nesse modelo experimental foi feita através de uma injeção intra-articular (i.a.) de LPS (1 ou 30 ng/sítio; 50 μ L) diluído em solução fisiológica estéril (0,9 %) na articulação túbio-femural do joelho posterior direito, previamente sensibilizada com uma injeção i.a. de carragenina (300 μ g/sítio; 20 μ L) diluída em solução fisiológica estéril (0,9 %).

A administração de carragenina foi realizada 3 dias antes do LPS com o objetivo de mimetizar um trauma prévio na região articular e assim, amplificar a resposta inflamatória ao LPS que ocorre logo após 1 hora da sua administração. O processo artrítico (nocicepção, edema e aumento leucocitário na articulação do joelho) é promovido pela forte ativação das células imunes locais, como macrófagos e mastócitos, previamente sensibilizadas após a injeção de carragenina. Os efeitos nociceptivos e edematogênicos promovidos pelo LPS foram avaliados pelo teste de incapacitação articular, em paralelo com a análise das medidas do diâmetro articular e ao final de 5 horas de observação desses parâmetros inflamatórios, a coleta do líquido sinovial foi realizada para a análise da migração leucocitária.

3.4. AVALIAÇÃO DA FASE DO CICLO ESTRAL

A escolha de ratos fêmeas como animais experimentais utilizados nesse estudo foi uma forma de aproximar o modelo da realidade clínica da AR onde existe uma potencial influência desse sexo na incidência da doença, visto um maior número de mulheres do que homens acometidos pela doença (ALAMANOS; DROSOS, 2005).

Estudos em roedores apontam que diferenças hormonais ocasionadas pelas variações do ciclo estral podem influenciar a sensibilidade nociceptiva em fêmeas (VINOGRADOVA; ZHUKOV; BATUEV, 2003) e por isso, uma randomização em bloco foi realizada de forma que todos os grupos experimentais eram proporcionais em relação à fase do ciclo estral dos representantes, evitando assim que as alterações nociceptivas avaliadas refletissem uma diferença hormonal entre os grupos e não uma diferença ocasionada pelos tratamentos.

Após um período de ambientação de 1 hora e imediatamente antes do início dos procedimentos experimentais, os lavados vaginais das ratas foram coletados cuidadosamente com o uso de uma pipeta com ponteira contendo solução salina (0,9 %). As amostras foram organizadas em uma lâmina e analisadas quanto à morfologia celular no microscópio, visto que as alterações na morfologia do epitélio vaginal estão relacionadas com a flutuação dos níveis de estradiol e caracterizam cada fase do ciclo estral: estro (predomínio de células cornificadas denominadas de “folhas secas”), diestro (predomínio de leucócitos) e proestro (predomínio de células arredondadas dispersas ou agrupadas) (VILELA; SANTOS; SILVA, 2007).

3.5 ADMINISTRAÇÃO POR VIA INTRA-ARTICULAR (I.A.)

Os animais foram imobilizados cuidadosamente com uma flanela de forma que permanecesse na posição de decúbito dorsal, com a perna direita exposta e flexionada. O joelho direito foi tricotomizado para a observação do tendão infrapatelar e a injeção dentro da cavidade sinovial foi realizada através desse tendão. Cerca de 1/3 da agulha (BD Ultra fine; comprimento 8 mm; calibre 0,33 ou 29 gauge) foi introduzida perpendicularmente na cavidade sinovial e o volume máximo injetado foi de 50 µl.

3.6 ADMINISTRAÇÃO POR VIA INTRATECAL

A injeção das drogas por via intratecal (i.t.) seguiu o método descrito por Mestre e colaboradores (1994). Os animais foram anestesiados com isoflurano (2% em oxigênio hospitalar) e uma agulha (BD Ultra fine; comprimento 12,7 mm; calibre 0,33 ou 29 gauge) foi inserida perpendicularmente no espaço intervertebral entre L5 e L6, até atingir o espaço subaracnoide.

O movimento rápido da cauda (flick) é observado indicando que o espaço subaracnoide foi atingido pela agulha, então a administração da droga é feita e espera-se um tempo de 3 segundos antes da retirada da agulha para que não ocorra o refluxo da droga. O volume máximo injetado pela via intratecal foi de 20 μ l.

3.7 TESTE ALGESIMÉTRICO (TESTE DE INCAPACITAÇÃO ARTICULAR)

O Teste de Incapacitação Articular foi descrito por Tonussi e Ferreira em 1992 e permite a avaliação da função das articulações durante o deambular dos animais em um cilindro metálico através da medida do tempo em que o animal permanece com a pata levantada sem tocar no cilindro.

Sapatilhas metálicas (confeccionadas com folhas de flandres) foram acopladas nas patas traseiras dos animais, mas somente a sapatilha da pata direita (lado em que o joelho recebeu a injeção de carragenina e LPS) estava ligada a um fio condutor que enviou a informação do circuito fechado (sapatilha apoiada no cilindro) para um computador. O programa do computador registrou o tempo em que a pata sensibilizada permaneceu sem tocar a superfície do cilindro durante o tempo de deambulação de 1 minuto e o tempo de elevação da pata (TEP em segundos) foi o parâmetro de avaliação da incapacitação articular para o movimento do animal no cilindro. O TEP nos animais que ainda não receberam o estímulo do LPS é denominado TEP basal e varia em torno de 7-15 segundos, enquanto o TEP de animais que

receberam o estímulo do LPS pode chegar ao valor máximo de 60 segundos, refletindo na total incapacidade de uso da articulação.

Os animais foram treinados pelo menos 24 horas antes do dia do experimento para a adaptação do uso das sapatilhas e a deambulação correta no cilindro sem cair e antes do teste, os animais foram ambientados no local dos experimentos por pelo menos 1 hora.

3.8 MENSURAÇÃO DO DIÂMETRO ARTICULAR (DA)

O edema articular induzido pela injeção i.a. de LPS foi mensurado através da medida do diâmetro articular da região fêmuro-tibial com o uso de um paquímetro. Para coletar essas medidas, os animais foram cuidadosamente imobilizados com uma flanela em posição de decúbito dorsal, com a perna direita exposta e não flexionada. Foram realizadas 3 medidas com o paquímetro e a maior medida foi registrada. A medida basal do diâmetro foi realizada imediatamente antes da injeção i.a. de LPS e medidas subsequentes ao LPS foram realizadas a cada 1 hora por um período total de 5 horas, imediatamente antes do registro do TEP.

3.9 COLETA DE FLUIDO SINOVIAL E CONTAGEM TOTAL (CT) DE LEUCÓCITOS

Ao final do último registro dos parâmetros do TEP e DA, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico com isoflurano inalável, seguido de deslocamento cervical.

A cavidade sinovial da articulação que recebeu o estímulo do LPS foi rompida e lavada com 100 µl de solução de EDTA e o líquido sinovial foi coletado com o uso de uma pipeta e armazenado na geladeira. No dia seguinte, 20 µl do lado sinovial foi diluído em líquido de Turk e uma parte dessa solução foi colocada em um dos lados da câmara de Neubauer (células/mm³) para a realização da contagem total do número de leucócitos utilizando um microscópio.

3.10 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O esquema a seguir representa o protocolo experimental adotado neste trabalho:

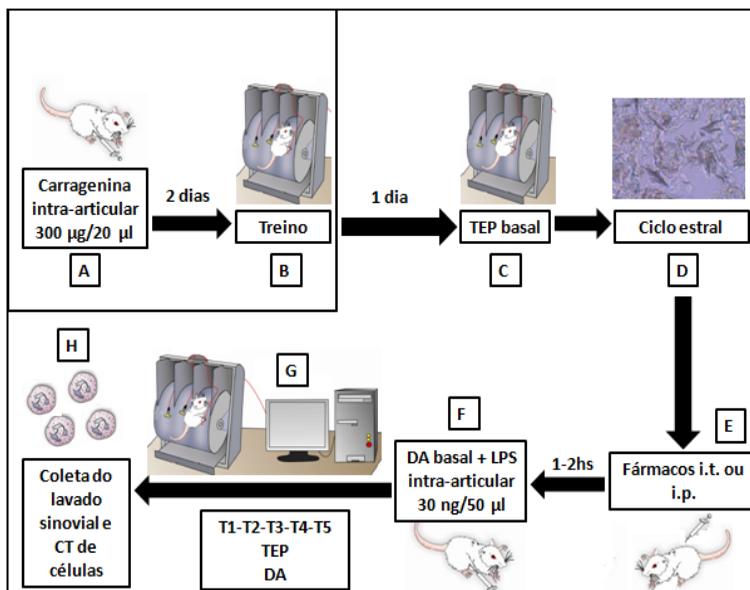


Figura 2: Protocolo experimental. Ratas *naive* receberam inicialmente uma injeção i.a. de carragenina (300 µg/20 µl) três dias antes do dia do teste (A). Um dia antes do experimento, as ratas passaram por um treino para a adaptação ao movimento do cilindro e às sapatilhas metálicas (B). Os primeiros passos no dia do experimento foram: coleta dos TEPs basais, avaliação da fase do ciclo estrol e a randomização dos grupos experimentais (C) e (D). Em seguida os fármacos foram administrados por via i.t. ou i.p., (E) e esperou-se de uma a duas horas, dependendo do tempo de ação necessário para cada tratamento, e em seguida foi administrado o LPS na articulação do joelho direito (30 ng/ 50 µl) (F). Uma hora após o LPS, iniciaram-se a coleta das medidas do tempo de elevação da pata e do diâmetro articular (G). Após cinco horas de avaliação do TEP e do DA coletou-se o lavado sinovial e foi processada a contagem das células (H).

