

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RAQUEL REZENDE MENEZES

**MONOARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE COMPLETO DE
FREUND EM RATOS HOLTZMAN E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS
INDUZIDOS PELO TRATAMENTO CRÔNICO COM TIAMINA OU
RIBOFLAVINA**

Belo Horizonte - MG

2013

RAQUEL REZENDE MENEZES

**MONOARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE COMPLETO DE
FREUND EM RATOS HOLTZMAN E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS
INDUZIDOS PELO TRATAMENTO CRÔNICO COM TIAMINA OU
RIBOFLAVINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Márcio M. Coelho.

Coorientador: Prof. Dr. Renes de Resende Machado

Belo Horizonte - MG

2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

RAQUEL REZENDE MENEZES


"Monoartrite induzida por adjuvante completo de Freund em ratos Holtzman e avaliação dos efeitos induzidos pelo tratamento crônico com tiamina ou riboflavina"

Dissertação, como requisito parcial para obter o título de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em primeiro de março de 2013.

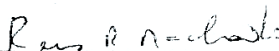
COMISSÃO EXAMINADORA



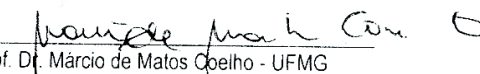
Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari - UFMG



Prof. Dra. Lirlândia Pires de Souza - UFMG



Prof. Dr. Renes de Resende Machado - UFMG



Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho - UFMG

Dedicamos o grau de mestre

Dedico este trabalho a Deus, amantíssimo e sapientíssimo Senhor da minha vida. À minha família, especialmente meus pais, pelo amor e compreensão; minhas irmãs e meu irmão, pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

Preliminarmente quero agradecer a Deus, autor de minha vida, meu refúgio seguro e minha fortaleza. Expresso aqui meu louvor pelas bênçãos que Ele me concedeu ao longo desta jornada e por me permitir esta tão importante conquista.

Minha especial gratidão ao meu pai, pelo exemplo de superação e de humildade e à minha mãe, por abdicar de todos seus sonhos em prol da educação e unidade da família. Especial agradecimento também à minha irmã, Marcinha, pelo carinho, cumplicidade, torcida e por existir em minha vida.

À nova geração da família 'Menezes': Maria Teresa e Luís Augusto Costa; Mateus, Fabiana e Daniel Rodrigues e Letícia Dias. Acima das palavras, os exemplos.

Ao prof. Márcio de Matos Coelho, que tão solícitamente me recebeu em seu núcleo de pesquisa, agradeço pelo apoio e compreensão.

Ao prof. Renes de Resende Machado, por ter me auxiliado muitas vezes na execução de protocolos, sempre demonstrando paciência e apresentando sugestões. Muito tenho a lhe agradecer pelas relevantes contribuições.

À prof.^a Sheila Silva Monteiro Lodder Lisboa, pelo apoio, amizade e carinho.

Aos professores do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas, Marcelo Vidigal Caliar e, em especial, Milene Alvarenga Rachid pela valorosa contribuição na avaliação histológica do projeto.

À Mirna, Olinda e Vânia, pelo primoroso trabalho no laboratório de processamento histológico.

Ao prof. Flávio Almeida Amaral, ao doutorando Lucas Secchim e à mestranda Daiane Boff, do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pelo acompanhamento na execução da avaliação bioquímica.

À médica veterinária Maria Adelaide Fernandes e ao funcionário José Batista Viturino, pela dedicação, profissionalismo e, sobretudo, pelos laços de amizade criados.

À prof^a. Cleuza Rezende da Escola de Veterinária da UFMG, pela colaboração, e ao funcionário do setor de Raio-X do Hospital Veterinário da UFMG, Sr. Eli Costa, pela atenção e disponibilidade.

À doutoranda e amiga Adriana Godin, exemplo de competência e de comprometimento com a pesquisa, pela discrição e pelo companheirismo.

À minha colega de graduação e amiga Andrea Vieira, pelas sábias palavras de incentivo e colaboração.

Às colegas de pós-graduação Marcela Bini e Ana Mercy pelo apoio, amizade, respeito e ajuda mútua. Ao doutorando Leandro Bastos, pelas ideias, frases filosóficas, conselhos e pela sinceridade. Ao Dr. Elias Borges N. Júnior pelo apoio e amizade. Aos alunos de iniciação científica, Darly Soares, Júlia Moura, Ivo Souza, Giovanna Elias, Rafaela Drummond, Pedro Alves e Bruna Costa pelo apoio e dedicação.

Às minhas amigas de infância Érica Menezes, Michele Barros e Roselene Pereira, pela torcida e por compreenderem a minha ausência durante esse período.

Aos inesquecíveis amigos que fiz na drogaria e que sempre me incentivaram a investir na carreira profissional, Clarice Soares, Júlio César, Rita de Cássia, Meiriellen, Antônio Onofre (Toninho) e Lino Soares.

Agradeço também a uma das principais responsáveis por meu êxito, Dr^a. Rosilene Nietzsche Dias. Os conselhos, as orientações, sugestões, caronas matinais e a grande amizade foram decisivos para que pudesse perseverar nesta empreitada.

E, por fim, meu reconhecimento e gratidão a todos que colaboraram para esta pesquisa: abraços fraternos a todos!

“Sê humilde para evitar o orgulho, mas voa alto para alcançar a sabedoria.”

Santo Agostinho

RESUMO

Modelos pré-clínicos de artrite reumatoide (AR) em roedores são amplamente empregados em estudos sobre os mecanismos da doença, bem como na triagem de candidatos a fármacos antiartríticos. Semelhanças morfológicas com a doença humana e capacidade de prever a eficácia clínica são critérios importantes na escolha do modelo. A artrite induzida por adjuvante em ratos é um modelo experimental de AR com histórico comprovado de previsibilidade de eficácia de candidatos a fármacos antiartríticos. O esquema de administração do adjuvante completo de Freund (CFA; *Mycobacterium tuberculosis*, 1 mg/mL), constituído de duas injeções no primeiro dia (100 µL por via intradérmica na base da cauda e 100 µL por via intraplantar na pata direita) e uma injeção no segundo dia (100 µL por via intradérmica na base da cauda) em ratos Holtzman fêmeas, induziu inflamação periarticular localizada na pata injetada, de início imediato e de duração prolongada (21 dias). O caráter monoartrítico do modelo permitiu a observação de alterações típicas da fase inicial da AR em humanos, como edema, alodínia mecânica, paniculite, sinovite, neoangiogênese e elevação da atividade da mieloperoxidase, sem ocorrência de doença generalizada que pudesse resultar em grave desconforto para os animais. O aumento de temperatura corporal foi observado apenas após as duas primeiras injeções de CFA. Tendo em vista a atividade da riboflavina e da tiamina em modelos experimentais de dor e inflamação agudas, foi avaliado o efeito induzido pelo tratamento prolongado com essas vitaminas sobre a alodínia e o edema no modelo experimental. Riboflavina (125, 250 ou 500 mg/kg) ou tiamina (150, 300 ou 600 mg/kg) foram administradas *per os*, duas vezes ao dia, ao longo do período de avaliação. Os resultados demonstraram que a riboflavina não reduziu significativamente o edema de pata e a alodínia mecânica. O tratamento prolongado dos animais com tiamina não inibiu o edema de pata, mas atenuou a alodínia mecânica de forma dose-dependente no 6º e no 12º dias de avaliação. Também foi investigado o efeito induzido pela associação de tiamina (600 mg/kg) ou riboflavina (500 mg/kg) com dexametasona (0,5 mg/kg, *per os*) sobre a alodínia mecânica e edema de pata induzidos pelas injeções de CFA. A alodínia mecânica não foi atenuada pelo tratamento com dexametasona e não foi observado efeito antialodínico induzido pela associação de riboflavina com dexametasona. A associação tiamina e dexametasona induziu efeito antiedematogênico de maior magnitude do que aquele induzido por tiamina ou dexametasona isoladamente. Concluindo, os resultados demonstraram que o modelo de monoartrite induzida por CFA em ratos Holtzman foi reprodutível, sendo observadas alterações inflamatórias como sinovite, paniculite, neoangiogênese, edema de pata e alodínia mecânica persistentes. Entre as vantagens de um modelo experimental de AR no qual os animais desenvolvem monoartrite, mas não poliartrite, inclui a possibilidade de identificar sinais característicos da doença em apenas uma articulação, com menor comprometimento das funções fisiológicas e sofrimento dos animais e maior probabilidade de observação de efeitos induzidos por candidatos a fármacos. Os resultados também indicam que a riboflavina e, principalmente, a tiamina apresentam potencial no tratamento de pacientes com AR, principalmente em associação com outros fármacos com indicação já estabelecida.

PALAVRAS-CHAVE: artrite reumatoide, adjuvante completo de Freund, riboflavina, tiamina, dexametasona, dor nocicepção e edema.

ABSTRACT

Preclinical models of rheumatoid arthritis (RA) in rodents have been widely used to investigate the disease mechanisms and also to screen new drugs. Similarities with the human disease and predictive value for efficacy and safety are important criteria to choose a preclinical model of RA. Arthritis induced by adjuvant in rats is a preclinical model of RA with a well established predictive value for efficacy of antiarthritic drugs. Two injections of complete Freund adjuvante (CFA; *Mycobacterium tuberculosis*, 1 mg/mL) in the first day (one intradermal injection of 100 μ L into the tail base and one intraplantar injection of 100 μ L into the right paw) followed by a third injection in the second day (a intradermal injection of 100 μ L into the tail base) in female Holtzman rats induced an immediate and long lasting (21 days) localized periarticular inflammation. The monoarthritic model allowed to identify characteristic changes of the early phase of RA in humans, including edema, mechanical allodynia, panniculitis, synovitis, neoangiogenesis and increase of myeloperoxidase activity, without systemic disease that resulted in severe animal suffering. Body temperature increase was observed only after the second injection of CFA. As riboflavin and thiamine activities have been demonstrated in acute models of pain and inflammation, their effects on the mechanical allodynia and edema in the experimental model were investigated. Riboflavin (125, 250 or 500 mg/Kg) or thiamine (150, 300 or 600 mg/Kg) were administered *per os*, twice daily, throughout the experimental period. Riboflavin reduced neither paw edema nor mechanical allodynia. Thiamine did not change paw edema, but dose-dependently inhibited the mechanical allodynia on days 6 and 12 of the experimental period. The effects induced by the association of thiamine (600 mg/Kg) or riboflavin (500 mg/kg) with dexamethasone (0.5 mg/Kg, *per os*) on the mechanical allodynia and paw edema induced by the injections of CFA were also investigated. Mechanical allodynia was inhibited neither by dexamethasone nor by the association of riboflavin with dexamethasone. The association of thiamine with dexamethasone, when compared with each drug, induced a greater antiedematogenic effect. In conclusion, the results of the present study demonstrate that the model of monoarthritis induced by CFA in Holtzman rats is reproducible, allowing to identify RA typical inflammatory changes such as long lasting synovitis, panniculitis, neoangiogenesis, paw edema and mechanical allodynia. Advantages of an experimental model of RA in which the animals develop monoarthritis, but not polyarthritis, include the possibility of identifying characteristic signs of the disease in a single joint, with reduced impact over the physiological functions, minor animal suffering and greater probability of detecting effects induced by drug candidates. The results also indicate that riboflavin and mainly thiamine may be useful in the treatment of RA patients, especially in association with other drugs with established efficacy.

KEY-WORDS: rheumatoid arthritis, complete Freund adjuvant, riboflavin, thiamine, dexamethasone, pain, nociception and edema.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fluxograma para a farmacoterapia da AR.....	31
Figura 2 Estrutura química da tiamina.....	33
Figura 3 Esquema indicando as funções de duas importantes enzimas dependentes da tiamina, a piruvato desidrogenase e a α-cetoglutarato desidrogenase.....	34
Figura 4 Estrutura química da riboflavina.....	36
Figura 5 Estruturas químicas da FAD e da FMN.....	36
Figura 6 Aparato utilizado para a avaliação da alodínia mecânica.....	46
Figura 7 Aparato utilizado para a avaliação do edema de pata.....	47
Figura 8 Efeito induzido pelas administrações de CFA (100 μL, 1 mg/mL) ou salina sobre o limiar nociceptivo mecânico.....	53
Figura 9 Efeito induzido pelas administrações de CFA (100 μL, 1 mg/mL) ou salina sobre o volume de pata.....	54
Figura 10 Efeito induzido pelas administrações de CFA (100 μL, 1 mg/mL) ou salina sobre a massa corporal.....	55
Figura 11 Efeito induzido pelas duas primeiras injeções de CFA (100 μL, 1 mg/mL) ou salina sobre a temperatura corporal durante 24 h.....	57
Figura 12 Efeito induzido pelas três injeções de CFA (100 μL, 1 mg/mL) ou salina sobre as temperaturas corporais diurna e noturna durante o período de 21 dias.....	57
Figura 13 Efeito induzido pelas injeções de CFA (100 μL, 1 mg/mL) sobre o limiar nociceptivo mecânico nas patas ipsilateral e contralateral.....	59
Figura 14 Efeito induzido pelas injeções de CFA (100 μL, 1 mg/mL) sobre o volume das patas ipsilateral e contralateral.....	60
Figura 15 Efeito induzido pelas injeções de CFA (100 μL, 1 mg/mL) sobre a massa corporal.....	61
Figura 16 Fotografias das patas posteriores (ipsilateral e contralateral) de três animais, 7, 14 e 21 dias obtidas após as injeções de salina na pata direita.....	63
Figura 17 Fotografias das patas posteriores (ipsilateral e contralateral) de três animais, 7, 14 e 21 dias obtidas após as injeções de CFA na pata direita.....	63
Figura 18 Imagens radiográficas das patas posteriores de três animais obtidas 7, 14 e 21 dias após as injeções de salina na pata direita.....	64
Figura 19 Imagens radiográficas das patas posteriores de três animais obtidas 7, 14 e 21 dias após as injeções de CFA na pata direita.....	64