3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As curvas de incapacitação e diâmetro articular foram analisadas estatisticamente através do software *StatSoft Statistica 7*® e o teste escolhido foi ANOVA de duas vias, com a aplicação do post-hoc Newman-Keuls sempre que a diferença de $p < 0,05$ fosse detectada.

As análises estatísticas da contagem de leucócitos sinoviais foram realizadas através do software *GraphPad Prism 5*® e o teste escolhido foi a ANOVA de uma via com aplicação do post-hoc de Dunnett sempre que a diferença de $p < 0,05$ foi detectada.

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).

RESULTADOS

4.1 EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LPS NA INCAPACITAÇÃO E EDEMA ARTICULAR EM RATAS SENSIBILIZADAS COM CARRAGENINA.

O objetivo da primeira etapa deste estudo foi estabelecer a concentração de LPS que após ser injetada nas articulações de ratas previamente sensibilizadas com carragenina, ocasionasse uma potencialização dos parâmetros de incapacitação (avaliado através do TEP) e edema (avaliado através do DA) articulares e assim permitisse uma melhor observação da inibição desses parâmetros pelos tratamentos farmacológicos.

Após 72 horas da administração de carragenina (300 µg/ 20 µl; i.a.) na articulação do joelho direito das ratas, 1 ou 30 ng de LPS (50 µl; i.a.) ou somente o veículo utilizado para a sua diluição (solução fisiológica 0,9%; 50 µl; i.a.), também foram administrados no local. A escolha das doses de LPS foi baseada nos estudos de padronização do modelo em ratos, onde as concentrações de 1 e 30 ng/50 µl promoveram potencializações consideráveis dos parâmetros de TEP e DA observados (BREISSAN, 2005).

1 hora após o LPS e durante o tempo total de 5 horas consecutivas, o comportamento de incapacitação articular foi aferido através do TEP, em paralelo com a coleta das medidas do DA, sendo o edema articular representado no gráfico como a diferença do DA em relação à medida realizada anteriormente à administração de LPS ou do veículo (medida basal) (Figura 3B).

De acordo com os gráficos representados na Figura 3, podemos observar que o LPS promoveu uma intensa resposta dose-dependente no aumento do TEP (em segundos) e do DA (em centímetros), de forma contrária ao observado quando somente o seu veículo foi administrado. O efeito do LPS foi mantido durante o tempo total de 5 horas de observação e a dose de 30 ng/50 µl de LPS foi escolhida para o seguimento dos experimentos, pois promoveu uma potencialização máxima dos parâmetros TEP e DA, em relação ao grupo controle que recebeu somente o veículo do LPS.

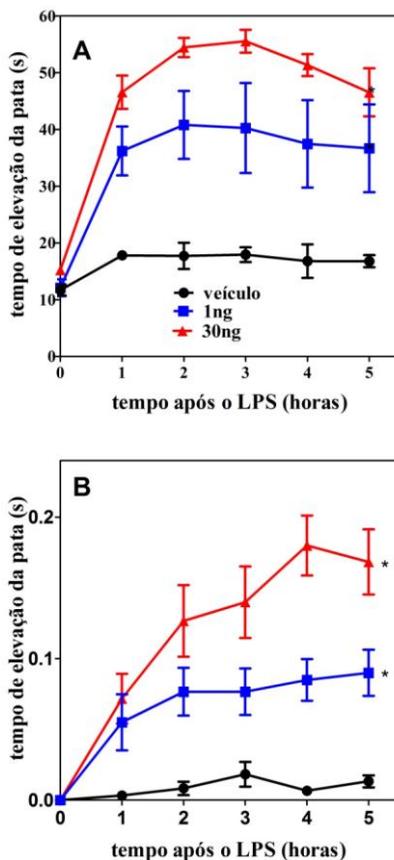


Figura 3: Curva dose-resposta dos efeitos do LPS no TEP (s) e no DA (cm) em ratas sensibilizadas com carragenina. O LPS (1 ou 30 ng/50 μ l; i.a.) foi administrado 72 horas após a administração de carragenina (300 μ g/20 μ l; i.a.). O grupo controle recebeu o veículo utilizado para a diluição do LPS (solução fisiológica 0,9%; 50 μ l; i.a.). O tempo zero (0 h) representa a medida basal do TEP e o DA está representado como a diferença entre a medida basal coletada antes do LPS e as medidas coletadas em cada hora após o LPS. Para as análises estatísticas do TEP (A) e do DA (B) foi utilizado ANOVA de duas vias seguida do post-hoc de Neuman-Keuls. Os dados representam média \pm E.P.M. (n=6).

4.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO POR VIA INTRATECAL DE BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE TERIFLUNOMIDA NA INCAPACITAÇÃO, DIÂMETRO ARTICULAR E MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS.

TFM (0,001; 0,01 ou 0,1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) ou o veículo utilizado para a sua diluição (solução de PBS 10% DMSO; 10 μl) foram administrados por via intratecal 2 horas antes da injeção de LPS (30 ng/50 μl ; i.a.) na articulação do joelho direito previamente sensibilizada com carragenina (300 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$; i.a.). 1 hora após a administração do LPS e a cada hora por um período de 5 horas consecutivas, as medidas dos parâmetros TEP e DA foram coletadas.

Todas as doses de TFM promoveram significativa inibição da incapacitação (Figura 4A) e do aumento do DA (Figura 4B) induzidos pelo LPS. Em relação à CT de leucócitos, podemos observar uma tendência na inibição da migração leucocitária promovida pelo LPS após a administração da menor dose (0,001 μg), mas apenas a maior dose (0,1 μg) apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle que recebeu apenas o veículo da TFM (Figura 4C), sendo então 0,1 μg a menor dose escolhida para as posteriores investigações do mecanismo inibitório da TFM intratecal.

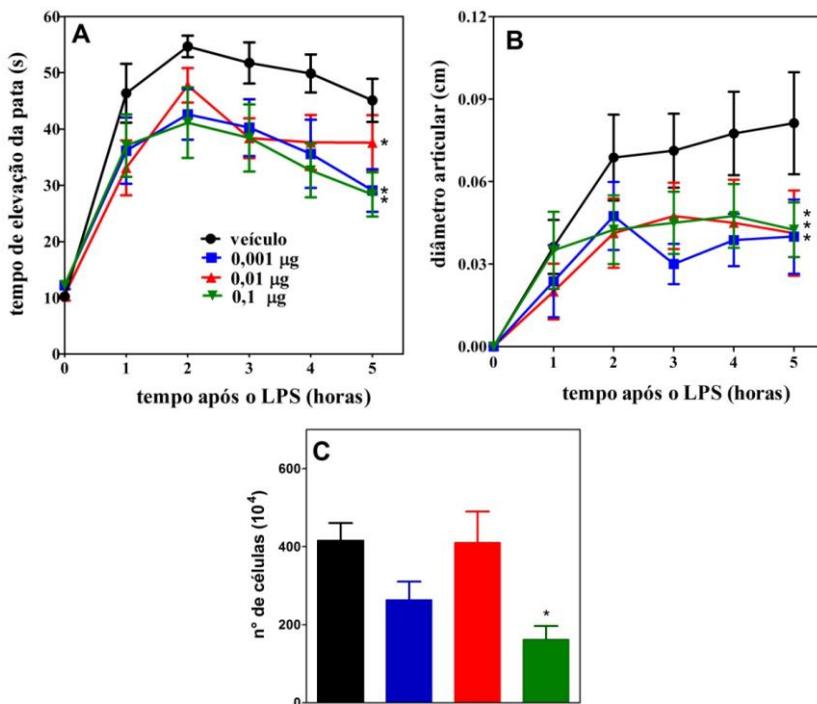


Figura 4: Efeitos da administração por via intratecal de baixas concentrações de teriflunomida na incapacitação (A), diâmetro articular (B) e migração de leucócitos (C). TFM (0,001; 0,01 ou 0,1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$; i.t.) foi administrada 2 horas antes do LPS (30 ng/ 50 μl ; i.a.) em articulações sensibilizadas com carragenina (300 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$). O grupo controle recebeu solução de PBS 10% DMSO (10 μl ; i.t.). A CT de leucócitos foi realizada 5 horas após a injeção de LPS. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. (n=8). * representa a diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. (A, B: ANOVA de duas vias seguida do post-hoc de Neuman-Keuls; C: ANOVA de uma via seguida do post-hoc de Dunnet).