Figura 20 Fotomicrografias representativas de cortes histológicos da articulação tíbio-társica e do tecido periarticular de animais controle e de animais 7, 14 e 21 dias após as injeções de CFA.....	65
Figura 21 Escores para paniculite, sinovite e neoangiogênese sinovial 7, 14 e 21 dias após as injeções de CFA.....	66
Figura 22 Atividade da MPO na pata dos animais 7, 14 e 21 dias após as injeções de salina ou CFA.....	67
Figura 23 Efeito induzido por riboflavina (125, 250 ou 500 mg/Kg) ou dexametasona (0,5 mg/Kg) sobre a alodínia mecânica	69
Figura 24 Efeito induzido por riboflavina (125, 250 ou 500 mg/Kg) ou dexametasona (0,5 mg/Kg) sobre o edema de pata	70
Figura 25 Efeito induzido por riboflavina (125, 250 ou 500 mg/Kg) ou dexametasona (0,5 mg/Kg) sobre o aumento da massa corporal observado no período experimental.....	71
Figura 26 Efeito induzido por riboflavina (500 mg/Kg), dexametasona (0,5 mg/Kg) ou da associação (riboflavina 500 mg/Kg-dexametasona 0,5 mg/Kg) sobre a alodínia mecânica	73
Figura 27 Efeito induzido por riboflavina (500 mg/Kg), dexametasona (0,5 mg/Kg) ou da associação (riboflavina 500 mg/Kg-dexametasona 0,5 mg/Kg) sobre o edema de pata	74
Figura 28 Efeito induzido por riboflavina (500 mg/Kg), dexametasona (0,5 mg/Kg) ou da associação (riboflavina 500 mg/Kg-dexametasona 0,5 mg/Kg) sobre o aumento da massa corporal observado no período experimental.....	75
Figura 29 Efeito induzido por tiamina (150, 300 ou 600 mg/Kg) sobre a alodínia mecânica	77
Figura 30 Efeito induzido por tiamina (150, 300 ou 600 mg/Kg) sobre o edema de pata.....	78
Figura 31 Efeito induzido por tiamina (150, 300 ou 600 mg/Kg) sobre o aumento da massa corporal observado no período experimental.....	79
Figura 32 Efeito induzido por tiamina (600 mg/Kg), dexametasona (0,5 mg/Kg) ou da associação (tiamina 600 mg/Kg-dexametasona 0,5 mg/Kg) sobre a alodínia mecânica.....	81
Figura 33 Efeito induzido por tiamina (600 mg/Kg), dexametasona (0,5 mg/Kg) ou da associação (tiamina 600 mg/Kg-dexametasona 0,5 mg/Kg) sobre o edema de pata.....	82
Figura 34 Efeito induzido por tiamina (600 mg/Kg), dexametasona (0,5 mg/Kg) ou da associação (tiamina 600 mg/Kg-dexametasona 0,5 mg/Kg) sobre o aumento da massa corporal observado no período experimental.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABAT	Abatacepte
AIA	Artrite induzida por adjuvante
AIEs	Anti-inflamatórios esteroides
AIMR	Artrite imune-mediada em roedores
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroides
AR	Artrite reumatoide
BC	Base da cauda
CC	Crânio-caudal
CFA	<i>Complete Freund's adjuvant</i> (adjuvante completo de Freund)
CIA	<i>Collagen-induced arthritis</i> (artrite induzida por colágeno)
cm	centímetro
CMC	Carboximetilcelulose
COX	Ciclooxigenase
DEXA	Dexametasona
E	Eosina
EUA	Estados Unidos da América
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMCDs	Fármacos modificadores do curso da doença
FMN	Flavina mononucleotídeo
h	Hora
H	Hematoxilina
ICAD	Índices compostos de atividade da doença
i. d.	intradérmica
IFN	Interferon
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
KeV	Kiloeletrovolt
Kg	Kilogramas
mÅ	miliampères
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (complexo maior de histocompatibilidade)

min	minuto
ML	Médio-lateral
mm	milímetro
MPO	Mieloperoxidase
MTX	Metotrexato
n.	número
N	Newton
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
p.	página
<i>p.o.</i>	<i>per os</i>
PGs	Prostaglandinas
RBF	Riboflavina
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
r.p.m	rotações por minuto
RTX	Rituximabe
s	segundo
s.c.	subcutânea
TGF-β	Fator de crescimento tumoral β
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TOCI	Tocilizumabe
TX	Tromboxano
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
v.	volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Envelhecimento populacional e artrite reumatoide (AR).....	15
1.2 Fisiopatogênese da AR.....	16
1.3 A dor e o edema na AR.....	20
1.4 A febre na AR.....	21
1.5 Modelos experimentais de AR.....	22
1.6 Farmacoterapia da AR.....	25
1.6.1 AIEs.....	25
1.6.2 FMCDs.....	27
1.6.3 AINEs.....	29
1.6.4 Outras estratégias terapêuticas.....	30
1.6.5 O Consenso Brasileiro 2012 para farmacoterapia da AR.....	31
1.7 Reposicionamento de fármacos.....	32
1.7.1 Tiamina.....	33
1.7.2 Riboflavina.....	35
2 JUSTIFICATIVA.....	40
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 OBJETIVO GERAL.....	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 Animais experimentais.....	42
4.2 Drogas e veículos.....	42
4.2.1 Preparo das suspensões e intervalos de administração.....	43
4.3 Caracterização do modelo experimental de AR induzida por CFA.....	44
4.4 Avaliação da alodínia mecânica.....	45
4.5 Avaliação do edema de pata.....	46
4.6 Avaliação da temperatura corporal.....	47
4.7 Avaliação radiológica.....	48
4.8 Avaliação histológica.....	49
4.9 Análise bioquímica: determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	50

4.10 Análise estatística.....	51
5 RESULTADOS.....	52
5.1 Caracterização do modelo experimental de AR.....	52
5.1.1 Avaliação da alodínia mecânica, do edema de pata, da temperatura corporal e da massa corporal.....	52
5.1.2 Avaliação da alodínia mecânica e do edema nas patas ipsi e contralateral.....	58
5.1.3 Análises radiológica, histológica e bioquímica.....	62
5.2 Efeito induzido pela administração de riboflavina, isolada ou em associação com dexametasona, sobre a alodínia mecânica e o edema de pata	68
5.3 Efeito induzido pela da administração de tiamina, isolada ou em associação com dexametasona, sobre a alodínia mecânica o edema de pata	76
6 DISCUSSÃO.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento populacional e artrite reumatoide

O aumento da expectativa de vida e o consequente envelhecimento populacional têm sido observados em quase todo o mundo. Entre as possíveis causas associadas a esses fenômenos estão a redução da taxa de mortalidade infantil e o acentuado declínio da taxa de fecundidade, que contribuem para o aumento do número relativo de idosos na população (ALHO, 2008; HILL *et al.*, 2012). De acordo com o censo de 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a redução dos níveis de fecundidade acarretou na diminuição de 42,7% (1960) para 24,1% (2010) da participação da população entre 0 e 14 anos de idade na população geral. Por outro lado, no período 1960/2010, a população de 65 anos ou mais passou de 2,7% para 7,4%. Nesse meio século, a expectativa de vida do brasileiro aumentou 25,4 anos, passando de 48,0 para 73,4 anos.

Com o envelhecimento, os indivíduos ficam mais susceptíveis ao desenvolvimento de doenças predispostas em seu perfil genético e/ou associadas ao estilo de vida. Muitas dessas doenças são crônicas, o que justifica maiores cuidados e, conseqüentemente, gastos elevados. A prevalência, os cuidados com a saúde e os gastos relacionados à internação são considerações importantes na população acima de 60 anos e com múltiplas doenças crônicas (ANDERSON & HORVATH, 2004; NOWOSSADECK, 2012). Nos idosos, as doenças reumáticas, em especial a artrite reumatoide (AR), destacam-se entre as várias doenças crônicas características dessa faixa etária (GOLDENBERG, 2008; HOFFMAN *et al.*, 1996; KOVAR, 1977; WOLLF *et al.*, 2002).

A AR é uma doença inflamatória sistêmica crônica de origem autoimune que pode afetar diversos tecidos e órgãos, incluindo pele, vasos sanguíneos, coração, pulmões e músculos. Entretanto, a AR acomete principalmente as articulações periféricas, induzindo uma sinovite simétrica proliferativa e inflamatória não supurativa que geralmente progride para destruição da cartilagem articular e do osso subcondral e também anquilose (ROSENBERG, 2004). A AR pode resultar em

comprometimento poliarticular e em sinais e sintomas extra-articulares como fadiga e vasculite (HARRIS, 2005). Quando a doença é diagnosticada antes dos 16 anos, o quadro clínico é denominado AR juvenil (RAVELLI & MARTINI, 2007).

A AR tem uma prevalência mundial em torno de 0,5 a 1,0% da população adulta, sendo as mulheres duas a três vezes mais acometidas que os homens (GIBOFISKY, 2012; McINNIS & SCHEFF, 2011), ocorrendo em todas as regiões do mundo e em todas etnias (BRANDÃO *et al.*, 1997). A doença se inicia, geralmente, entre os 30 a 50 anos e entre 20% a 30% dos pacientes não tratados tornam-se incapacitados para o trabalho dois a três anos após o diagnóstico. A prevalência aumenta com a idade em ambos os gêneros, acompanhando o envelhecimento da população. No Brasil, a prevalência é similar à da população mundial, predominando na população do gênero feminino, com início após os 40 anos e com maior incidência na faixa dos 50 anos (BLAY *et al.*, 2012; GOLDENBERG, 2008; SENNA *et al.*, 2004).

A sobrevida dos pacientes com AR é menor do que a da população em geral e a expectativa de vida pode decrescer de três a dez anos, dependendo da gravidade e da idade do paciente no início da doença (KVALVIK *et al.*, 2000). As causas mais comuns descritas para as mortes desses pacientes são as doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, doenças infecciosas e renais (AVIÑA-ZUBIETA *et al.*, 2008; GABRIEL & MICHAUD, 2009; MUTRU *et al.*, 1985; TORIGOE & LAURINDO, 2006). Pacientes com AR apresentam maior número de dias com comprometimento das saúdes física e mental comparados com indivíduos sem a doença (ABELL *et al.*, 2005; BRANDÃO *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2010). Devido ao caráter progressivo, ao desenvolvimento das deformidades e ao comprometimento da capacidade funcional, a AR representa um importante impacto econômico e social (LAURINDO *et al.*, 2004; HOOTMAN *et al.*, 2012).

1.2 Fisiopatogênese da AR

A fisiopatogênese da AR ainda não está bem elucidada. As possíveis causas são atribuídas tanto a fatores ambientais como tabagismo, ou agentes infecciosos (vírus, bactérias ou micoplasmas), quanto a fatores genéticos, em função das evidências

observadas em gêmeos monozigóticos que apresentam até mais que 30% de concordância no desenvolvimento da doença (GIBOFSKY, 2012). Outra evidência genética relacionada à AR é a observação da incidência de certos alelos (HLA) DR1 ou DR4 na população caucasiana, presentes em 80% dos pacientes com AR (GREGERSEN *et al.*, 1987; SUAREZ-ALMAZOR *et al.*, 1995; WORDSWORTH & BELL, 1991).

O curso da doença não apresenta um padrão homogêneo, principalmente quando se observam o ritmo da evolução da infiltração articular e das manifestações extra-articulares, assim como, a resposta às intervenções terapêuticas. As alterações iniciais são provenientes de um infiltrado de linfócitos e macrófagos na membrana sinovial, com conseqüente hiperplasia de células sinoviais e neoangiogênese (SZEKANECZ *et al.*, 1998a; SZEKANECZ *et al.*, 2005), contribuindo para a formação de um tecido sinovial proliferativo, chamado de “*pannus*”, o qual atinge o osso subcondral e a cartilagem articular, com destruição progressiva (GIBOFSKY, 2012; McINNIS & SCHETT, 2011; MIOSSEC, 2004).

Em relação às células envolvidas na fisiopatogênese da AR, de forma semelhante ao que se observa com os mediadores, claramente constata-se um evento multimedido, com destaque aos linfócitos B que possuem importante papel na doença (DÖRNER & BURMESTER, 2003). Algumas das funções dos linfócitos B incluem apresentação de antígenos, secreção de citocinas inflamatórias, produção do fator reumatoide, envolvimento no processo de organogênese linfoide ectópica presente no sinóvio reumatoide (formação do tecido linfoide terciário), participação na formação do complexo imune e coestimulação de células T. A formação de agregados com estrutura de folículos terciários devido à migração de células T e B, a expressão de moléculas coestimulatórias (CD 154) e o aumento da produção de IL-6 e IL-10 indicam a hiperatividade de linfócitos B na AR (MARSTON *et al.*, 2010).

Macrófagos e neutrófilos são representantes celulares cuja participação na fisiopatogênese da AR também está bem estabelecida (SZEKANECZ & KOCH, 2007; WIPKE & ALLEN, 2001). Essas células fagocíticas, quando ativadas,

produzem as espécies reativas de oxigênio (ROS) altamente tóxicas para patógenos invasores. Por outro lado, atuam como moléculas que regulam diversas vias de sinalização fisiológica dos neutrófilos. Como sinalizadoras, as ROS e as RNS servem como moduladores de proteínas e cinases, fosfatases de lipídios, receptores de membrana, canais de iônicos e fatores de transcrição, incluindo NF-kappa B. Esse último regula a expressão de genes de citocinas e quimiocinas importantes que modulam a resposta inflamatória (FIALKOW *et al.*, 2007). As ROS e os radicais de nitrogênio, entre os quais se incluem o superóxido, o peróxido de hidrogênio, os radicais hidroxila, o ácido hipocloroso e os do óxido nítrico (NO), também estão relacionados à fisiopatogênese da AR. As ROS e outros radicais livres contribuem para os danos celulares da AR e de outras doenças inflamatórias (KORHONEN *et al.*, 2005). As ROS são produzidas no curso da fosforilação oxidativa celular e a sua produção excessiva pode provocar danos em proteínas, lípidos, ácidos nucleicos e componentes de matriz. O NO é um radical livre reconhecido como um mediador e regulador de respostas inflamatórias. Tal molécula pode alterar funções celulares ao interagir com oxigênio molecular e ânion superóxido para produzir espécies reativas de nitrogênio (BREDT & SNYDER, 1994). Sabe-se que o NO possui papel importante como mediador nos processos inflamatórios osteoarticulares (BAO *et al.*, 2012; CHOU *et al.*, 2011).

Os neutrófilos, presentes em abundância nas articulações de pacientes com AR ativa, estão relacionados à fisiopatogênese da doença uma vez que produzem várias citocinas inflamatórias e induzem danos teciduais. A exposição a complexos imunes, fator reumatoide, citocinas, mediadores inflamatórios da cascata do ácido araquidônico e metabólitos tóxicos de oxigênio resultantes da ativação de neutrófilos contribuem para a destruição da cartilagem observada na AR. O processo inflamatório intra-articular persistente está relacionado com a ação das moléculas quimiotáticas que determinam a predominância de células inflamatórias agudas em lesões inflamatórias crônicas (KITSIS & WEISSMANN, 1991). Evidências do envolvimento dos neutrófilos na fisiopatogênese da AR têm sido fornecidas por estudos em modelos animais (WIPKE & ALLEN, 2001), o que justifica o interesse no desenvolvimento de estratégias terapêuticas com o objetivo de modular a atividade desse grupo celular.

A mieloperoxidase (MPO), maior componente dos grânulos azurófilos de neutrófilos é uma hemoproteína secretada principalmente por neutrófilos ativados. Essa enzima catalisa a conversão de H_2O_2 em HOCl, bem como a oxidação de tirosina a radical tirosil usando o H_2O_2 como agente oxidante. Ambos os produtos são citotóxicos, contribuindo para destruição de micro-organismos invasores (HEINECKE *et al.*, 1993; NAUSEEF *et al.*, 1988). Stamp *et al.* (2012) verificaram concentrações plasmáticas da MPO significativamente maiores em pacientes com AR em relação ao grupo controle. A alta atividade da MPO em pacientes com AR promove estresse oxidativo por meio da produção de HOCl.

Vários mediadores, como as citocinas inflamatórias, as quimiocinas e as prostaglandinas (PG's) têm participação nos eventos inflamatórios que caracterizam a AR (FELDMANN *et al.*, 1996; NOURI *et al.*, 1984; SZEKANECZ *et al.*, 2000). Entre os eventos celulares desencadeados, estão a produção de interferon-gama (IFN- γ) por linfócitos T auxiliares do tipo 1, que estimulam a liberação de fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β) e metaloproteinasas pelos macrófagos e fibroblastos sinoviais (KLIMIUK *et al.*, 1999). O TNF- α ocupa posição relevante entre as mais de 100 citocinas e quimiocinas diferentes presentes na AR, pois induz ativação marcante dos osteoclastos, evento que contribui para erosão da articulação. Resultados de estudos em modelos animais e com tecidos humanos indicam os osteoclastos como importantes células envolvidas na fisiopatogênese da AR (WILLIANS *et al.*, 1992).

As quimiocinas, mediadores cuja participação na fisiopatogênese da AR (SZEKANECZ & KOCH, 2001) tem ficado evidente nos últimos anos, são representadas por uma superfamília de citocinas estruturalmente homólogas, caracterizadas pela presença de cisteínas conservadas e pontes de dissulfeto. Subdividem-se em quatro sub-famílias chamadas C, CC, CXC e CX₃C, com base na posição das cisteínas. As principais funções das quimiocinas são a regulação do recrutamento e ativação dos leucócitos e da angiogênese (SZEKANECZ *et al.*, 1998a). Algumas dessas quimiocinas como a proteína quimiotática para monócitos (MCP)-1 e a proteína inflamatória derivada de macrófagos (MIP)-1 α já foram relacionadas à fisiopatogênese da AR e parecem ter papel importante na indução

das alterações laboratoriais, clínicas e histológicas características da doença (KOCH *et al.*, 1994a; KOCH *et al.*, 1994b; SZEKANECZ *et al.*, 1998b).

1.3 A dor e o edema na AR

Pacientes com AR geralmente relatam dor moderada a intensa e, por décadas, pesquisas médicas têm sido direcionadas ao desenvolvimento de intervenções terapêuticas que promovam o alívio da dor e aumentem a expectativa de vida (REGINSTER, 2002). A dor é um sintoma importante na AR (YU *et al.*, 2002) e é caracterizada por alodínia, hiperalgesia e dor espontânea (SHAIBLE & GRUBB, 1993). De acordo com a definição estabelecida pela Associação Internacional para Estudo da Dor, a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com lesão tecidual real ou potencial. Geralmente, essa experiência se inicia com a ativação dos nociceptores, que são neurônios sensoriais de alto limiar, componentes do sistema nervoso somatossensorial periférico, capazes de traduzir e codificar estímulos nocivos. Nas articulações, os nociceptores localizam-se na cavidade articular, ligamentos, ossos, periósteo e próximos aos vasos, sendo sensíveis à pressão e ao movimento articular (LIPSKY, 1977; SCHAIBLE & SCHMIDT, 1984).

Clinicamente, a dor inflamatória é muito mais persistente do que aquela observada normalmente na maioria dos modelos pré-clínicos. Um modelo experimental no qual um fenótipo de hipersensibilidade inflamatória apresenta-se mais prolongado pode representar um modelo com maior valor preditivo para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas. Wilson *et al.* (2006), ao caracterizar e validar um modelo de dor inflamatória crônica, demonstraram que a injeção intra-articular de adjuvante em ratos resulta em uma resposta caracterizada por sensibilização prolongada a estímulos nocivos e não nocivos, o que tem paralelo com uma dor inflamatória prolongada. Além disso, foi observado um estado de sensibilização, tanto na presença como na ausência de inflamação. Vários fármacos analgésicos conhecidos exibem atividade em modelos experimentais crônicos de AR, incluindo morfina, ibuprofeno e etoricoxibe.

O edema inflamatório também é uma manifestação importante da AR. O edema da sinóvia e das estruturas periarticulares é um fator que contribui para a rigidez, pois interfere nas funções fisiológicas da articulação (KHURANA & BERNEY, 2005). A membrana sinovial envolve as articulações e possui, em condições normais, três camadas de células e estroma subsinovial avascularizado. Na artrite aguda, tal membrana apresenta-se espessada, hiperêmica e edematosa (GOLDING, 1999), com seis a dez camadas de células, neoangiogênese, obstrução capilar e hemorragia perivascular (SKARE, 1999).

Em indivíduos normais, não se consegue remover o fluido sinovial com facilidade da cavidade articular dos joelhos. Porém, no joelho artrítico, volumes consideráveis podem ser aspirados de uma articulação, podendo ser próximos de 70 mL (SCHAIBLE & GRUBB, 1993). O fluido sinovial normal em humanos pode conter entre 10-200 células/mm³ e possui aspecto claro e amarelado. Entretanto, em pacientes com AR, o líquido possui coloração esverdeada, sendo escuro, turvo ou opaco, e contém, em média, 20.000 células/mm³ (GOLDING, 1999).

1.4 A febre na AR

A febre é uma alteração neuroendócrina característica de fase aguda (BLATTEIS & SEHIC, 1997; BLATTEIS, 2003), podendo ser definida como uma elevação controlada da temperatura interna de um organismo para níveis acima dos normais em decorrência da elevação do ponto de regulação hipotalâmico (BLATTEIS, 2006). O hipotálamo, mais precisamente a área pré-óptica do hipotálamo anterior, controla a temperatura corporal em torno de um ponto de regulação relativamente constante. Nessa região são encontrados neurônios termossensíveis cuja frequência de disparo é afetada tanto por variações na temperatura sanguínea da área adjacente, como por influência de conexões diretas com termorreceptores distribuídos na pele e nos músculos. Em resposta a variações de temperatura, os neurônios hipotalâmicos iniciam respostas termorregulatórias apropriadas para manter uma temperatura interna constante (BOULANT, 2000). A resposta febril é uma resposta complexa que envolve produção de citocinas e de proteínas de fase aguda, além da ativação de vários sistemas como o endócrino e o imunológico (MACKOWIAK *et al.*, 1997). A despeito de a febre ser conhecida desde a antiguidade como manifestação de

infecção (ATKINS, 1984; BLATTEIS, 1986), esse sinal clínico pode ocorrer em pacientes com doenças autoimunes, neoplasias, trombose, infarto agudo do miocárdio, entre outras (BLATTEIS, 2006).

A hipótese do envolvimento de múltiplos pirogênios na fisiopatogênese da febre é bastante explorada. Durante as investigações iniciais, havia especulação sobre a participação do IFN na etiologia da febre. Desde os primeiros ensaios clínicos utilizando IFNs parcialmente purificados, a febre foi reconhecida como a principal reação adversa induzida por essa terapia. O TNF- α é também intrinsecamente pirogênico e induz febre monofásica após administração intravenosa em coelhos. Esses resultados, juntamente com os observados com o IFN- α e IL-1 β , dão suporte para a hipótese expandida da fisiopatogênese da febre envolvendo vários pirogênios endógenos (DINARELLO *et al.*, 1986). Em um estudo conduzido por Philippe *et al.* (1997) foram avaliados parâmetros degenerativos, inflamatórios e funcionais em modelo experimental de AR induzida por adjuvante. Nesse estudo, os autores demonstraram hipertermia primária com pico no primeiro dia após indução e um segundo aumento da temperatura corporal entre os dias 13 e 15. O primeiro pico foi associado ao aumento da concentração plasmática de IL-6 e TNF- α . No segundo pico, observou-se um aumento mais proeminente da concentração plasmática de IL-6.

1.5 Modelos experimentais de AR

No desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para a AR, são comumente utilizados modelos experimentais para fornecer subsídios que permitam aumentar o conhecimento sobre os mecanismos da doença e identificar novos agentes terapêuticos. A indução de artrite é tradicionalmente realizada por meio da administração de agentes artritogênicos, entre os quais estão o pristane (VINGSBO *et al.*, 1996; ZHENG *et al.*, 2002), o zimosano (GUERRERO *et al.*, 2006), o adjuvante incompleto de Freund (CANNON *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 1999) e o adjuvante completo de Freund (CFA) (BARTON *et al.*, 2007; BILLIAU & MATTHYS, 2001; CAI *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2002). Os modelos experimentais de artrite induzida por adjuvante (AIA) são justificados pelas características que se assemelham àquelas da doença humana (BILLIAU & MATTHYS, 2001; CAI *et al.*,

2006; COOK & MOORE, 2006; NAGAKURA *et al.*, 2003). Entre as semelhanças, incluem-se a alodínia, a hiperalgesia, o edema de articulação e as alterações histopatológicas (DONALDSON *et al.*, 1993; WILSON *et al.*, 2006).

Os critérios para elegibilidade de um modelo pré-clínico para testes com candidatos a fármacos incluem a eficácia preditiva, fisiopatogênese similar com aquela da AR humana, facilidade de uso, reprodutibilidade de dados e duração adequada do período de teste. Sabe-se que grande parte dos fármacos utilizados na clínica induzem reações adversas e toxicidade que impedem o seu uso a longo prazo ou o uso de doses que podem modificar de forma favorável o curso da doença. Modelos animais frequentemente predizem esses fenômenos. Muitos dos modelos de AR têm alguma característica fisiopatológica que é similar à que ocorre na AR humana, contudo, diferenças importantes são observadas. Assim, em modelos animais de AR, a doença progride muito mais rapidamente do que na doença humana, o que confere um aspecto de doença inflamatória aguda. Outro aspecto conhecido é o fato de que roedores desenvolvem uma reabsorção óssea intensa em resposta a inflamação articular, de forma diferente do que se observa em humanos (BENDELE *et al.*, 1999; BENDELE, 2001).

Variações de modelos de artrite imuno-mediada em roedores (AIMR) têm sido investigados nas últimas décadas a fim de verificar sua adequação para avaliação de doença articular imune-mediada. As opções de AIMR estão relacionadas a variáveis como espécie empregada (rato, camundongo ou porco da Índia), tipo de doença (induzida, espontânea ou por modificação genética) e agente indutor (adjuvantes, polissacarídeo, proteoglicanas, colágeno e outras proteínas) (BOLON *et al.*, 2011). Apesar das limitações inerentes, muitos modelos de AIMR têm contribuído significativamente para o conhecimento da fisiopatogênese da AR e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Uma vez que a geração rápida de resultados sobre eficácia pré-clínica e toxicidade é fundamental, a seleção adequada de um modelo é importante (BENDELE, 2001). Os principais modelos de artrite induzida, espontânea ou por modificação genética com suas vantagens e desvantagens, estão resumidos na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos principais modelos de artrite induzida, espontânea ou por modificação genética.

Modelo	Agente (s) indutor (s)/ alteração genética	Animal	Vantagens	Desvantagens	Referências
INDUZIDOS					
AIA	CFA	rato	Rápido início e progressão Inflamação articular de fácil mensuração Procedimentos de inicialização e caracterização bem estabelecidos	Maior quantidade de droga para pesquisa Maior gasto com produção e manutenção Poliartrite causa estresse e desconforto intensos	BARTON <i>et al.</i> , 2007. BENDELE <i>et al.</i> , 1999. BILLIAU & MATTHYS, 2001. CAI <i>et al.</i> , 2006. KIM & MOUDGIL, 2009.
CIA	Colágeno tipo II	rato	Semelhanças com AR humana	Ausência de exacerbações e remissões	BOLON <i>et al.</i> , 2011. BEVAART <i>et al.</i> , 2010. SOTO <i>et al.</i> , 2008.
		camundongo	Semelhanças com AR humana: clínicas, histológicas e imunológicas	Modelo pouco adequado para a avaliação de AINEs e FMCDs Possibilidade de investigação de novos imunossuppressores	PHADKE <i>et al.</i> , 1985.
GENETICAMENTE MODIFICADO					
K/BxN	Expressam receptor de células T transgene (KRN) e molécula A de MHC II humano (g7)	camundongo	Útil para investigação de aspectos específicos (funções de moléculas MHCII e identificação de epítomos de células T)	Dificuldade de padronização das técnicas Elevada possibilidade de artefatos na manipulação genômica Interações entre os genes manipulados e os genes do animal	AHLQVIST <i>et al.</i> , 2009. FUGGER & SVEJGAARD, 2000.
AIMR ESPONTÂNEA					
MRL/lpr	ocorrência natural	camundongo	Semelhanças com AR humana: proliferação de células sinoviais, formação de <i>pannus</i> , nódulo reumatoide e circulação de fatores reumatoides	Síndrome autoimune progressiva De 16 a 24 semanas, desenvolvimento de lesões renais e outras complicações que podem resultar na morte de até 50% dos animais	BEVAART <i>et al.</i> , 2010. TSUNEYAMA <i>et al.</i> , 2001. CHRISTOPHER & GARY, 2002.