4.3 A COADMINISTRAÇÃO POR VIA INTRATECAL COM URIDINA REVERTE APENAS OS EFEITOS INIBITÓRIOS PRODUZIDOS PELA MENOR DOSE DE TERIFLUNOMIDA.

TFM (0,1 ou 20 µg/ 10 µl), uridina (10 µg/ 10µl), solução de TFM e uridina (0,1 ou 20 µg de TFM + 10 µg de uridina/ 10 µl), ou o veículo utilizado para a diluição de ambas (solução de PBS 10% DMSO / 10µl), foram administrados por via intratecal 2 horas antes da injeção de LPS (30 ng/50 µl; i.a.) em ratas sensibilizadas com carragenina (300 µg/ 20 µl; i.a.).

A administração de 0,1 µg de TFM, assim como no resultado anterior, inibiu de forma estatisticamente significativa o TEP, DA e a CT de leucócitos, e a sua coadministração com uridina reverteu seus efeitos inibitórios em todos os parâmetros avaliados (Figura 5 A, B e C).

A maior dose de TFM (20 µg) apresentou os mesmos efeitos antinociceptivos e antiedematogênicos da menor dose 0,1 µg, mas esses efeitos não foram alterados quando coadministrado com uridina (Figura 5 A, B e C).

O tratameto somente com uridina (10 µg) não alterou a incapacitação, o aumento do DA ou a migração de leucócitos, em comparação com o grupo controle tratado com o veículo (Figura 5 A, B e C).

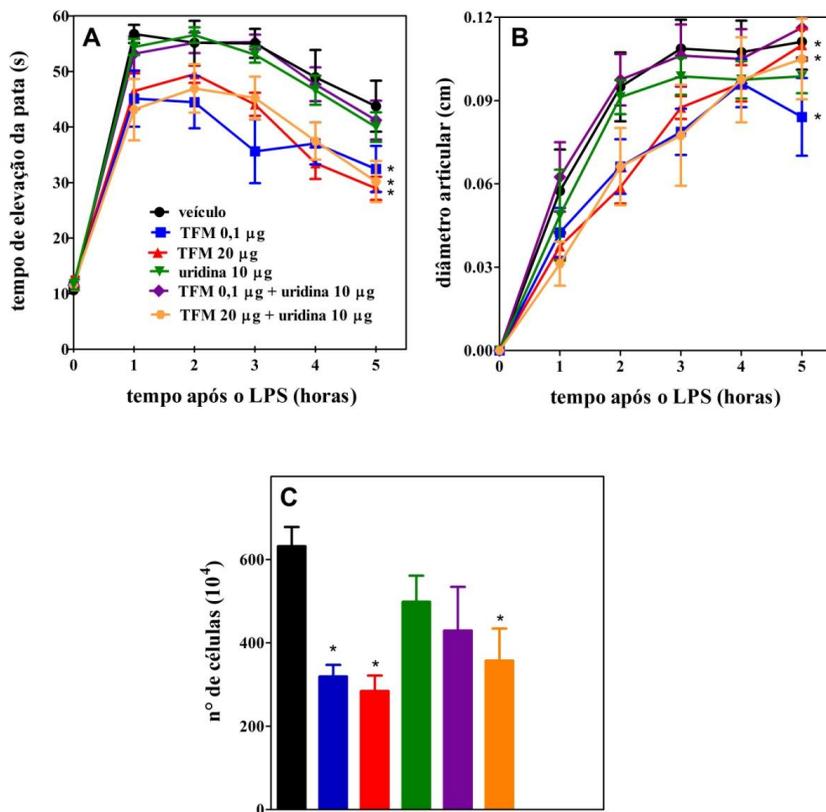


Figura 5: Efeitos da coadministração por via intratecal de teriflunomida e uridina na incapacitação (A), diâmetro articular (B) e migração de leucócitos (C). TFM (0,1 µg ou 20 µg/ 10 µl; i.t.), uridina (10 µg/ 10 µl; i.t.) e TFM (0,1 ou 20 µg) + uridina (10 µg) (10 µl; i.t.), foram administradas 2 horas antes do LPS (30 ng/ 50 µl; i.a.) em ratas sensibilizadas com carragenina (300 µg/ 20 µl; i.a.). O grupo controle recebeu solução de PBS 10% DMSO (10 µl; i.t.). A CT de leucócitos foi realizada 5 horas após a injeção de LPS. Cada ponto representa a média ± E.P.M. (n=8). * representa a diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. (A, B: ANOVA de duas vias seguida do post-hoc de Neuman-Keuls; C: ANOVA de uma via seguida do post-hoc de Dunnet).

4.4 TERIFLUNOMIDA ADMINISTRADA POR VIA INTRATECAL NÃO INIBE INCAPACITAÇÃO, DIÂMETRO ARTICULAR E MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS, EM ANIMAIS TRATADOS COM BUMETANIDA.

TFM (0,1 µg/ 10 µl) ou o seu veículo (solução de PBS 10% DMSO; 10µl), foram administrados por via intratecal 2 horas antes da injeção i.a. de LPS (30ng/ 50 µl) em ratas senssibilizadas com carragenina (300 µg/ 20 µl; i.a.). Após 1 hora e 40 minutos da administração de TFM, bumetanida (60 µg/ 10 µl) ou o seu veículo (solução de bicarbonato de sódio 1,29%; 10µl) também foram administrados por via intratecal e, portanto, 20 minutos antes do LPS.

TFM (0,1 µg) reproduziu os mesmos efeitos inibitórios no TEP, DA e CT de leucócitos observados nos experimentos anteriores (Figura 6 A, B e C).

A administração de bumetanida (60 µg) inibiu significativamente o TEP e o DA (Figura 6 A e B) e a sua coadministração com a TFM (0,1 µg) não produziu efeitos inibitórios adicionais aos efeitos inibitórios do imunossupressor na incapacitação, edema e migração celular (Figura 6 A, B e C).

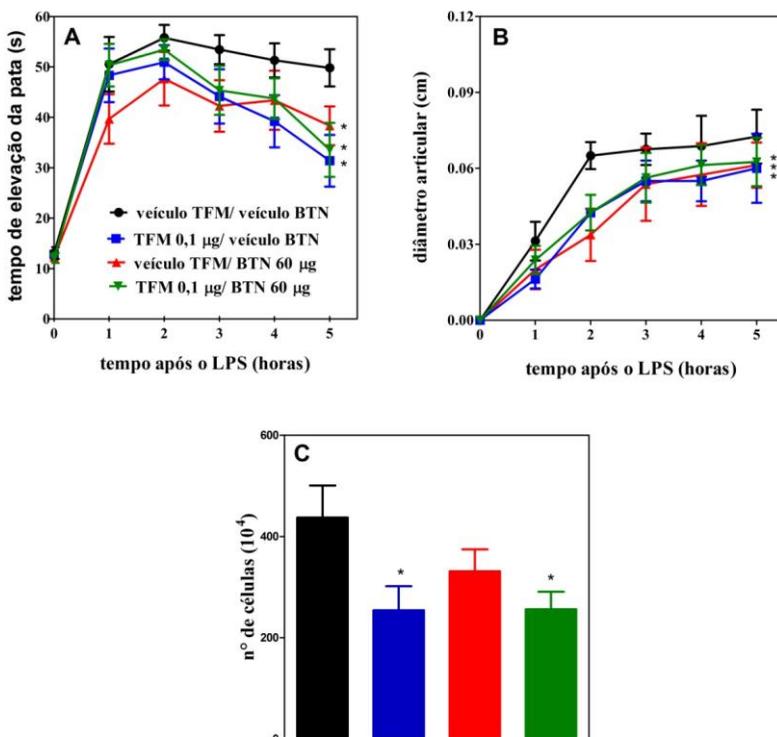


Figura 6: Efeitos da coadministração por via intratecal de teriflunomida e bumetanida na incapacitação (A), diâmetro articular (B) e migração de leucócitos (C). TFM (0,1 µg / 10 µl; i.t.) foi administrada 1 hora e 40 minutos antes da administração de BTN (60 µg/ 10 µl; i.t.) que foi administrada 20 minutos antes do LPS (30 ng/50 µl; i.a.), em ratas sensibilizadas com carragenina (300 µg/ 20 µl; i.a.). O grupo controle recebeu solução de bicarbonato de sódio 1,29% (10 µl; i.t.) e PBS 10% DMSO (10 µl; i.t.). A CT de leucócitos foi realizada 5 horas após a injeção de LPS. Cada ponto representa a média ± E.P.M. (n=8). * representa a diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. (A, B: ANOVA de duas vias seguida do post-hoc de Neuman-Keuls; C: ANOVA de uma via seguida do post-hoc de Dunnet).

4.5 A ADMINISTRAÇÃO DE METOTREXATO POR VIA INTRAPERITONEAL INIBE INCAPACITAÇÃO E DIÂMETRO ARTICULAR.

MTX (1 ou 5 mg/kg) ou o veículo utilizado para a sua diluição (solução de PBS 10 % DMSO) foram administrados por via intraperitoneal, 1 hora antes da injeção i.a. de LPS (30ng/50 µl) em ratas sensibilizadas com carragenina (300 µg/ 20 µl).