AIA - artrite induzida por adjuvante; CFA - adjuvante completo de Freund; CIA - artrite induzida por colágeno; K/BxN - camundongo modificado geneticamente; KRN - receptor de células T transgene; g7- molécula A de MHC II humano; MHC II - complexo maior de histocompatibilidade tipo II; MRL/lpr - camundongo de ocorrência natural MRL/lpr -

A AIA em ratos foi o primeiro modelo animal a ser descrito (WHITEHOUSE, 2007) e ainda é largamente utilizada em testes pré-clínicos de novos agentes antiartríticos e muito empregada para estudar a inflamação (ALMARESTANI *et al.*, 2011; BAUEROVÁ *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 1981; PEARSON *et al.*, 1956; SNEKHALATHA *et al.*, 2012). A doença autoimune induzida é mediada por células T, apresentando semelhanças com a AR humana (YOSHINO & CLELAND, 1992; ZHANG *et al.*, 1999). O método clássico consiste na injeção intradérmica de CFA em ratos Lewis. O CFA é composto por óleo de parafina contendo mono-oleato de manitol como um surfactante em suspensão com uma micobactéria (*Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium butyricum*) morta (BILLIAU & MATTHYS, 2001). Esse modelo apresenta características conhecidas como início rápido do processo inflamatório e progressão robusta, inflamação poliarticular e intensa reabsorção óssea. Os sinais clínicos da poliartrite grave aparecem, geralmente, cerca de dez dias após injeção do CFA, porém, raramente, mantém-se após um mês (CANNON *et al.*, 1993). Preferencialmente, utiliza-se a via de imunização intradérmica, na base da cauda. No 14º dia após a imunização, além da destruição articular, torna-se mais evidente o infiltrado celular, particularmente o neutrofílico. A resposta inflamatória nesse modelo é dependente de células T e compartilha algumas características com a AR humana como: edema das extremidades, destruição das cartilagens, infiltração de linfócitos, perda de função das articulações e reabsorção óssea (CAI *et al.*, 2006).

1.6 Farmacoterapia da AR

Na terapia medicamentosa da AR são empregados os anti-inflamatórios esteroides (AIEs), os fármacos modificadores do curso da doença (FMCDs) e, em alguns casos, os anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs).

1.6.1 AIEs

Os AIEs, fármacos cujo mecanismo envolve a ligação a receptores específicos localizados no citosol das células de tecidos-alvo, exercem um efeito modulatório sobre a expressão de um grande número de genes. O efeito induzido por esses fármacos pode ser resultado da interação direta sobre sequências de DNA específicas levando a uma transativação de genes de proteínas anti-inflamatórias

ou, indiretamente, da inibição dos fatores de transcrição de genes que codificam mediadores inflamatórios como citocinas, moléculas de adesão e enzimas. Como consequência, ocorre supressão da produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão, por meio da inibição da função dos macrófagos e células apresentadoras de antígenos, inibição da desgranulação dos mastócitos, redução da produção de PGs e leucotrienos pela redução da expressão do gene para ciclooxigenase (COX-2), entre vários outros efeitos que contribuem para as marcantes atividades anti-inflamatória e imunossupressora dessa classe. Embora sejam fármacos anti-inflamatórios eficazes, a sua administração crônica frequentemente resulta em reações adversas graves como redução da densidade óssea, desequilíbrio de fluidos e eletrólitos, elevação da glicemia, imunossupressão, aumento da pressão intraocular, elevação da pressão arterial, entre outras. Essas reações adversas são fatores limitantes do uso dos AIEs no tratamento de pacientes com AR (SCHIMMER & FUNDER, 2011).

Os AIEs têm sido utilizados para tratar pacientes com AR durante mais de 60 anos, pois fornecem alívio sintomático imediato e diminuem sinais de inflamação na doença ativa. Apesar do emprego dos AIEs fazer parte da farmacoterapia da AR, existe ainda um debate considerável sobre o esquema posológico adequado e a duração do tratamento, principalmente por causa das reações adversas frequentes, e, por vezes, graves, particularmente após uso de doses elevadas (WASSENBERG *et al.*, 2011). Os efeitos amplamente conhecidos e esperados dos AIEs em pacientes com AR são a atenuação do processo inflamatório e o alívio da dor. Todavia, há evidências para indicá-los como FMCDs em associação com os demais (MOTA *et al.*, 2011). A administração de AIEs a pacientes com AR inicial retarda a progressão da doença quando avaliada por meio radiográfico, o que sustenta a definição de FMCD convencional. Além disso, no acompanhamento em longo prazo de pacientes submetidos à farmacoterapia com AIEs, verificou-se alteração favorável no curso da doença mesmo após a descontinuação do uso de tais fármacos. Considerando que qualquer FMCD deve ter atividade intrínseca que leve a melhora prognóstica em longo prazo e que possa ser utilizado por tempo suficiente para alterar o curso da doença, o investimento em pesquisas que empreguem os AIEs pode ser justificada (BIJLSMA, 2012).

Membro da classe dos AIEs, a dexametasona possui atividades anti-inflamatória e imunossupressora e tem sido alvo de investigação clínica e experimental na AR. A terapia com dexametasona em pacientes com AR conduz a um efeito rápido e clinicamente benéfico (BAE *et al.*, 2003). O aumento da produção de IL-10 pode estar envolvido no benefício clínico prolongado. O efeito imunossupressor fica mais evidente ao se constatar uma diminuição da produção de IFN- γ , o que resulta em um deslocamento relativo em relação à atividade de células T tipo 2. Avaliações *in vitro* demonstraram que essa mudança de equilíbrio das células T foi relacionada a um efeito direto induzido pela dexametasona e, portanto, independente do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (VERHOEF *et al.*, 1999).

A fim de aumentar a ação de fármacos tradicionais empregados na terapia da AR, pesquisadores têm procurado associar AIEs em baixas doses aos FMCDs, reduzindo, assim, a possibilidade de ocorrência das conhecidas reações adversas induzidas pelos AIEs. Wassenberg *et al.* (2005) demonstraram em um estudo multicêntrico, duplo-cego e controlado por placebo que uma dose reduzida de prednisolona (5 mg/dia), empregada por mais de dois anos em combinação com FMCDs padrão, metotrexato (MTX), ou sais de ouro em pacientes com AR inicial de baixo risco, foi capaz de retardar a progressão radiográfica da doença.

1.6.2 FMCDs

Os FMCDs incluem um diversificado grupo de pequenas moléculas, podendo ser agentes biológicos e não-biológicos (**Tabela 2**). O objetivo primário das terapias com FMCDs é preservar as funções das articulações, reduzindo ou prevenindo danos (BLUMBERG & FOX, 2001). Alguns desses fármacos inibem a produção de citocinas inflamatórias ou impedem a sua interação com os seus receptores. Sendo as principais citocinas inflamatórias, o TNF- α , a IL-1 e a IL-6 representam alvos de interesse terapêutico em doenças inflamatórias crônicas como a AR. Entre os fármacos biológicos, os antagonistas de TNF- α são a primeira escolha para pacientes com resposta inadequada aos FMCDs não-biológicos. Sendo os fármacos biológicos eficazes imunossupressores, existe o risco da ocorrência ou agravamento de infecções agudas ou crônicas ou reativação de infecções latentes, com consequências graves para o paciente (BERNATSKY *et al.*, 2007; HAROON &

INMAN, 2009; VASSILOPOULOS & CALABRESE, 2007). Na prática clínica, o emprego desses fármacos tem sido associado à ocorrência de algumas reações adversas graves, com custos consideráveis (KUKAR *et al.*, 2009).

Tabela 2 – FMCDs e suas respectivas classes

FÁRMACO	CLASSE
NÃO BIOLÓGICOS	
AZATIOPRINA	Inibidor da síntese de purinas
CICLOFOSFAMIDA	Agente alquilante
CICLOSPORINA	Inibidor de calcineurina
CLOROQUINA	Antimalárico e anti-reumático
HIDROXICLOROQUINA	Antimalárico e anti-reumático
LEFLUNOMIDA	Inibidor da síntese de pirimidina
METOTREXATO	Antimetabólito
MINOCICLINA	Antibiótico tetraciclina inibidor da 5-lipooxigenase
PENICILAMINA	Agente quelante e imunossupressor
SULFASSALAZINA	Salicilato
BIOLÓGICOS	
ABATACEPTE	Proteína que inibe ligação a CD80 ou CD86 da APC com CD28 da célula T
ADALIMUMABE	Anticorpo humanizado tipo IgG anti-TNF- α
ANAKINRA	Antagonista de receptor de IL-1
CERTOLIZUMABE	Fragmento Fab que se liga ao TNF- α
GOLIMUMABE	Anticorpo humanizado tipo IgG anti-TNF- α
INFLIXIMABE	Anticorpo tipo IgG anti-TNF- α
RITUXIMABE	Fab direcionado ao CD20 de células B citotóxicas

Fonte: Adaptado de GROSSER *et al.* (2011).

Se por um lado, na Lista de Medicamentos Essenciais (2011) da Organização Mundial de Saúde (OMS) os FMCDs preconizados são MTX, azatioprina, cloroquina, hidroxicloroquina, penicilamina e sulfassalazina, por outro, na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (2012) do Ministério da Saúde do Brasil tem-se, além dos fármacos preconizados pela OMS, os seguintes fármacos, classificados como componentes especializados da assistência farmacêutica: adalimumabe e infliximabe.

1.6.3 AINEs

Os AINEs são uma classe de anti-inflamatórios que apresentam atividades analgésica, antipirética e antiedema. Entre os mecanismos de ação propostos para esses fármacos está a inibição das enzimas COX-1 e COX-2, as quais estão envolvidas na produção de mediadores inflamatórios como PGs e tromboxanos (TXs) (SEIBERT *et al.*, 1994; VANE, 1971; VANE, 1996). Fármacos dessa classe são populares por causa de suas propriedades analgésicas e antiedema (BLUMBERG & FOX, 2001). Entretanto, o seu uso requer cautela devido à possibilidade de ocorrência de reações adversas como dor epigástrica, úlceras gastrintestinais, lesões renais e eventos tromboembólicos.

As lesões das mucosas gástrica e intestinal estão associadas à inibição da síntese de PGI₂ e, principalmente, PGE₂, eicosanoides envolvidos na redução da secreção ácida gástrica, no aumento da secreção de muco protetor e de bicarbonato, bem como na regeneração epitelial (KONTUREK *et al.*, 1981; ROBERTS & MORROW, 2001). Outra reação adversa relacionada ao uso dos AINEs é derivada da inibição da síntese de TXA₂, um eicosanoide indutor da vasoconstrição e da agregação plaquetária, o que resulta em aumento do tempo de sangramento e consequente hemorragia nas microvasculaturas (ROBERTS & MORROW, 2001). Os AINEs inibem a COX nos rins, reduzindo a síntese de eicosanoides vasodilatadores como as PGE₂ e PGI₂, podendo desencadear nefrite intersticial crônica, necrose tubular e insuficiência renal crônica. Essas complicações decorrem do fato de que as PGs produzidas localmente são importantes para a função renal (GAMBARO & PERAZELLA, 2003).

1.6.4 Outras estratégias terapêuticas

Além da farmacoterapia tradicional, inúmeras estratégias terapêuticas são desenvolvidas paralelamente ao conhecimento da fisiopatogênese, como, por exemplo, as intervenções que reduzam a produção de agentes oxidantes ou que apresentem a atividade antioxidante nos modelos experimentais ou na clínica. Estudos epidemiológicos têm mostrado uma associação entre uma dieta rica em antioxidantes e menor incidência de AR. Cerhan *et al.* (2003), em um estudo de coorte numa população feminina, verificaram que a ingestão de micronutrientes e antioxidantes pode ser protetora contra o desenvolvimento da AR. Também foi observada uma relação inversa entre as concentrações de antioxidantes e a magnitude da inflamação. Em modelos animais de AR, observou-se que o tratamento com compostos que apresentam atividade antioxidante atenua as alterações morfológicas e funcionais típicas da doença (HITCHON & EL-GABALAWY, 2004). Recentemente, Bauerová *et al.* (2011), investigando nova abordagem terapêutica na AR focada na regulação dos processos imune e oxidativo, demonstraram o benefício conferido por compostos antioxidantes em combinação com o MTX.

1.6.5 O Consenso Brasileiro 2012 para farmacoterapia da AR

O Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento de pacientes com AR (MOTA *et al.*, 2011) apresenta recomendações para o manejo da doença, considerando aspectos peculiares da realidade socioeconômica brasileira (Figura 1).