Ambas as doses promoveram significativa inibição dos parâmetros de TEP e DA, em relação ao grupo controle tratado apenas com o veículo (Figura 7 A e B), mas nenhuma alterou significativamente a CT de leucócitos no fluido sinovial (Figura 7 C).

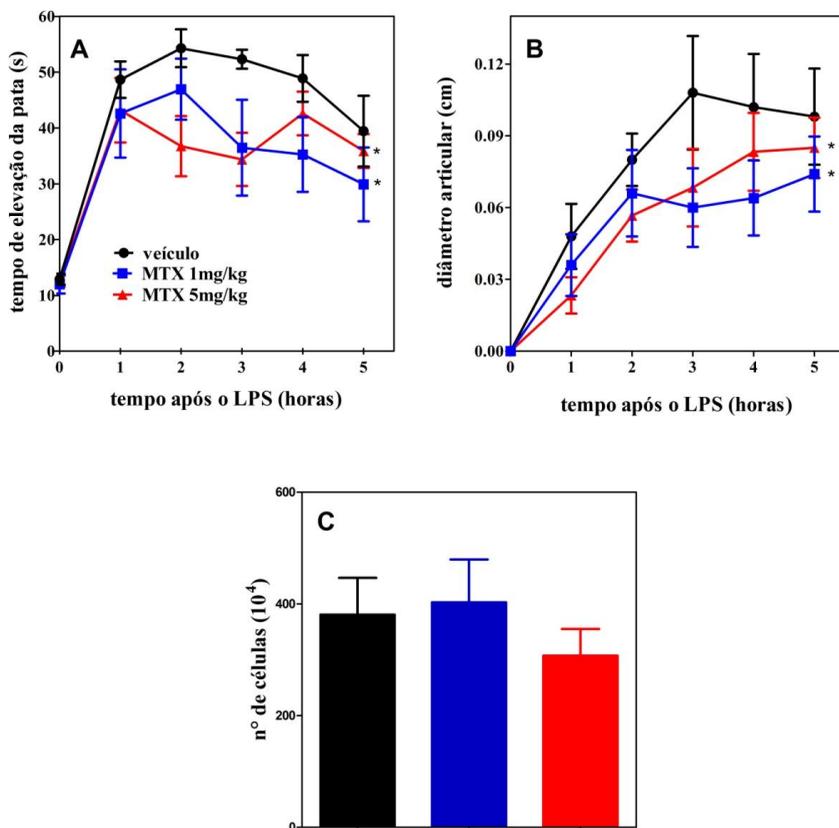


Figura 7: Efeitos da administração por via intraperitoneal de metotrexato na incapacitação (A), diâmetro articular (B) e migração de leucócitos (C). MTX (1 ou 5 mg/kg; i.p.) foi administrado 1 hora antes do LPS (30 ng/ 50 μ l; i.a.) em ratos sensibilizados com carragenina (300 μ g/ 20 μ l; i.a.). O grupo controle recebeu solução de PBS 10% DMSO (i.p.). A CT de leucócitos foi realizada 5 horas após a injeção de LPS. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. (n=6). * representa a diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. (A, B: ANOVA de duas vias seguida do post-hoc de Neuman-Keuls; C: ANOVA de uma via seguida do post-hoc de Dunnet).

4.6 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO POR VIA INTRATECAL DE METOTREXATO E MINOCICLINA, E DE COADMINISTRAÇÕES DE TERIFLUNOMIDA COM METOTREXATO OU MINOCICLINA NA INCAPACITAÇÃO, DIÂMETRO ARTICULAR E MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS.

TFM (0,1 µg/ 10 µl), MTX (25 µg/ 10 µl), minociclina (50 µg/ 10 µl), TFM (0,1µg) + MTX (25 µg) (em 10 µl), TFM (0,1 µg) + minociclina (50 µg) (em 10 µl) ou o veículo utilizado para a diluição das drogas (solução de PBS 10% DMSO / 10µl), foram administrados por via intratecal 2 horas antes da injeção i.a. de LPS (30ng/ 50 µl) em ratas sensibilizadas com carragenina (300 µg/ 20 µl; i.a.).

TFM (0,1 µg) intratecal inibiu de forma estatisticamente significativa o TEP (Figura 8A), DA (Figura 8B) e a CT de leucócitos (Figura 8C), da mesma forma como já mostrado nos resultados anteriores. MTX (25 µg) e minociclina (50 µg), assim como a TFM, também inibiram significativamente todos os parâmetros avaliados quando comparados com o grupo controle tratado apenas com veículo (Figura 8 A, B e C).

A coadministração por via intratecal de TFM (0,1 µg) com MTX (25 µg) ou minociclina (50 µg) proporcionou um efeito inibitório somatório aos efeitos da TF, quando administrados de forma individual, em todos os parâmetros avaliados (TEP, DA e CT de leucócitos) (Figura 8 A, B e C).

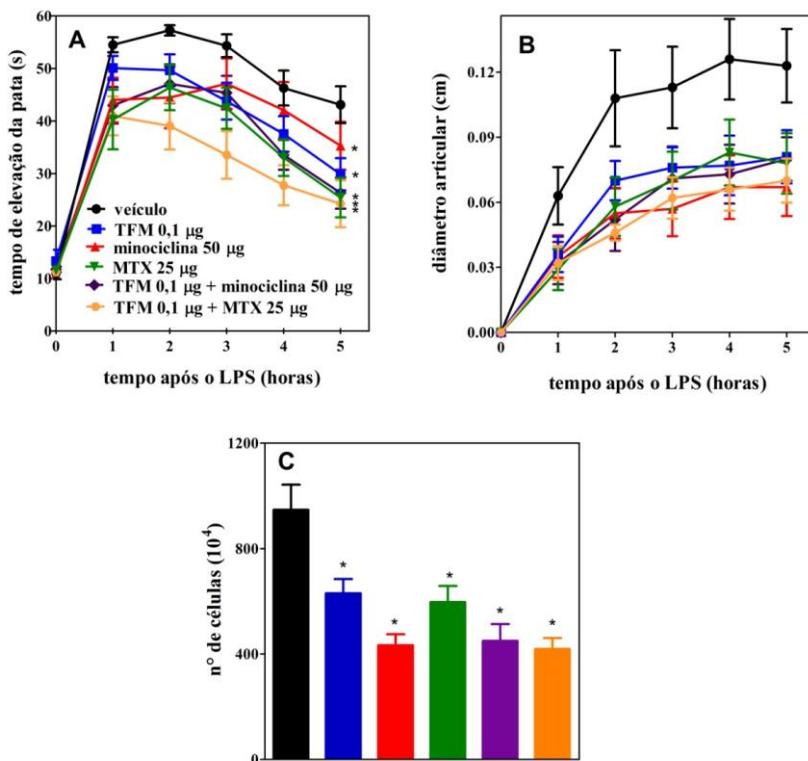


Figura 8: Efeito da administração por via intratecal de metotrexato e minociclina, e de coadministrações de teriflunomida com metotrexato ou minociclina na incapacitação (A), diâmetro articular (B) e migração de leucócitos (C). TFM (0,1 µg / 10 µl; i.t.), minociclina (50 µg / 10 µl; i.t.), MTX (25 µg / 10 µl; i.t.), TFM (0,1 µg) + minociclina (50 µg) (10 µl; i.t.) e TFM (0,1 µg) + MTX (25 µg) (10 µl; i.t.) foram administrados 2 horas antes do LPS (30 ng/50 µl; i.a.) em ratas sensibilizadas com carragenina (300 µg / 20 µl). O grupo controle recebeu solução de PBS 10% DMSO (10 µl; i.t.). A CT de leucócitos foi realizada 5 horas após a injeção de LPS. Cada ponto representa a média ± E.P.M. (n=10). * representa a diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. (A, B: ANOVA de duas vias seguida do post-hoc de Neuman-Keuls; C: ANOVA de uma via seguida do post-hoc de Dunnett).

4.7 O TRATAMENTO SISTÊMICO COM AS DOSES DE TERIFLUNOMIDA E DE METOTREXATO QUE FORAM EFETIVAS QUANDO ADMINISTRADAS POR VIA INTRATECAL NÃO É CAPAZ DE INIBIR A INCAPACITAÇÃO, DIÂMETRO ARTICULAR E MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS.

TFM (0,1 ou 20 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), MTX (25 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) ou o veículo utilizado para a diluição das drogas (solução de PBS 10 % DMSO; 20 μl) foram administrados por via intraperitoneal 2 horas antes da injeção i.a. de LPS (30ng/50 μl) em ratas sensibilizadas com carragenina (300 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$; i.a.).

As mesmas doses de TFM e MTX que inibiram TEP, DA e CT nos tratamentos por via intratecal, ao serem administrados por via intraperitoneal, não inibem significativamente os parâmetros de TEP, DA e CT de leucócitos (Figura 9 A, B e C).

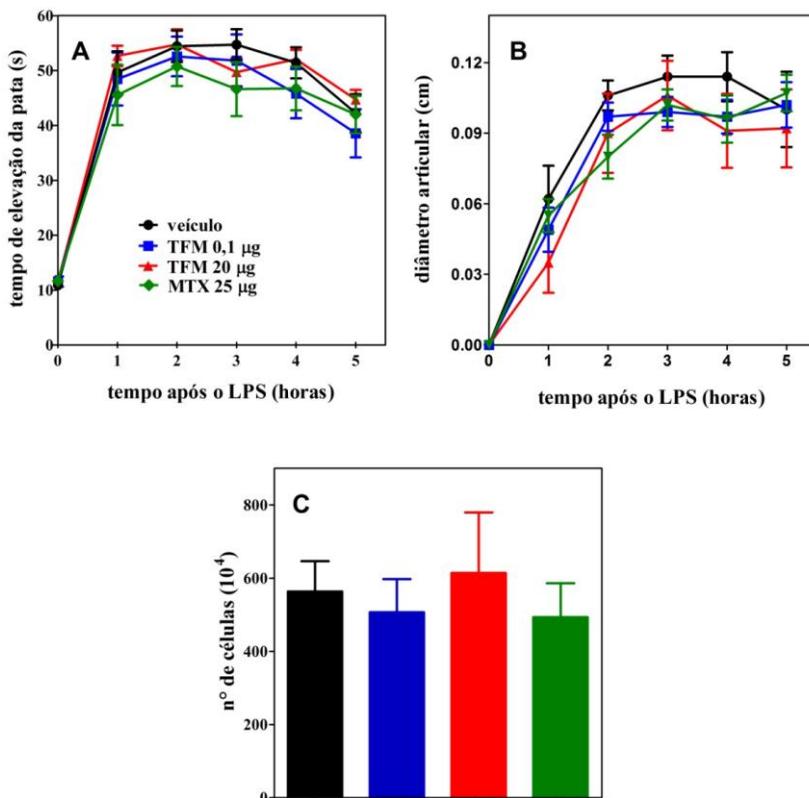


Figura 9: Efeitos da administração por via intraperitoneal das doses efetivas de teriflunomida e metotrexato no tratamento por via intratecal, na incapacitação (A), diâmetro articular (B) e migração de leucócitos (C). TFM (0,1 ou 20 µg/ 20 µl; i.p.) e MTX (25 µg/ 20 µl; i.p.) foram administrados 2 horas antes do LPS (30 ng/ 50 µl; i.a.) em ratas sensibilizadas com carragenina (300 µg/20 µl). O grupo controle recebeu solução de PBS 10% DMSO (20 µl; i.p.). A CT de leucócitos foi realizada 5 horas após a injeção de LPS. Cada ponto representa a média± E.P.M. (n=10).

DISCUSSÃO

A literatura relata uma importante participação da medula espinhal no caráter inflamatório periférico observado em modelos animais de AR, devido à descarga de neuropeptídeos pró-inflamatórios das terminações nervosas periféricas articulares através do RRD. Além disso, o desenvolvimento e a manutenção da sensibilidade dolorosa observada nesses modelos estão relacionados com o processo de sensibilização central dos terminais neuronais medulares envolvidos na transmissão nociceptiva (BIRKLEIN; SCHMELZ, 2008; CRUWYS, 1995; SLUKA; WILLIS; WESTLUND, 1995).

Investigações recentes sugerem que os processos neuronais de RRD e a sensibilização central podem ser modulados pela ativação de células gliais presentes no corno dorsal medular (JHA; JEON; SUK, 2012). Diante desta hipótese, surgiu uma nova perspectiva para o tratamento das doenças inflamatórias crônicas, através da modulação farmacológica da atividade dessas células, reduzindo a síntese de citocinas que são responsáveis por sensibilizar os neurônios e fortalecer a transmissão do estímulo nociceptivo e a ocorrência do RRD (BRESSAN; PERES; TONUSSI, 2012).

Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que a administração por via intratecal de talidomida inibiu a incapacitação, edema e a migração leucocitária em articulações estimuladas pelo LPS (BRESSAN; MITKOVSKI; TONUSSI, 2010). Atribui-se à talidomida um efeito supressor sobre a síntese de TNF- α , o que provavelmente preveniu a sensibilização dos terminais neuronais, resultando na redução das respostas edematogênicas e nociceptivas do estímulo do LPS. A estes achados, soma-se a inibição da imunorreatividade aos marcadores de atividade glial GFAP e OX-42 em amostras da medula dos animais (BRESSAN; MITKOVSKI; TONUSSI, 2010).

No presente estudo, mostramos o efeito inibitório da administração por via intratecal dos imunossupressores TFM e MTX, sobre os parâmetros da inflamação articular. O intervalo de 2 horas entre os tratamentos intratecais e o estímulo inflamatório articular foi estabelecido após a execução de experimentos pilotos. Tal fato *in vivo* corresponde aos achados de estudos *in vitro*, onde a inibição significativa da proliferação celular e da produção de citocinas foi observada 2 horas após a incubação das células com a droga (MANNA; AGGARWAL, 1999).

Inicialmente investigamos os efeitos inibitórios de baixas concentrações de TFM, sendo a dose de 0,1 µg/ 10 µl efetiva na redução de todos os parâmetros inflamatórios periféricos observados (TEP, DA e CT de leucócitos). As baixas doses de TFM administradas foram escolhidas a partir da dose 0,001 µg/ 10 µl, pois esta concentração de TFM dentro do canal medular, que contém um volume de líquido de aproximadamente 200 µl, corresponde à concentração mínima necessária da droga para a observação *in vitro* do seu efeito citostático, através da inibição da enzima DHODH (~15 nM ou 0.02 µM) (HERRMANN et al., 2000).

O mecanismo sugerido para os efeitos inibitórios observados após a administração por via intratecal de TFM (0,1 µg), seria a ação citostática da droga na microglia e nos astrócitos através do mecanismo de ação primário de inibição da DHODH, a enzima-chave da síntese *de novo* de nucleotídeos pirimidínicos necessários para a síntese de DNA e RNA e a rápida proliferação dessas células após a sua ativação (BREEDVELD; DAYER, 2000). A redução da proliferação dessas células, provavelmente levou à diminuição da quantidade de citocinas, como o TNF- α no corno dorsal medular, reduzindo a sensibilização neuronal envolvida nos processos de RRD e transmissão sináptica do estímulo doloroso.

Estudos *in vitro* demonstram que a suplementação exógena com uridina reverte o efeito antiproliferativo da TFM sobre células imunes estimuladas (BREEDVELD; DAYER, 2000). No presente trabalho, demonstramos *in vivo* que ao coadministrarmos por via intratecal TFM (0,1 µg) com uridina (10 µg), o imunossupressor não promoveu os efeitos inibitórios nos parâmetros inflamatórios periféricos (TEP, DA e CT de leucócitos). Essa observação fortalece a nossa hipótese de que o mecanismo citostático sobre a proliferação das células gliais foi responsável pela ação inibitória da droga nesta concentração.

Por outro lado, em concentrações mais elevadas, a TFM possui um efeito modulador sobre as células imunes, alterando a síntese de citocinas pró-inflamatórias devido à ação inibitória na fosforilação de PTKs relacionadas com a transcrição dessas citocinas (XU et al., 1996). Tentamos explorar esse possível efeito imunomodulador com a administração por via intratecal de TFM na concentração de 20 µg/10 µl, que dentro do canal medular com volume de líquido de aproximadamente 200 µl, corresponde aproximadamente a uma concentração dentro da faixa relacionada com a inibição de PTKs,

conforme relatado nos estudos *in vitro* (~ 50-200 μM) (HERRMANN et al., 2000).

TFM (20 μg) promoveu a inibição de todos os parâmetros avaliados (TEP, DA e CT de leucócitos) e esse efeito não foi alterado quando coadministramos uridina (10 μg), sugerindo que o mecanismo de ação da TFM nessa concentração é independente da inibição da enzima DHODH. Com esses achados, acreditamos que o mecanismo do efeito da TFM nesta concentração seja através da inibição das PTKs e consequentemente da redução na síntese de citocinas, visto que mesmo reconstituindo a função proliferativa através da adição de uridina, uma possível modulação na produção de citocinas e na migração das células gliais possa ter ocorrido devido ao mecanismo de inibição de PTKs (CLAUSSEN; KORN, 2012).

De acordo com nossos resultados, sugerimos que a TFM ao reduzir a quantidade de citocinas, seja por mecanismo citostático ou pela inibição das PTKs, o efeito resultante é a inibição da sensibilização das terminações de neurônios secundários da transmissão do estímulo nociceptivo ocasionando a redução do TEP, e dos terminais pré-sinápticos dos aferentes primários ocasionando o enfraquecimento do RRD e redução do DA.