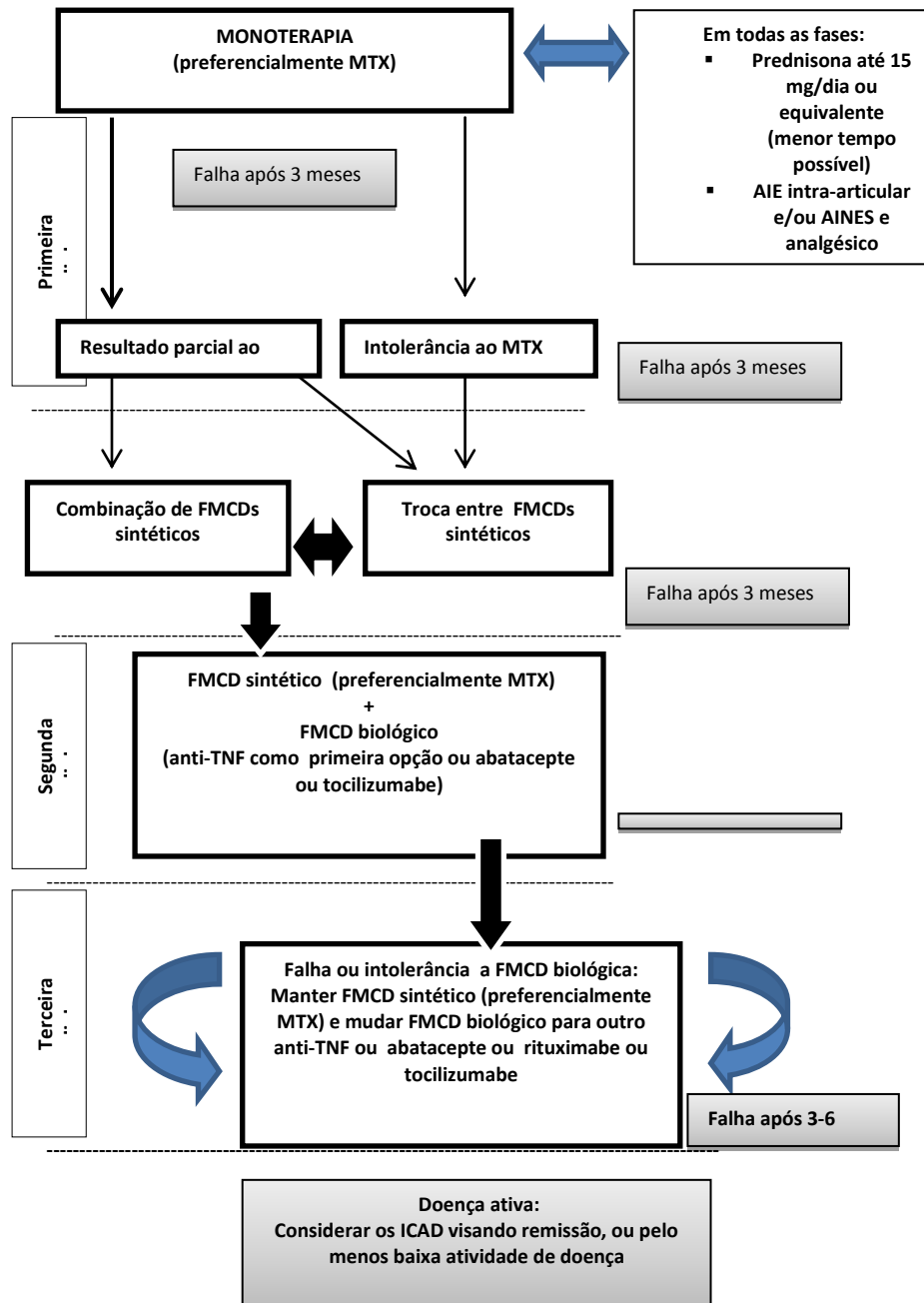


Figura 1 - Fluxograma para a farmacoterapia da AR.

Adaptado de Mota *et al.* (2011).

1.7 Reposicionamento de fármacos

O desenvolvimento de novos fármacos exige altos investimentos e longos períodos de pesquisa. A investigação de novas funções para fármacos em uso cujas informações sobre segurança e farmacocinética estejam consolidadas na literatura apresenta-se como alternativa bastante interessante, pois possibilita resultados em prazo reduzido e com custos menores. Nos últimos anos, as pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de novos fármacos apresentaram resultados insatisfatórios para compensar os consideráveis investimentos, resultando numa relação extremamente desfavorável entre custo e benefício (CHONG & SULLIVAN, 2007).

Entre os fármacos sob investigação de novas indicações estão as vitaminas do complexo B. As vitaminas do complexo B são compostos orgânicos que participam de diferentes funções metabólicas. O complexo possui onze vitaminas: tiamina, riboflavina, piridoxina, niacina, cianocobalamina, ácido fólico, ácido pantotênico, biotina, inositol, colina e ácido para-aminobenzoico. A maioria dessas vitaminas não é produzida pelo organismo humano e, além disso, por serem moléculas hidrossolúveis, o organismo tem dificuldade para armazená-las, devendo, portanto, serem ingeridas diariamente (MARCUS & COULSTON, 2001). Entre essas vitaminas, a tiamina ou riboflavina apresentaram atividade farmacológica em modelos experimentais de dor e inflamação que não estão relacionados com doenças secundárias às suas deficiências.

1.7.1 Tiamina

A tiamina é uma vitamina hidrossolúvel encontrada em fontes vegetais como ervilha, feijão, arroz integral e outros tipos de cereais e em fontes de origem animal como peixes, rins e fígados, entre outros. A estrutura química da tiamina [3-(4-amino-2-metil-5-pirimidinil)metil)-5-(2-hidroximetil)-4-cloreto de metiltiazólio] é caracterizada por uma pirimidina substituída e um anel tiazol (**Figura 2**).

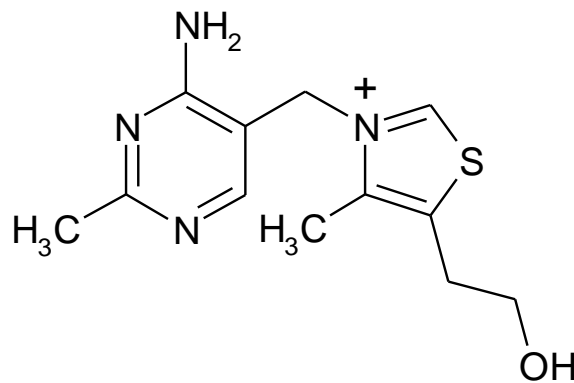


Figura 2 - Estrutura química da tiamina

Essa vitamina, sob ação da enzima tiamina pirofosfatase, origina a tiamina pirofosfato (TPP). As funções da TPP envolvem a participação como coenzima de dezenas de enzimas (**Figura 3**), entre as quais estão a piruvato desidrogenase (importante para a produção de energia no ciclo de Krebs), a transcetolase (importante para a produção de aminoácidos de cadeia ramificada e a produção e a manutenção da bainha de mielina) e a α -cetoglutarato desidrogenase (importante para a síntese de acetilcolina, ácido gama-aminobutírico e glutamato) (THIAMINE MONOGRAPH, 2003).

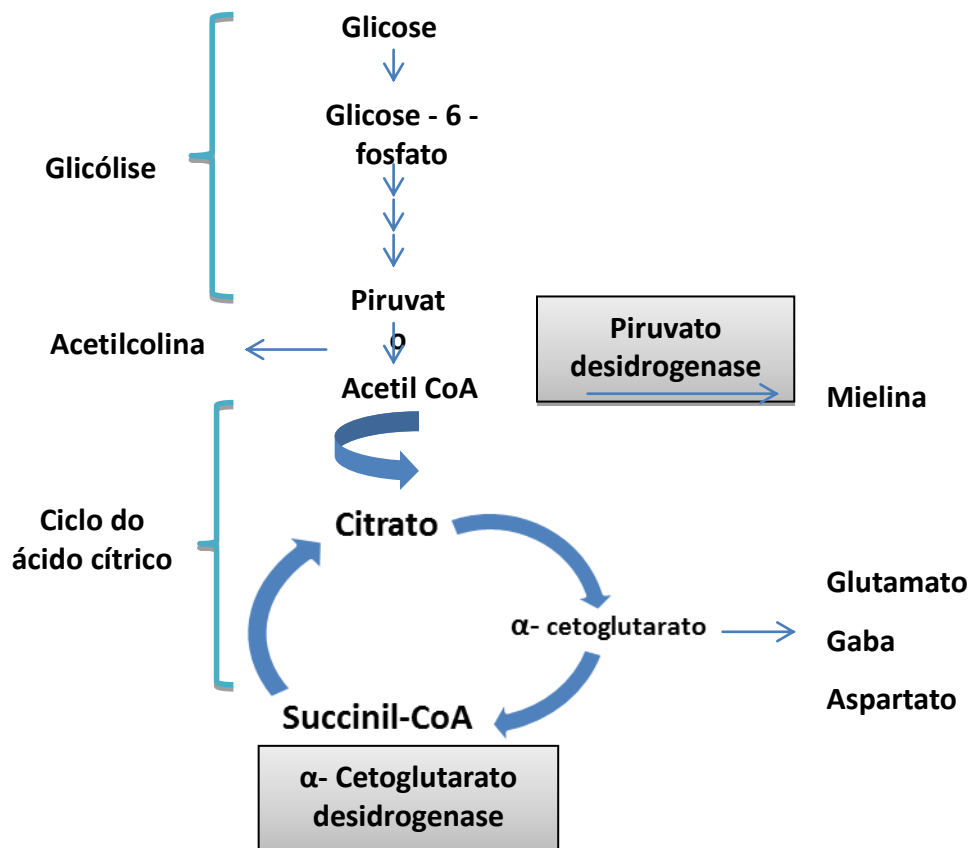


Figura 3 – Esquema indicando as funções de duas importantes enzimas dependentes da tiamina, a piruvato desidrogenase e a α -cetoglutarato desidrogenase

A deficiência da tiamina pode levar a manifestações clássicas como o beribéri ou a síndrome de Wernicke-Korsakoff (HILLMAN, 2001). Há muitas situações nas quais os indivíduos apresentam carência dessa vitamina, como dieta rica em carboidratos simples, principalmente em alimentos processados, alcoolismo, nutrição parenteral total, cirurgia gastrointestinal, infecção grave, diálise renal e uso prolongado de diuréticos, entre outras (MARTIN *et al.*, 2003; THIAMINE MONOGRAPH, 2003). Vale ressaltar que o cloridrato de tiamina (comprimido de 50 mg) está presente na lista de medicamentos essenciais da OMS. A tiamina, assim como as demais vitaminas do complexo B, apresenta-se como uma interessante alternativa de investigação experimental, uma vez que tem apresentado atividade em muitos modelos experimentais de dor e inflamação (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Síntese dos resultados de estudos que investigaram os efeitos induzidos pela tiamina em modelos experimentais de dor e inflamação.

Estudo	Modelo	Doses (mg/Kg) e vias de administração	Possíveis mecanismos	Resultados
Naik et al., 1970	Edema por carragenina Edema por formalina Formação de tecido fibrovascular	30; i.p.	Inibição de transaminases	Inibição de edema Ausência de efeito
França et al., 2001	Contorções induzidas por ácido acético Nocicepção induzida por formalina	50,100 e 200; i.p.	Inibição da síntese ou ação de mediadores inflamatórios	Efeito antinociceptivo
Wang et al., 2005	Compressão do gânglio espinhal	1, 5, 10, 33 e 100; i.p.	Inibição da condução e da excitação nervosa	Redução da hiperalgesia térmica
Caram-Salas et al., 2006	Ligação de L5 e L6 do nervo espinhal	600; s.c.	Aumento da atividade da guanilato-ciclase	Redução da alodínia mecânica
Moallem et al., 2008	Placa quente Ligação do nervo ciático Edema de orelha induzido por xileno Formação de tecido fibrovascular	50, 100, 125; i.p.	Inibição da produção de PGE ₂ , TBX ₂ e LTE ₄ Inibição da produção de histamina, PGs e/ou LT Redução da produção e inibição da ação de mediadores inflamatórios	Efeito anti-nociceptivo Efeito anti-nociceptivo Redução do edema Redução

1.7.2 Riboflavina

A riboflavina, outra vitamina hidrossolúvel, pode ser encontrada em fontes alimentares como leite, ovos, carnes, iogurte, amêndoas, queijo, soja, grãos, brócolis e outros vegetais verde-escuros (RIBOFLAVIN MONOGRAPH, 2008). A estrutura química da riboflavina (7,8-dimetil-10-ribitol-isoaloxazina) é representada por um

conjugado de um anel de isoaloxazina (flavina) com um carboidrato com cinco átomos de carbono, o ribitol (**Figura 4**).

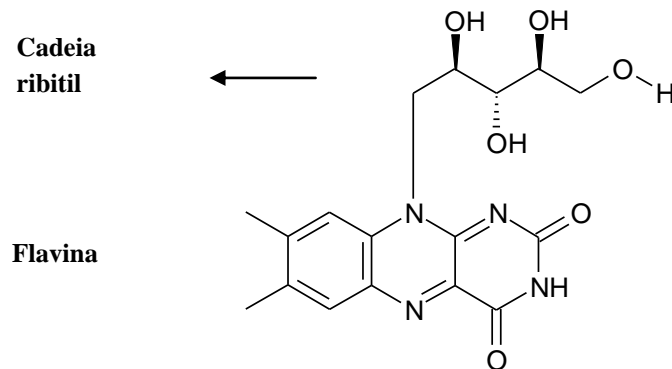


Figura 4 – Estrutura química da riboflavina

Essa vitamina possui duas formas ativas de coenzimas, a flavina mononucleotídeo (FMN) e a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (**Figura 5**), que participam de diversos processos metabólicos (MASSEY, 2000; SOUZA *et al.*, 2005). As ações antioxidantes da riboflavina estão relacionadas tanto com a sua conversão à FAD, parte integrante da enzima glutationa redutase, quanto com a atividade da enzima antioxidante NADPH citocromo P450-redutase (MASSEY, 2000; RIBOFLAVIN MONOGRAPH, 2008; SEEKAMP *et al.*, 1999).