No entanto, em relação ao mecanismo da TFM de inibição da proliferação, o efeito imunomodulatório através da inibição das PTKs parece ser mais vantajoso, principalmente pelo fato das células gliais apresentarem um mecanismo modulador de aumento da síntese de citocinas, quando um mecanismo exógeno farmacológico perturba a homeostase do sistema. Tal fato é sugerido em estudos que mostram o aumento da produção de citocinas pelas células gliais durante o tratamento crônico com a morfina, o que pode sensibilizar os neurônios e interferir na ação da droga, aumentando sua tolerância (SONG; ZHAO, 2001).

Esse comportamento das células gliais reflete a sua função homeostática, pois provavelmente seria uma tentativa de restabelecer a responsividade dos neurônios nociceptivos secundários que deveriam ser ativados pelos neurotransmissores presentes na fenda sináptica para a propagação normal do estímulo doloroso periférico (SONG; ZHAO, 2001).

Em um modelo de neuropatia, a administração por via intratecal de doses de TFM entre 0,001 e 10 $\mu\text{g}/40 \mu\text{l}$, reduziu a hiperalgesia mecânica provavelmente através da inibição da atividade glial,

demonstrada pela redução na imunorreatividade aos marcadores OX-42 e GFAP (SWEITZER; DELEO, 2002). Esse resultado reforça a nossa hipótese de que o efeito da TFM intratecal na redução dos parâmetros inflamatórios articulares induzidos pelo LPS seja através da inibição da atividade glial.

A inibição da incapacitação e do edema articular promovida pela administração por via intratecal de bumetanida (60 µg), um bloqueador do cotransportador NKCC1, sugere a participação ativa do fenômeno de RRD nos efeitos edematogênicos e nociceptivos produzidos pelo LPS neste estudo, visto que a administração desta concentração da droga está relacionada com a inibição do RRD e a inflamação neurogênica, em modelos que induzem hiperalgesia mecânica e secundária através da capsaicina (VALENCIA- DE ITA et al., 2006).

A coadministração de TFM (0,1 µg) com bumetanida (60 µg) não produziu efeitos inibitórios adicionais ao imunossupressor no TEP, DA e migração leucocitária. Esse dado reforça a nossa hipótese de que o efeito antiedematogênico da TFM é devido ao enfraquecimento do RRD e este mecanismo provavelmente está relacionado com a inibição da atividade glial e a da síntese de citocinas que promovem aumento da expressão de receptores de glutamato no terminal pré-sináptico e intensificam o PAD e a manutenção do RRD. Consequentemente, pode-se sugerir que a diminuição da liberação de neuropeptídeos no foco inflamatório periférico devido à inibição do RRD ocasionado pela TFM, impediu o aumento do DA e a migração leucocitária.

A minociclina é um antimicrobiano derivado das tetraciclinas conhecido por inibir seletivamente a ativação microglial, provavelmente por inibir a migração dessas células até substâncias quimiotáticas e ativadoras liberadas pelos neurônios como a fractalcina, e também através de um mecanismo sugerido de inibição do fator inicial ativador de células imunes NFAT (GARRIDO-MESA; ZARZUELO; GÁLVEZ, 2013; SZETO et al., 2011). Em nosso estudo, a administração por via intratecal de minociclina (50 µg) inibiu significativamente todos os parâmetros inflamatórios observados no modelo de artrite induzida pelo LPS.

Esse efeito medular da minociclina (50 µg) na inflamação articular induzida pelo LPS foi investigado anteriormente por outro estudo realizado em nosso laboratório, onde o tempo entre a administração da droga e a injeção de LPS foi de apenas 20 minutos e

esse tratamento também ocasionou redução da imunorreatividade ao marcador de ativação microglial OX-42 nas amostras medulares dos animais (BRESSAN; PERES; TONUSSI, 2012). Devido à seletividade da droga para as células microgлияis, esse dado suporta o envolvimento da ativação dessas células nos parâmetros inflamatórios articulares induzidos pelo LPS.

Nossos resultados também mostraram que a minociclina (50 µg) promoveu um efeito inibitório adicional ao realizado pela TFM (0,1 µg) na incapacitação e edema articular, quando coadministrados por via intratecal. Este efeito não era predizível inicialmente, pois de acordo com os mecanismos sugeridos, a ação da minociclina está relacionada com a inibição das primeiras fases da ativação microglial, impedindo o seguimento do ciclo celular para a fase de proliferação e, dessa forma, o efeito antiproliferativo da TFM nessa baixa concentração não seria necessário para o mesmo efeito final de inibição dessas células (NUTILE-MCMENEMY; ELFENBEIN; DELEO, 2007; XU et al., 1996). Não temos explicação para esse efeito somatório, porém sabe-se que a minociclina pode atuar nesse mesmo modelo quando aplicada em apenas 20 minutos antes no estímulo de LPS (BRESSAN; PERES; TONUSSI, 2012). Desta forma, o tempo mais longo utilizado no presente estudo (2 horas) pode de alguma forma ser responsável por levar à maior inibição glial.

Em um estudo realizado em nosso laboratório, a administração por via oral de 80 mg/kg de LFM, reduziu o TEP, DA e migração leucocitária no mesmo modelo de artrite induzida por carragenina/LPS em ratos (BRESSAN, 2005). Nesse estudo, aproximadamente 25 mg de LFM são necessários para a observação do efeito da droga através do tratamento por via oral, enquanto no tratamento intratecal realizado em nosso estudo, doses aproximadamente 25.000 vezes menor promoveram o mesmo efeito inibitório na inflamação periférica.

Ainda não existem dados sobre a permeabilidade da TFM na barreira hematoencefálica, mas se existir a possibilidade da droga alcançar a medula espinhal durante o tratamento sistêmico, além do efeito local nas células imunes da articulação, seu sucesso no controle da dor inflamatória também poderia estar relacionado com a inibição das células gliais (WATKINS; MAIER, 2003).

Ao contrário da TFM, o MTX é bem caracterizado por atravessar livremente a barreira hematoencefálica e o seu efeito terapêutico no controle da dor, através de sua administração sistêmica

no tratamento da AR, provavelmente está relacionado com algum efeito da droga sobre as células gliais após a difusão para a medula espinhal (WATKINS; MAIER, 2003).

Devido a sua alta permeabilidade no SNC, vários estudos clínicos relatam a neurotoxicidade como um dos principais efeitos colaterais no uso sistêmico do MTX para o tratamento do câncer (UZAR et al., 2006). Os principais alvos da neurotoxicidade do MTX são os astrócitos e uma alta dose de MTX poderia ativá-los, induzindo sua proliferação e apoptose (WATKINS; MAIER, 2003). A dose de MTX de 25 µg (~0.1 mg/kg) escolhida para o tratamento intratecal neste trabalho, não promove neurotoxicidade (SCHOLZ et al., 2008), assim como as doses de 1 e 5 mg/kg escolhidas para o tratamento sistêmico (UZAR et al., 2006).

O MTX (25 µg) administrado por via intratecal inibiu todos os parâmetros avaliados (TEP, DA e CT de leucócitos) e esse efeito provavelmente está relacionado com o mecanismo citostático de inibição da síntese *de novo* de purinas e timina que são necessárias para a síntese de DNA e RNA durante a alta taxa de proliferação das células gliais (CRONSTEIN, 1996).

A administração por via intratecal de MTX na dose 0.1 mg/kg, de acordo com um estudo de neuropatia periférica induzida por lesão de nervo, atenua a hiperalgesia mecânica provavelmente por inibir a proliferação microglial (observada no estudo pela diminuição da reatividade ao marcador microglial Iba-1) (SCHOLZ et al., 2008). Esses dados fortalecem a nossa hipótese de que os efeitos inibitórios periféricos alcançados pelo tratamento intratecal com MTX também estão relacionados com a inibição da atividade glial.

Outro mecanismo de ação do MTX que pode estar relacionado com o efeito da droga na medula espinhal, observado em nosso trabalho é o aumento extracelular de adenosina que poderia atuar na microglia e inibir a síntese de citocinas, como o TNF- α e o óxido nítrico (UZAR et al., 2006). Vários estudos mostram o efeito antinociceptivo da adenosina administrada por via intratecal em modelos de dor aguda e crônica (HASHIZUME et al., 2000). Então acreditamos que o mecanismo imunomodulador da redução da síntese de citocinas e o citostático estão atuando em paralelo na inibição da atividade glial, no entanto, uma melhor investigação desse provável mecanismo através da administração por via intratecal de antagonistas dos receptores adenosinérgicos, como a cafeína poderiam ser feitos para um melhor

esclarecimento do papel da adenosina nos efeitos medulares do MTX na atividade glial e inibição da inflamação periférica induzida nesse modelo.