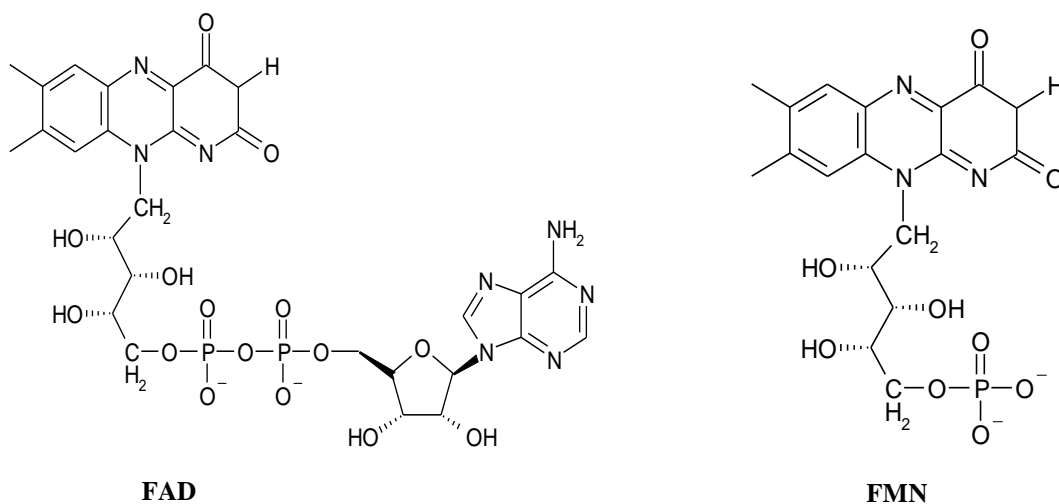


Figura 5 – Estruturas químicas da FAD e da FMN

As coenzimas FAD e FMN, das quais a riboflavina é precursora, estão presentes em diferentes enzimas mitocondriais que participam da respiração celular. Essas coenzimas atuam, por exemplo, na transferência de elétrons na cadeia respiratória. A deficiência da riboflavina pode resultar, entre outros fatores, da ingestão inadequada ou do alcoolismo e, em geral, está associada à deficiência de outras vitaminas. Além disso, alguns fármacos podem inibir o metabolismo da riboflavina, aumentar a sua eliminação e provocar a sua deficiência. Entre esses estão a clorpromazina, os antidepressivos tricíclicos (PINTO *et al.*, 1981) e o antineoplásico doxorrubicina (PINTO *et al.*, 1986). Os principais sinais e sintomas da deficiência da riboflavina são queilose, glossite, dermatite seborreica e distúrbios oculares, incluindo prurido, sensibilidade à luz e vascularização da córnea. Também podem ocorrer anemia normocítica e normocrômica e neuropatia (JORTNER *et al.*, 1987; MARCUS & COULSTON, 2001; POWERS, 2003). Assim como a tiamina, a riboflavina (comprimido 5 mg) também está presente na lista de medicamentos essenciais da OMS.

As aplicações de riboflavina em condições diferentes daquelas resultantes de sua carência no organismo humano têm sido investigadas por muitos pesquisadores. Como exemplo, destaca-se o seu uso no alívio da enxaqueca. Apesar de a enxaqueca possuir diferentes causas, em alguns pacientes é detectada uma disfunção mitocondrial no sistema nervoso central, a qual pode estar associada à ocorrência de crises (MONTAGNA *et al.*, 1994). Em alguns estudos clínicos, foi observado que elevadas doses de riboflavina induzem efeito profilático, reduzindo tanto a frequência como a duração das crises (BÖHENKE *et al.*, 2004; SCHÖENEN *et al.*, 1998). A investigação de novos usos para a riboflavina, principalmente no tratamento de pacientes com doenças inflamatórias e condições dolorosas diversas, é justificada em função dos resultados promissores obtidos em estudos pré-clínicos nos quais foram investigadas as suas atividades em modelos experimentais de dor e inflamação (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Síntese dos resultados de estudos que investigaram os efeitos induzidos pela riboflavina em modelos experimentais de dor e inflamação.

Estudo	Modelo	Doses (mg/Kg) e vias de administração	Possíveis mecanismos	Resultados
Granados-Soto et al., 2004	Edema/ carragenina	50-150;	Liberação de NO e abertura de canais de K ⁺ sensíveis ao ATP	Redução do edema
	Edema/ formalina	1-50;		Efeito antinociceptivo (hiperalgesia térmica)
	Ligação de L5 e L6 do nervo espinhal	150-600; p.o.		
Verdrengh & Tarkowski, 2005	Reação de hipersensibilidade tardia	20; i.p.	Inibição da migração granulocítica sem alterar resposta imune adquirida	Ausência de efeito
	Edema de pata por óleo de oliva			Redução
	Artrite induzida por colágeno			Ausência de efeito
Bertollo et al., 2006	Nocicepção por formalina	25, 50 e 100; i.p.	Inibição da produção ou da ação de mediadores inflamatórios.	Efeito antinociceptivo
	Placa quente			Efeito antinociceptivo
	Alodínia mecânica/ carragenina			Efeito antinociceptivo
	Alodínia mecânica/ forbol éster		Ausência de efeito	
	Edema de pata/ carragenina	50 e 100; s.c.		Redução do edema
	Edema de pata/ forbol éster		Redução do edema	
	Resposta febril			Efeito antipirético
	Migração celular			Ausência de efeito
Formação de tecido fibrovascular			Redução	

Os resultados de estudos experimentais com a tiamina e a riboflavina demonstram possibilidade do uso dessas vitaminas, isoladamente ou associadas, no tratamento de pacientes com diferentes condições dolorosas e inflamatórias. Em estudos clínicos, a associação das vitaminas tiamina, piridoxina, cianocobalamina com dexametasona induziu resultados superiores àqueles observados apenas com dexametasona no alívio da dor em pacientes com neuropatias e lombalgias (GOLDEBERG *et al.*, 2007; GOLDEBERG *et al.*, 2009; MEDINA SANTILLÁN *et al.*, 2000). No entanto, não há estudos que tenham avaliado o efeito induzido por associações de vitaminas do complexo B com AIEs em modelos experimentais de AR.

2 JUSTIFICATIVA

Modelos animais têm sido empregados no estudo da fisiopatogênese da AR e na triagem de fármacos antiartríticos. Modelos induzidos por adjuvante ou colágeno tipo II têm sido amplamente utilizados e apresentam um consolidado valor preditivo para eficácia e toxicidade (BENDELE, 2001). A caracterização de um modelo experimental de monoartrite induzida por adjuvante em ratos é relevante, pois pode permitir a investigação de mecanismos da doença e o desenvolvimento de novas abordagens farmacoterapêuticas, sem exposição dos animais a um sofrimento excessivo.

Nas abordagens terapêuticas da AR, sabe-se que, embora existam fármacos úteis para aliviar sintomas e atenuar a progressão da doença, ainda há limitações relacionadas à eficácia e à segurança (FRANCISCHI *et al.*, 2000). Uma vez que vitaminas do complexo B, como tiamina ou a riboflavina, são fármacos cujo uso clínico é aprovado e está associado à reduzida incidência de reações adversas em adultos e crianças, torna-se interessante a investigação da sua utilidade no tratamento de pacientes com AR. Os efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo induzidos por essas vitaminas foram demonstrados em diferentes modelos experimentais de inflamação aguda e algumas condições inflamatórias crônicas, porém, há poucas informações sobre os efeitos induzidos pelo tratamento prolongado com essas vitaminas, isoladas ou em associação com outros fármacos, em modelos experimentais de AR.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos induzidos pela riboflavina ou pela tiamina no modelo de monoartrite induzida por CFA em ratos Holtzman.

3.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar o modelo experimental de AR, segundo parâmetros comportamentais, histológicos e bioquímico.
2. Avaliar os efeitos induzidos pela riboflavina ou pela tiamina, isoladas ou em associação com dexametasona, sobre o edema e a alodínia mecânica no modelo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Holtzman, fêmeas, com massa entre 140 e 170 g, provenientes do biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados em sala com temperatura controlada ($27 \pm 1^\circ\text{C}$), correspondente à zona de termoneutralidade para roedores (GORDON, 1990). Os animais foram mantidos sob ciclo claro escuro (12/12 h) e ambientados por três dias anteriores à realização dos experimentos. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações para avaliação de dor experimental em animais acordados (ZIMMERMANN, 1983). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (Protocolo 42/2012).

4.2 Drogas e veículos

- Acetato de dexametasona (Sigma, EUA) – anti-inflamatório esteroide.
- Ácido nítrico (HNO_3) a 65% P.A. (Vetec, Brasil) – agente descalcificador.
- Adjuvante completo de Freund (CFA; Sigma, EUA) – agente indutor de artrite.
- Carboximetilcelulose (CMC; Sigma, EUA) – veículo para preparo de suspensões.
- Cloreto de sódio 0,9 % p/v (Sanobiol, Brasil) – veículo.
- Cloreto de sódio 0,9 % p/v injetável (Equiplax, Brasil) – veículo
- Cloridrato de cetamina a 10% (CETAMIN[®]; Syntec, Brasil) – agente anestésico.
- Cloridrato de tiamina (Sigma, EUA) – vitamina do complexo B.

- Cloridrato de xilazina a 2% (KENSOL[®]; König, Brasil) – sedativo miorreaxante e analgésico.
- Formaldeído 37 % (Synth, Brasil) – agente fixador.
- Isoflurano 2% v/v (ISOFORINE[®]; Cristália, Brasil) – anestésico.
- Riboflavina (Sigma, EUA) – vitamina do complexo B.
- Solução tampão fosfato – reagente para MPO.

4.2.1 Preparo das suspensões e intervalos de administração

- **Preparo das suspensões de riboflavina, tiamina e dexametasona**

As suspensões de riboflavina e tiamina foram preparadas em carboximetilcelulose (CMC) 0,5% p/v em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v, imediatamente antes de cada administração. O volume administrado per os (p.o) de todas as suspensões foi de 2 mL/Kg. Foram usadas as doses de 125, 250 e 500 mg/Kg de riboflavina e de 150, 300 e 600 mg/Kg de tiamina.

A suspensão de dexametasona foi preparada em CMC 0,5% p/v em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v, imediatamente antes das administrações. O volume e a via de administração foram idênticos aos das vitaminas. A dose padronizada foi de 0,5 mg/Kg.

- **Preparo da solução anestésica**

As duas soluções contendo cetamina 10% e xilazina 2% m/v foram misturadas numa proporção que permitisse administração única de uma dose de 100 e 10 mg/kg, respectivamente. O volume injetado por via intraperitoneal (i.p.) de 1 mL/kg foi usado para efeito anestésico.

- **Preparo da solução tampão fostato**

7,8 g de fosfato de sódio tribásico (Na_3PO_4) foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada. Acertou-se o pH para 5,4. Acrescentaram-se 5 g de brometo de hexa-1,6-bisdeciltrimetilamônio e a solução foi armazenada em frasco âmbar.

- **Intervalos de administração das vitaminas e dexametasona**

O esquema de tratamento consistiu em duas administrações diárias (08:00 e 12:00 h), com intervalo de 4 h, no período de 21 dias. Nos protocolos para avaliação do efeito induzido pela riboflavina ou pela tiamina sobre a resposta nociceptiva e o edema de pata, a avaliação comportamental foi realizada 2 h após a segunda administração, seguida pela avaliação do edema.

A dexametasona foi administrada a cada três dias, a partir da segunda injeção de CFA, uma vez por dia e em horário correspondente ao da primeira administração das vitaminas. A avaliação comportamental foi realizada 6 h após a administração, seguida pela avaliação do edema e da massa corporal.

4.3 Caracterização do modelo experimental de AR induzida por CFA

O protocolo para indução da AR utilizado foi idêntico àquele descrito por Helyes *et al.* (2004), sendo que no nosso estudo foram usados ratos Holtzman fêmeas, enquanto no estudo de Helyes *et al.* (2004) foram usados ratos Lewis machos. Inicialmente, os animais foram anestesiados com isoflurano e contidos manualmente. Em seguida, foram feitas a tricotomia da base da cauda e a assepsia da região com álcool a 70%. Com auxílio de uma seringa de 1 mL acoplada a uma agulha 20 x 0,55 mm, procedeu-se à injeção intradérmica (i.d.) de 0,1 mL de CFA na base da cauda, lateral esquerda. Em seguida, foi feita a injeção intraplantar (i.pl.) de 0,1 mL de CFA na pata posterior direita. Após cada injeção, um período de aproximadamente 10 s foi aguardado antes da retirada da agulha, a fim de evitar o efluxo do líquido injetado. No dia seguinte, os animais foram submetidos ao mesmo

procedimento de anestesia descrito acima, a fim de realizar a segunda injeção i.d. de 0,1 mL de CFA na base da cauda, lateral direita. O grupo controle foi submetido aos mesmos procedimentos, sendo o CFA substituído por volume correspondente de salina estéril.

- **Períodos de avaliação dos parâmetros comportamentais, histológicos e bioquímico**

Nos protocolos nos quais foram avaliados os parâmetros comportamentais, inflamatórios e a variação da massa corporal, o curso temporal estabelecido foi de 21 dias após as injeções, com avaliações a cada três dias após a última injeção de CFA.

Nos protocolos nos quais foram avaliados os parâmetros radiológico, histológico e bioquímico, a avaliação radiológica e as coletas de material (pata e tecido periarticular) foram realizadas nos dias 7, 14 e 21 após a última injeção de CFA.

4.4 Avaliação da alodínia mecânica

A alodínia mecânica foi avaliada por meio do teste de pressão crescente na pata. Para realização desse procedimento, foi usado um analgesímetro digital (Modelo EFF 301, Insight, Brasil). Nos dois dias que antecederam os experimentos, os animais foram colocados em compartimentos de acrílico (22 x 18 x 14 cm) dispostos sobre um suporte que possui como base uma tela metálica. Nos dias de avaliação experimental, após nova ambientação, foi realizada a estimulação mecânica por meio do uso do analgesímetro. Uma ponteira descartável de polipropileno de 0,5 mm de diâmetro, acoplada a um braço transdutor (faixa: 0,1 a 1000 g, ou aproximadamente 0,1 a 10 N), foi aplicada perpendicularmente ao centro da superfície plantar da pata posterior dos animais. O estímulo aplicado pelo experimentador, gradualmente de baixo para cima, provoca a resposta de retirada da pata que é caracterizada como uma flexão súbita. Foram aplicados cinco estímulos na pata de cada animal e os limiares registrados. Os limiares extremos foram eliminados e os três outros foram usados para obtenção da média do limiar de

retirada de pata (**Figura 6**). A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de modo que as médias dos limiares dos diferentes grupos experimentais fossem similares.

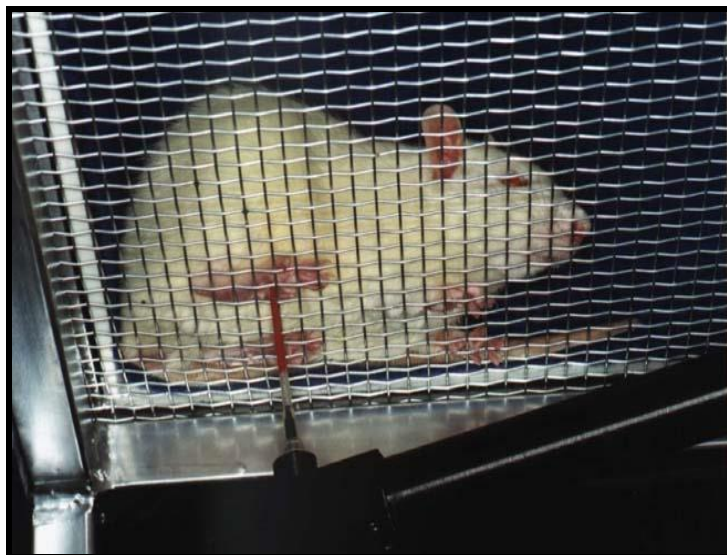


Figura 6 - Aparato utilizado para a avaliação da alodínia mecânica

4.5 Avaliação do edema de pata

Para a determinação do volume de pata foi utilizado um pletismômetro (Modelo 7140, Ugo Basile, Itália). Esse aparelho contém uma célula cilíndrica para a medida do volume de pata, preenchida com uma solução de baixa concentração eletrolítica, conectada a outra célula, dentro da qual existe um eletrodo. Um sistema de vasos comunicantes faz com que o deslocamento da solução eletrolítica na célula onde a pata do animal é mergulhada resulte em um deslocamento da solução na célula que contém o eletrodo. Após ter sido calibrado, o aparelho converte o deslocamento do líquido em volume, que é indicado em um visor digital. Quando a pata do animal é introduzida na célula de medida até a articulação tíbio-társica, um pedal é pressionado pelo experimentador, que permite fixar o valor do volume observado (**Figura 7**).

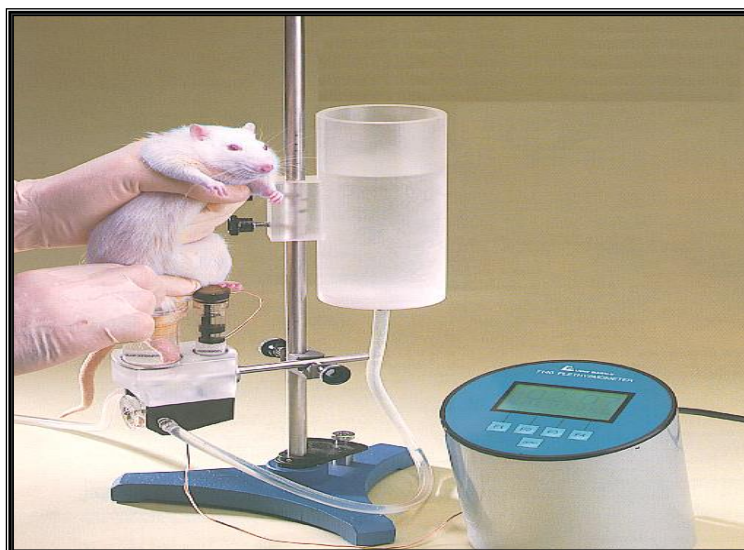


Figura 7 - Aparato utilizado para a avaliação do edema de pata.

4.6 Avaliação da temperatura corporal

A temperatura corporal foi avaliada por meio de sensores (SubCue Datalogger, Calgary, Canadá) que possuem uma massa aproximada de 2,4 g, diâmetro de 1,3 cm e espessura de 0,5 cm. Um dia antes do implante dos sensores na cavidade abdominal, os mesmos foram programados para registrar as temperaturas de hora em hora, utilizando-se o programa SubCue Analyzer.

Nesse protocolo, 12 animais foram distribuídos entre dois grupos (experimental e controle) de acordo com suas massas corporais, de modo que as médias das massas dos grupos fossem próximas. Os animais previamente ambientados na sala experimental foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via i.p. A superfície abdominal foi tricotomizada e, em seguida, foi aplicada solução de PVPI (1% de iodo ativo) para antissepsia da pele. Procedeu-se a laparotomia para inserção do sensor de temperatura na cavidade abdominal dos animais. Após o processo cirúrgico, os animais permaneceram em gaiolas individuais por, no mínimo, sete dias, para permitir a recuperação pós-cirurgia. Nesse intervalo, os mesmos foram monitorados pelo experimentador, quanto à

cicatrização, a fim de se excluir qualquer processo infeccioso decorrente da cirurgia de implante dos sensores.

Após o período supracitado, seis animais foram injetados com CFA e seis com salina estéril, conforme protocolo de padronização. As injeções foram feitas entre 16:00 - 17:00 h, antes do início do período noturno. Na avaliação durante as 24 h após as duas primeiras injeções, os resultados foram expressos como médias de cada grupo em cada hora. Na avaliação durante os 21 dias após a terceira injeção, as temperaturas foram registradas a cada 60 min. Os resultados diários foram expressos como as médias das temperaturas registradas nos períodos diurno e noturno em cada grupo. Os animais foram mantidos durante esse período em sala com temperatura e acesso controlados. Toda manipulação foi feita pelo mesmo experimentador e com igual cuidado tanto na troca de maravalha quanto na reposição de ração e água.

4.7 Avaliação radiológica

As radiografias foram realizadas no setor de radiologia do Hospital Veterinário da UFMG. Foram obtidas radiografias das patas posteriores nas projeções crânio-caudal (CC) e médio-lateral (ML), 7, 14 e 21 dias após a última injeção de CFA (n=6) ou veículo (n=6). Para realização das radiografias, foi utilizado o aparelho de raio X 500 MÅ (VMI, BRASIL) e cassete radiográfico (24 x 30 cm), operado pelo responsável técnico do setor. Todos os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via i.p. Em seguida, foram posicionados sobre o cassete em decúbito dorsal (projeção CC) e decúbito lateral direito (projeção ML). O tempo de exposição foi de 0,04 segundos, com 50 mÅ e 40 KeV.

4.8 Avaliação histológica

Os procedimentos utilizados para se obterem os preparados histológicos para exame microscópico foram: coleta do material, fixação, clivagem, processamento, microtomia (corte) e coloração. Os animais de ambos os grupos receberam injeção i.p. de cetamina (150 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg), doses que induzem eutanásia. As articulações tíbio-társicas da pata posterior direita foram coletadas nos dias 7, 14 e 21 após as injeções de CFA ou veículo e fixadas em solução de formol tamponado a 10 %, durante 72 h. O tecido a ser fixado foi imerso, imediatamente após a sua retirada, em uma cuba contendo 2 L de solução de formol tamponado a 10 %, para que houvesse uma relação adequada do volume do fixador em relação ao tamanho do espécime utilizado.

Após esse período, procedeu-se à etapa de descalcificação química com HNO₃ a 5 % (CARVALHO *et al.*, 2008) por quatro a cinco dias, sendo que o intervalo de troca da solução foi de dois dias. O período de descalcificação foi determinado pelo teste diário com auxílio de uma agulha descartável 13 x 0,45 mm. A transfixão da agulha na região mais distal da tíbia determinou o término da descalcificação. As amostras, previamente lavadas com água, foram cortadas longitudinalmente com auxílio de navalhas descartáveis. Após esse processo, cada amostra foi transferida para cassetes identificados com numeração registrada anteriormente e mantidas sob fluxo contínuo de água durante 2 h. Em seguida, os cassetes foram armazenados em solução-tampão de formol 10 % até a realização das etapas subsequentes. O processo consistiu em três etapas: desidratação com álcool etílico (70-80-90-95-100 %; 1 h para cada concentração), clarificação com xilol I, II e III (1 h para cada concentração) e inclusão em parafina I, II e III (2 h, 12 h e 2 h, para cada tipo de parafina). Por fim, procedeu-se à confecção dos cortes (3-4 µm) em um micrótomo e, em seguida, a coloração com hematoxilina e eosina. O protocolo de avaliação histológica utilizado foi adaptado de Brenner *et al.* (2005). Secções das articulações foram analisadas por um avaliador que não conhecia os tratamentos, segundo os parâmetros: paniculite e inflamação periarticular, sinovite e neoangiogênese sinovial. A classificação das alterações foi definida quanto à intensidade, seguindo os escores: Paniculite: ausente (0); leve (1); leve à moderada (2); moderada (3);

moderada à intensa (4); intensa (5). Sinovite: ausente (0); leve (0,5); leve à moderada (1); moderada (1,5); moderada à intensa (2); intensa (2,5). Neoangiogênese sinovial: ausente (0); leve (1); leve à moderada (2); moderada (3); moderada à intensa (4).

4.9 Análise bioquímica: determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A extensão do acúmulo de neutrófilos na pata direita posterior foi medida por meio do ensaio da atividade da MPO. Os tecidos das patas direitas dos grupos experimentais foram coletados nos dias 7, 14 e 21 após as injeções de CFA ou salina e mantidos em freezer a -70 °C até o dia do ensaio. Os tecidos foram homogeneizados com um triturador e centrifugados por 10 min a 4 °C e 10.000 rpm e o sedimento foi separado para análise da MPO. Ao sedimento, foi adicionado 1,9 mL da solução de tampão para cada 100 mg de tecido. Uma nova homogeneização foi realizada e a amostra foi armazenada no freezer a -70 °C. No dia posterior, cada amostra foi submetida a três ciclos de congelamento/descongelamento, usando nitrogênio líquido. Após esses ciclos, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 4 °C e 10.000 rpm e os sobrenadantes obtidos foram diluídos (1:5) no tampão. O ensaio foi realizado em placa de microtitulação de 96 poços. Nos primeiros dois poços, foram adicionados 25 µL de tampão (branco). Nos outros poços, foram adicionados, em duplicata, 25 µL das amostras diluídas. Após o preenchimento da placa com todas as amostras, foram adicionados 25 µL da solução 3,3',5,5',-tetrametilbenzidina em cada poço e a placa foi incubada a 37 °C por 5 min. Após esse intervalo, foram adicionados 100 µL da solução de água oxigenada 0,002% em cada poço e a placa foi incubada novamente a 37 °C por 5 min. Para finalizar, foram adicionados 100 µL de ácido sulfúrico (1 M) em cada poço. A atividade da MPO foi calculada de acordo com a alteração da densidade óptica avaliada em leitor de ELISA usando o comprimento de onda de 450 nm. Os valores obtidos foram normalizados em função de uma curva padrão de neutrófilos previamente preparada e os resultados foram expressos em unidade relativa.

4.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. O teste “t” não pareado foi utilizado para comparação entre duas médias, admitindo diferença significativa a partir de $p < 0,05$. Os dados foram analisados por meio da análise de variância simples, seguida do teste de Newman-Keuls. Nos resultados de febre foi realizada análise de variância, seguida do teste de Bonferroni. Adotou-se um nível de significância de 5%. A análise estatística e apresentação gráfica dos resultados foram feitas por meio do programa Graphic Prism 5.0 (San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do modelo experimental de AR

5.1.1 Avaliação da alodínia mecânica, do edema de pata, da temperatura corporal e da massa corporal

Conforme esquema descrito na seção Materiais e Métodos, a alodínia mecânica, o edema de pata e a variação da massa corporal foram avaliados a cada três dias, durante um período de 21 dias, em dois grupos de animais, um que recebeu as injeções de CFA e outro que recebeu as injeções de salina.

As injeções de CFA induziram redução do limiar nociceptivo (**Figura 8**) e aumento significativo do volume da pata posterior direita (**Figura 9**), sem alterar o aumento de massa corporal durante o período avaliado (**Figura 10**). O edema de pata foi máximo no terceiro dia após as injeções de CFA ($0,71 \pm 0,05$ mL), mantendo-se evidente durante todo o período de observação. A alodínia mecânica, de forma semelhante ao edema de pata, também foi observada a partir do terceiro dia das injeções de CFA ($18,73 \pm 1,22$ g), mantendo-se até o final do período de observação. O grupo controle, que recebeu as injeções de salina, apresentou alterações mínimas e não significativas do volume de pata e da sensibilidade ao estímulo mecânico durante o período de avaliação. As massas corporais iniciais do grupo experimental e do grupo controle foram $132,0 \pm 3,4$ g e $132,0 \pm 3,1$ g, respectivamente. No último dia de observação, as massas dos dois grupos foram $189,5 \pm 4,5$ g e $190,5 \pm 3,7$ g, respectivamente, indicando que as injeções de CFA não alteraram de forma significativa o aumento da massa corporal durante o período.