Em nosso estudo, nenhuma das doses de MTX administrada por via intraperitoneal reduziu a migração celular para o tecido sinovial, dentro do tempo de ação da droga de 1 hora antes do LPS. O efeito inibitório do MTX na migração leucocitária articular só foi alcançado com o tratamento intratecal, provavelmente pelo mecanismo de inibição da atividade glial e de citocinas no ambiente medular, que inibe o RRD e a liberação da quimiocina SP no tecido sinovial que está relacionada com a exacerbação da migração leucocitária para o local da lesão (BRESSAN; MITKOVSKI; TONUSSI, 2010). Sugerimos também que os efeitos inibitórios no TEP e DA ocasionado pelo tratamento sistêmico de MTX, possa ser em parte, devido à ação da droga nas células gliais, pois a droga atravessa livremente a barreira hematoencefálica.

Foi demonstrado em nossos resultados que a coadministração por via intratecal de MTX (25 µg) e TFM (0,1 µg) inibiu todos os parâmetros inflamatórios articulares avaliados (TE, DA e CT de leucócitos) e essa coadministração promoveu uma somação dos mecanismos de cada droga para um efeito final inibitório mais potente quando comparado com o efeito das drogas separadas.

MTX e TFM inibem a disponibilidade de nucleotídeos por mecanismos diferentes, mas que levam ao mesmo efeito final: a inibição da progressão do ciclo celular e a proliferação (FAIRBANKS et al., 1999; XU et al., 1996). Seria esperado que a ação das duas drogas não apresentasse um efeito somatório na proliferação celular, pois somente o efeito de uma delas poderia promover a interrupção do ciclo celular devido à falta de nucleotídeos para a síntese de DNA e RNA. Então, é possível que o mecanismo imunomodulador do MTX através do aumento da adenosina e da inibição da liberação de citocinas pelas células microgлияis esteja envolvido na somação dos efeitos inibitórios do MTX e do TFM no TEP, DA e migração leucocitária.

O tratamento sistêmico com as doses 0,1 e 20 µg de TFM que foram efetivas no tratamento intratecal, não apresentaram efeito inibitório em nenhum dos parâmetros avaliados (TEP, DA e CT de leucócitos), sugerindo que o efeito do tratamento intratecal foi sítio-específico e que mesmo podendo ter ocorrido difusão, esta não promoveu concentração sistêmica suficiente para se observar efeitos periféricos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inibição farmacológica da atividade das células gliais parece ser um mecanismo vantajoso para o controle da dor e da inflamação crônica periférica em casos de neuropatia e artrite. O nosso estudo demonstrou em um modelo animal de artrite, que baixas concentrações de LFM e MTX aplicados diretamente na medula inibem a inflamação periférica e a nocicepção devido a um mecanismo restrito ao ambiente medular, provavelmente de inibição da atividade glial, o que futuramente pode ser avaliado através de técnicas imunohistoquímicas com marcadores da atividade dessas células.

A administração periódica, por via intratecal, de baixas concentrações de LFM e MTX pode representar uma nova abordagem para o tratamento da AR através da inibição das células gliais e esse tipo de tratamento reduziria os efeitos colaterais, visto que a ação da droga seria limitada às células imunes presentes na medula espinhal.

CONCLUSÕES

- O tratamento por via intratecal com baixas doses de TFM inibe a inflamação articular induzida por LPS e esse efeito é revertido pela uridina, sendo então provavelmente causado por ações citostáticas sobre as células gliais;
- O tratamento por via intratecal com uma alta dose de TFM inibe a inflamação articular induzida por LPS e esse efeito não é revertido pela uridina, provavelmente pela ocorrência de uma ação imunomodulatória sobre as células gliais;
- O tratamento sistêmico com MTX inibe a inflamação articular induzida por LPS, provavelmente por ações citostáticas e imunomodulatórias em células imunes presentes na articulação e em células gliais devido à facilidade da droga em atravessar a barreira hemato-encefálica;
- O tratamento medular com MTX inibe a inflamação articular induzida por LPS, provavelmente através de suas ações na medula espinal, as quais envolvem inibição da atividade glial;
- A coadministração medular de TFM com minociclina ou MTX apresentou um efeito somatório na redução da inflamação articular induzida por LPS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, N. J.; RÖNNBÄCK, L.; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 41–53, 2006.

ALAMANOS, Y.; DROSOS, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews**, v. 4, n. 3, p. 130–136, 2005.

AUSTIN, P. J.; MOALEM-TAYLOR, G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. **Journal of Neuroimmunology**, v. 229, n. 1-2, p. 26–50, 2010.

BARTLETT, R. R.; SCHLEYERBACH, R. Immunopharmacological profile of a novel isoxazol arthritis of the rat. **International Society for Immunopharmacology**, v. 7, n. 1, p. 7–18, 1985.

BIRKLEIN, F.; SCHMELZ, M. Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). **Neuroscience Letters**, v. 437, n. 3, p. 199–202, 2008.

BOETTGER, M. K. et al. Spinal tumor necrosis factor alpha neutralization reduces peripheral inflammation and hyperalgesia and suppresses autonomic responses in experimental arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 62, n. 5, p. 1308–1318, 2010.

BOYLE, D. L. et al. Regulation of peripheral inflammation by spinal p38 MAP kinase in rats. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 9, p. 1616–1624, 2006.

BREEDVELD, F. C.; DAYER, J. M. Leflunomide: mode of action in the treatment of rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 59, n. 11, p. 841–849, 2000.

BREEDVELD, F. C.; KALDEN, J. R. Appropriate and effective management of rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 63, n. 6, p. 627–633, 2004.

BRESSAN, E.; MITKOVSKI, M.; TONUSSI, C. R. LPS-induced knee-joint reactive arthritis and spinal cord glial activation were reduced after intrathecal thalidomide injection in rats. **Life Sciences**, v. 87, n. 15-16, p. 481–489, 2010.

BRESSAN, E.; PERES, K. C.; TONUSSI, C. R. Evidence that LPS-reactive arthritis in rats depends on the glial activity and the fractalkine-TNF- α signaling in the spinal cord. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 2, p. 947–958, 2012.

BUSCH-DIENSTFERTIG, M. et al. JAK-STAT1/3-induced expression of signal sequence-encoding proopiomelanocortin mRNA in lymphocytes reduces inflammatory pain in rats. **Molecular pain**, v. 8, n. 1, p. 83, 2012.

CHABNER, B. A. et al. Polyglutamation of methotrexate: Is Methotrexate a prodrug? **Journal of Clinical Investigation**, v. 76, n. 3, p. 907–912, 1985.

CHAN, E. S. L.; CRONSTEIN, B. N. Mechanisms of action of methotrexate. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**, v. 71, n.1, p. 5–8, 2013.

CHOY, E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Rheumatology.(Oxford)**, v. 51, n. 1, p. 3–11, 2012.

CLAUSSEN, M. C.; KORN, T. Immune mechanisms of new therapeutic strategies in MS - Teriflunomide. **Clinical Immunology**, v. 142, n. 1, p. 49–56, 2012.

COSTA, J. DE O. et al. Tratamento da artrite reumatoide no Sistema Único de Saúde , Brasil : gastos com infliximabe em comparação com medicamentos modificadores do curso da doença sintéticos , 2003 a

2006. **Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 30, n. 2, p. 283–295, 2014.

CRONSTEIN, B. N. Methotrexate and its Mechanism of Action. **Arthritis & Rheumatism**, v. 39, n. 12, p. 1951–1960, 1996.

CRONSTEIN, B. N.; NAIME, D.; OSTAD, E. The Antiinflammatory Mechanism of Methotrexate. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. December, p. 2675–2682, 1993.

CRONSTEIN, B. N.; NAIME, D.; OSTAD, E. The anti- inflammatory effects of methotrexate are mediated by adenosine. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 370, p. 411–416, 1994.

CRUWYS, S. C. Sensory denervation with capsaicin attenuates inflammation and nociception in arthritic rats. **Neuroscience Letters**, v. 193, n. 3, p. 205–207, 1995.

CRUWYS, S. C.; GARRETT, N. E.; KIDD, B. L. . Sensory denervation with capsaicin attenuates inflammation and nociception in arthritic rats. **Neuroscience Letters**, v. 193, n. 3, p. 205–207, 1995.

CUTOLO, M. et al. Anti-inflammatory effects of leflunomide on cultured synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 62, n. 4, p. 297–302, 2003.

DAHER, J. B.; DE MELO, M. D.; TONUSSI, C. R. Evidence for a spinal serotonergic control of the peripheral inflammation in the rat. **Life Sciences**, v. 76, n. 20, p. 2349–2359, 2005.

ELKAYAM, O. et al. Active leflunomide metabolite inhibits interleukin 1beta, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, and metalloproteinase-3 production in activated human synovial tissue cultures. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 62, n. 5, p. 440–443, 2003.

ERNST, P. B.; GARRISON, J. C.; THOMPSON, L. F. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. **Journal of immunology**, v. 185, n. 4, p. 1993–1998, 2010.

FAIRBANKS, L. D. et al. Methotrexate inhibits the first committed step of purine biosynthesis in mitogen-stimulated human T-lymphocytes: a metabolic basis for efficacy in rheumatoid arthritis? **The Biochemical journal**, v. 342,n. 1, p. 143–152, 1999.

FOX, R. I. et al. How does leflunomide modulate the immune response in rheumatoid arthritis? **BioDrugs**, v. 12, n. 4, p. 301–315, 1999a.

FOX, R. I. et al. Mechanism of Action for Leflunomide in Rheumatoid Arthritis. **Clinical Immunology**, v. 93, n. 3, p. 198–208, 1999b.

FUGGLE, N. R. et al. New insights into the impact of neuro-inflammation in rheumatoid arthritis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, n. November, p. 1–11, 2014.

GARRIDO-MESA, N.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. Minocycline: Far beyond an antibiotic. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 2, p. 337–352, 2013.

GRACE, P. M. et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 4, p. 217–31, 2014.

GRANADOS-SOTO, V.; ARGUELLES, C. F.; ALVAREZ-LEEFMANS, F. J. Peripheral and central antinociceptive action of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter blockers on formalin-induced nociception in rats. **Pain**, v. 114, n. 1-2, p. 231–8, 2005.

GUIDELLI, G. M. et al. One year in review : novelties in the treatment of rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 33, p. 102-108, 2015.

HASHIZUME, H. et al. Central administration of methotrexate reduces mechanical allodynia in an animal model of radiculopathy/sciatica. **Pain**, v. 87, n. 2, p. 159–169, 2000.

HERRMANN, M. L. et al. Leflunomide: an immunomodulatory drug for the treatment of rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. **Immunopharmacology**, v. 47, n. 12, p. 273–289, 2000.

HIDER, S. L.; BRUCE, I. N.; THOMSON, W. The pharmacogenetics of methotrexate. **Rheumatology**, v. 46, n. 10, p. 1520–1524, 2007.

IAIN M.B., SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 36, n. 7, p. 5–8, 2011.

JHA, M. K.; JEON, S.; SUK, K. Glia as a Link between Neuroinflammation and Neuropathic Pain. **Immune Network**, v. 12, n. 2, p. 41, 2012.

KOENDERS, M. I.; VAN DEN BERG, W. B. Novel therapeutic targets in rheumatoid arthritis. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 4, p. 189–195, 2015.

KORN, T. et al. Modulation of effector cell functions in experimental autoimmune encephalomyelitis by leflunomide--mechanisms independent of pyrimidine depletion. **Journal of leukocyte biology**, v. 76, n. 5, p. 950–960, 2004.

KRAAN, M. C. et al. Modulation of inflammation and metalloproteinase expression in synovial tissue by leflunomide and methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, n. 8, p. 1820–1830, 2000.

LEDEBOER, A. et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. **Pain**, v. 115, n. 1-2, p. 71–83, 2005.

LEE, D. M.; WEINBLATT, M. E. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 358, n. 9285, p. 903–911, 2001.

MANNA, S. K.; AGGARWAL, B. B. Immunosuppressive leflunomide metabolite (A77 1726) blocks TNF-dependent nuclear factor-kappa B activation and gene expression. **Journal of immunology**, v. 162, n. 4, p. 2095–2102, 1999.

MANNA, S. K.; MUKHOPADHYAY, A.; AGGARWAL, B. B. Leflunomide Suppresses TNF-Induced Cellular Responses: Effects on

NF- κ B, Activator Protein-1, c-Jun N-Terminal Protein Kinase, and Apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 10, p. 5962–5969, 2000.

MARIA, L. et al. Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. **Revista Brasileira De Reumatologia**, v. 52, n. 2, p. 152–74, 2012.

MONTESINOS, M. C. et al. Reversal of the antiinflammatory effects of methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonists theophylline and caffeine: Evidence that the antiinflammatory effects of methotrexate are mediated via multiple adenosine receptors in rat adjuvant. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, n. 3, p. 656–663, 2000.

MONTESINOS, M. C. et al. Adenosine A_{2A} or A₃ receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, n. 1, p. 240–247, 2003.

MOTA, L. M. H. DA; LAURINDO, I. M. M.; SANTOS NETO, L. L. DOS. Princípios gerais do tratamento da artrite reumatoide inicial. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 3, p. 360–362, 2010.

NEURATH, M. F. et al. Methotrexate specifically modulates cytokine production by T cells and macrophages in murine collagen-induced arthritis (CIA): A mechanism for methotrexate-mediated immunosuppression. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 115, n. 1, p. 42–55, 1999.

PAULUS, H. E. An overview of benefit/risk of disease modifying treatment of rheumatoid arthritis as of today. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 41, n. 1, p. 26–29, 1982.

RICHARDSON, J. D.; VASKO, M. R. Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, n. 3, p. 839–845, 2002.

RUDOMIN, P.; SCHMIDT, R. F. Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. **Experimental Brain Research**, v. 129, n. 1, p. 1–37, 1999.

RUDWALEIT, M. et al. Response to methotrexate in early rheumatoid arthritis is associated with a decrease of T cell derived tumour necrosis factor alpha, increase of interleukin 10, and predicted by the initial concentration of interleukin 4. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 59, n. 4, p. 311–314, 2000.

SCHAIBLE, H. G.; DEL ROSSO, A.; MATUCCI-CERINIC, M. Neurogenic aspects of inflammation. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 31, n. 1, p. 77–101, 2005.

SCHOLZ, J. et al. Low-dose methotrexate reduces peripheral nerve injury-evoked spinal microglial activation and neuropathic pain behavior in rats. **Pain**, v. 138, n. 1, p. 130–142, 2008.

SLUKA, K. A.; WESTLUND, K. N. Centrally administered non-NMDA but not NMDA receptor antagonists block peripheral knee joint inflammation. **Pain**, v. 55, n. 2, p. 217–225, 1993.

SLUKA, K. A.; WILLIS, W. D.; WESTLUND, K. N. The role of dorsal root reflexes in neurogenic inflammation. **Pain Forum**, v. 4, n. 3, p. 141–149, 1995.

SMOLEN, J. S. et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 69, n. 6, p. 964–975, 2010.

SONG, P.; ZHAO, Z. Q. The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. **Neuroscience research**, v. 39, n. 3, p. 281–286, 2001.

SPURLOCK, C. F. et al. Methotrexate-mediated inhibition of nuclear factor κ B activation by distinct pathways in T cells and fibroblast-like synoviocytes. **Rheumatology**, n. August, p. 178–187, 2014.

STAMP, L. K. et al. Adenosine receptor expression in rheumatoid synovium: a basis for methotrexate action. **Arthritis Research & Therapy**, v. 14, n. 3, p. R138, 2012.

SWEITZER, S. M.; DELEO, J. A. The active metabolite of leflunomide, an immunosuppressive agent, reduces mechanical sensitivity in a rat mononeuropathy model. **The journal of pain : official journal of the American Pain Society**, v. 3, n. 5, p. 360–368, 2002.

ŚWIERKOT, J.; SZECHIŃSKI, J. Methotrexate in rheumatoid arthritis. **Pharmacological Reports**, v. 58, n. 4, p. 473–492, 2006.

SZETO, G. L. et al. Minocycline suppresses activation of nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1) in human CD4+ T cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 13, p. 11275–11282, 2011.

UZAR, E. et al. The activity of adenosine deaminase and the level of nitric oxide in spinal cord of methotrexate administered rats: Protective effect of caffeic acid phenethyl ester. **Toxicology**, v. 218, n. 2-3, p. 125–133, 2006.

VALENCIA- DE ITA, S. et al. Role of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter in the Development of Capsaicin-Induced Neurogenic Inflammation. **Journal Neurophysiology**, v. 95, n. 4016, p. 3553–3561, 2006.

VILELA, M. G; SANTOS, J. L.; SILVA J. G. C. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. *Femina*, v. 35, p. 667–670, 2007.

VINOGRADOVA, E. P.; ZHUKOV, D. A.; BATUEV, A. S. The effects of stages of the estrous cycle on pain thresholds in female white rats. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 33, n. 3, p. 269–272, 2003.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 12, p. 973–985, 2003.

WEI, H. et al. Intrathecal administration of a gap junction decoupler, an inhibitor of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 1, or a GABAA receptor agonist attenuates mechanical pain hypersensitivity induced by REM sleep deprivation in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 97, n. 2, p. 377–383, 2010.

WILLIS, W. D. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: A double-edged sword. **Experimental Brain Research**, v. 124, n. 4, p. 395–421, 1999.

WILLIS, W. D. John Eccles' studies of spinal cord presynaptic inhibition. **Progress in Neurobiology**, v. 78, n. 3-5, p. 189–214, 2006.

XANTHOS, D. N.; SANDKÜHLER, J. Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 43–53, 2014.

XU, X. et al. Two activities of the immunosuppressive metabolite of leflunomide, A77 1726. Inhibition of pyrimidine nucleotide synthesis and protein tyrosine phosphorylation. **Biochemical pharmacology**, v. 52, n. 4, p. 527–534, 1996.

YAO, H. W. et al. A77 1726, the active metabolite of Leflunomide, inhibits TNF- α and IL-1 from Kupffer Cells. **Inflammation**, v. 2004, n. April, p. 97-103, 2004.