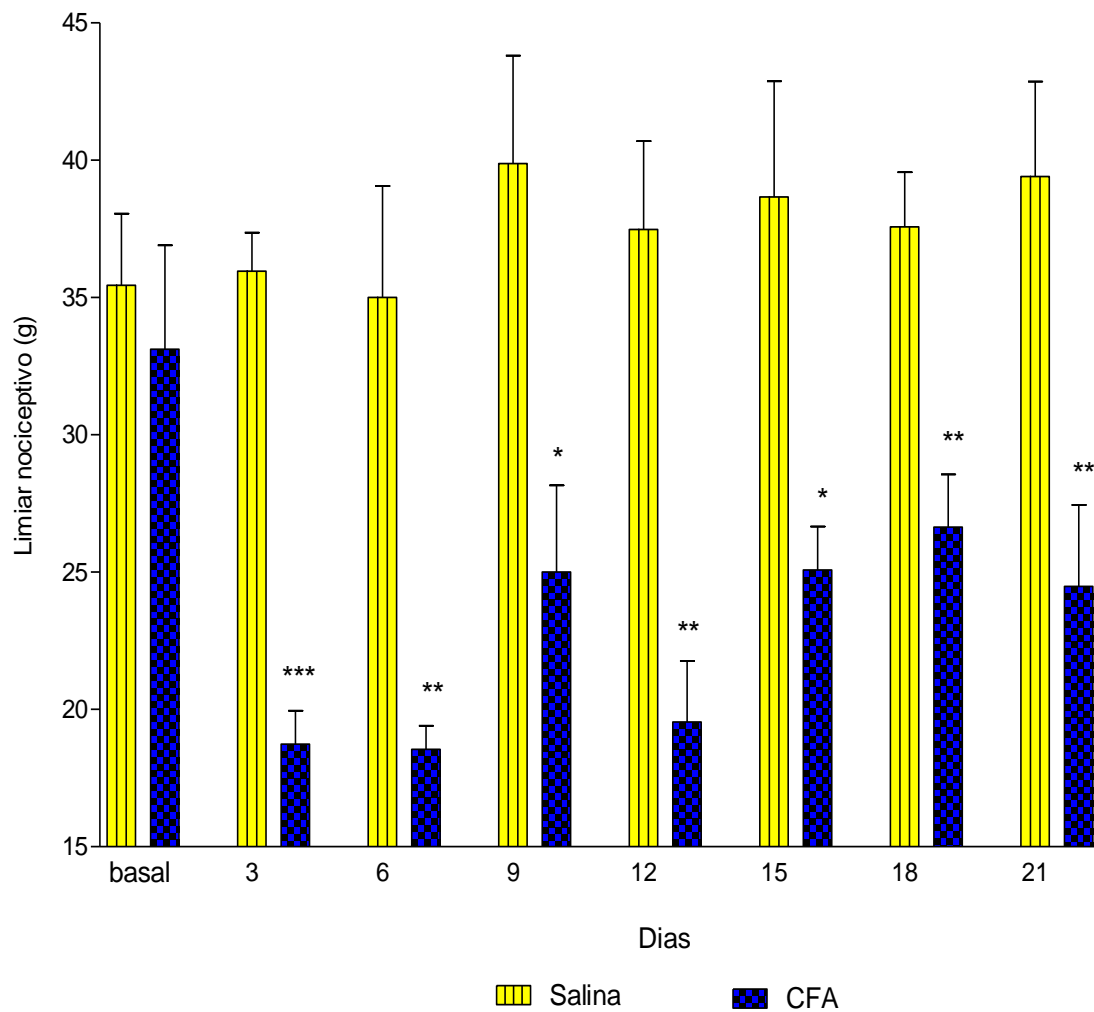


Figura 8 – Efeito induzido pelas administrações de CFA (100 μ L, 1 mg/mL) ou salina sobre o limiar nociceptivo mecânico. *, ** e *** Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle injetado com salina ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente; $n=6$).

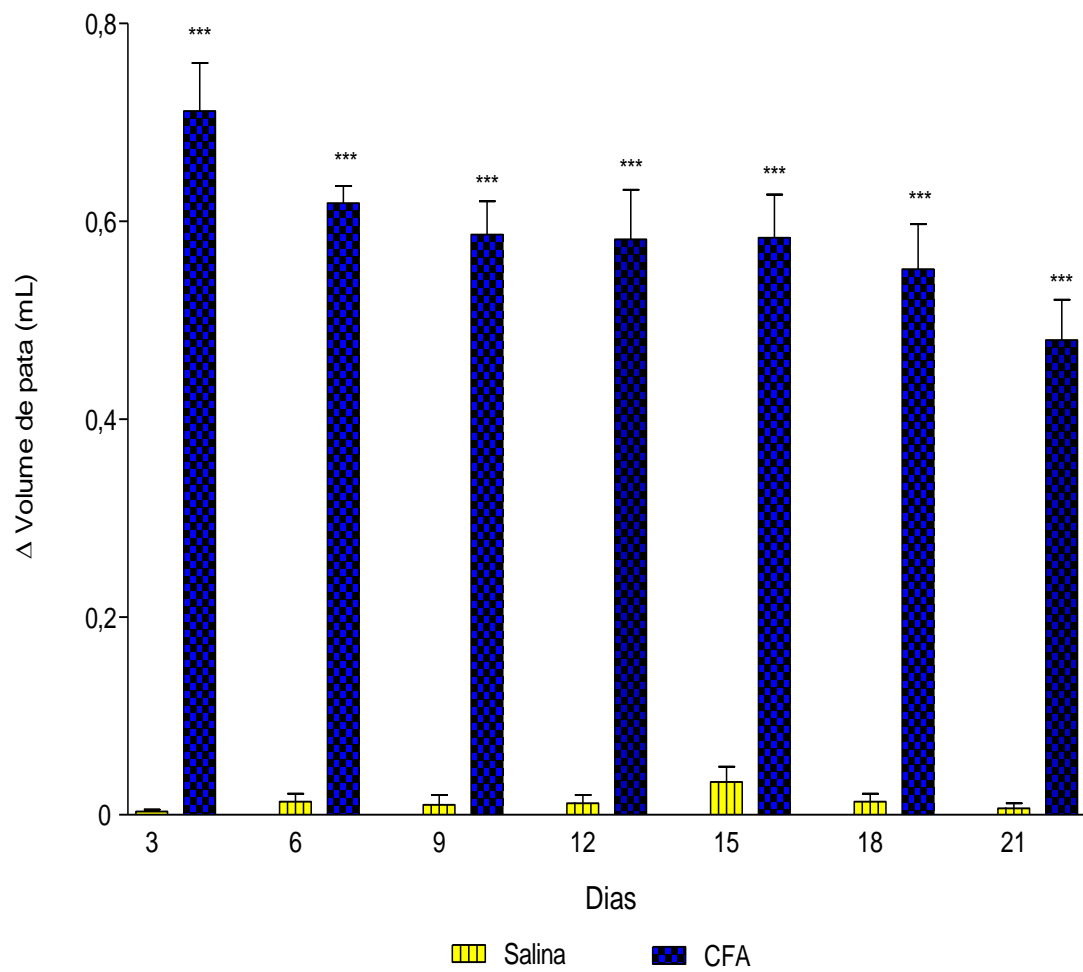


Figura 9 – Efeito induzido pelas administrações de CFA (100 μ L, 1 mg/mL) ou salina sobre o volume de pata. *** Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle injetado com salina ($p < 0,001$; $n = 6$).

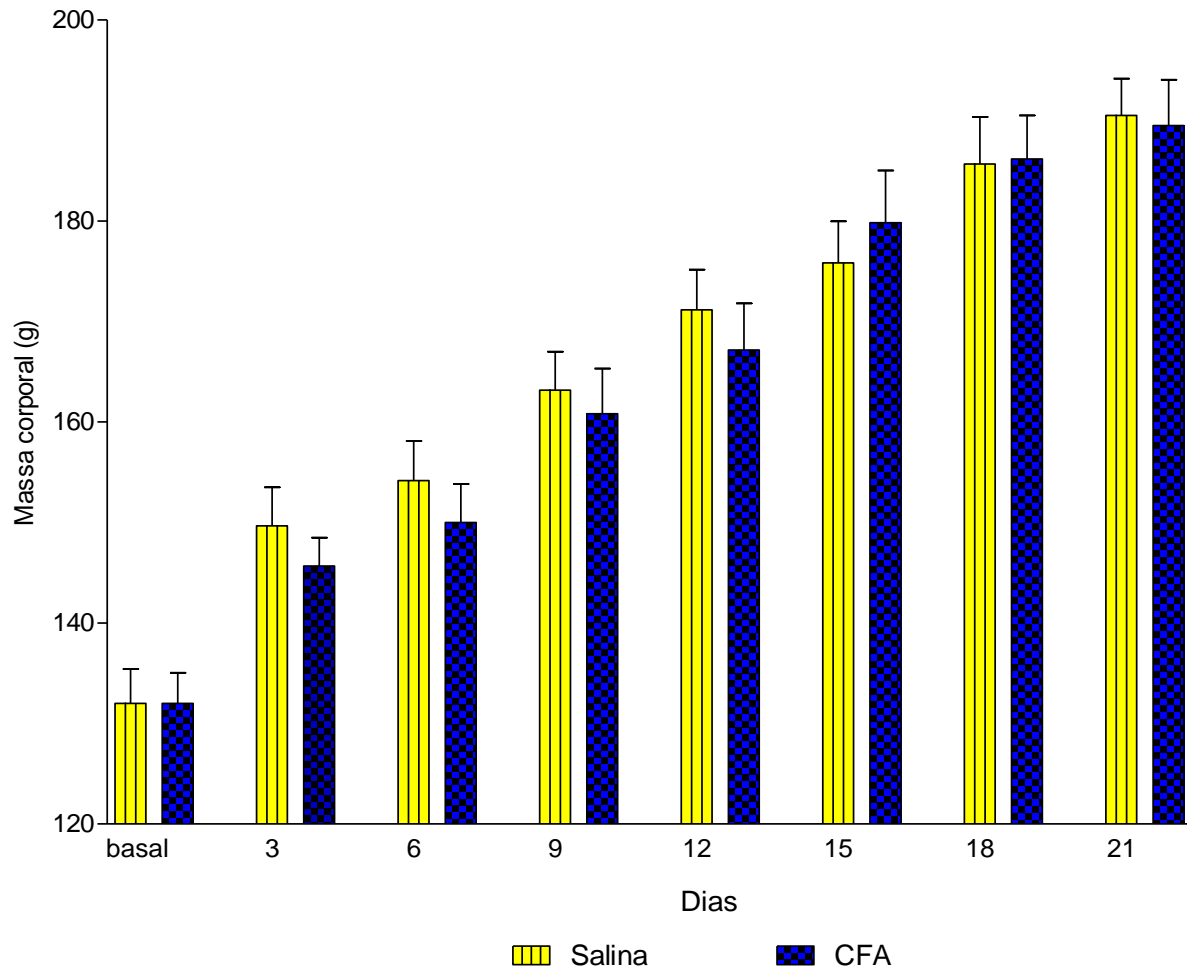


Figura 10 – Efeito induzido pelas administrações de CFA (100 μ L, 1 mg/mL) ou salina sobre a massa corporal (n=6).

Conforme esquema descrito na seção Materiais e Métodos, a temperatura corporal foi inicialmente registrada a cada hora, durante 24 h após as duas primeiras injeções de CFA ou salina (**Figura 11**). Após esse período, a temperatura foi registrada a cada hora durante 21 dias e os resultados expressos como médias diárias dos períodos diurno e noturno em cada grupo (**Figura 12**). Um aumento significativo da temperatura corporal dos animais tratados com CFA só foi observado entre 7 e 17 h após as duas primeiras injeções do estímulo inflamatório, sendo que após esse período, durante os 21 dias de observação, os dois grupos (experimental e controle) mantiveram as temperaturas corporais, sejam diurnas ou noturnas, muito próximas sem apresentar diferenças estatisticamente significativas.

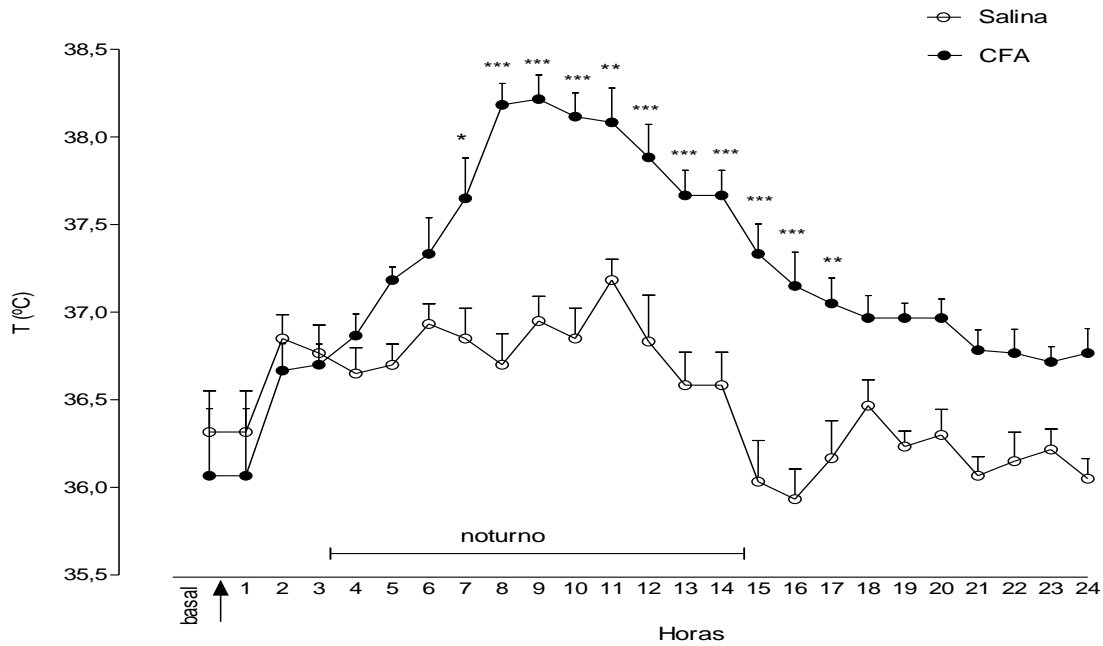


Figura 11 – Efeito induzido pelas duas primeiras injeções de CFA (100 μ L, 1 mg/mL) ou salina sobre a temperatura corporal durante 24 h. *, ** e *** Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle injetado com salina ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente; $n=6$).

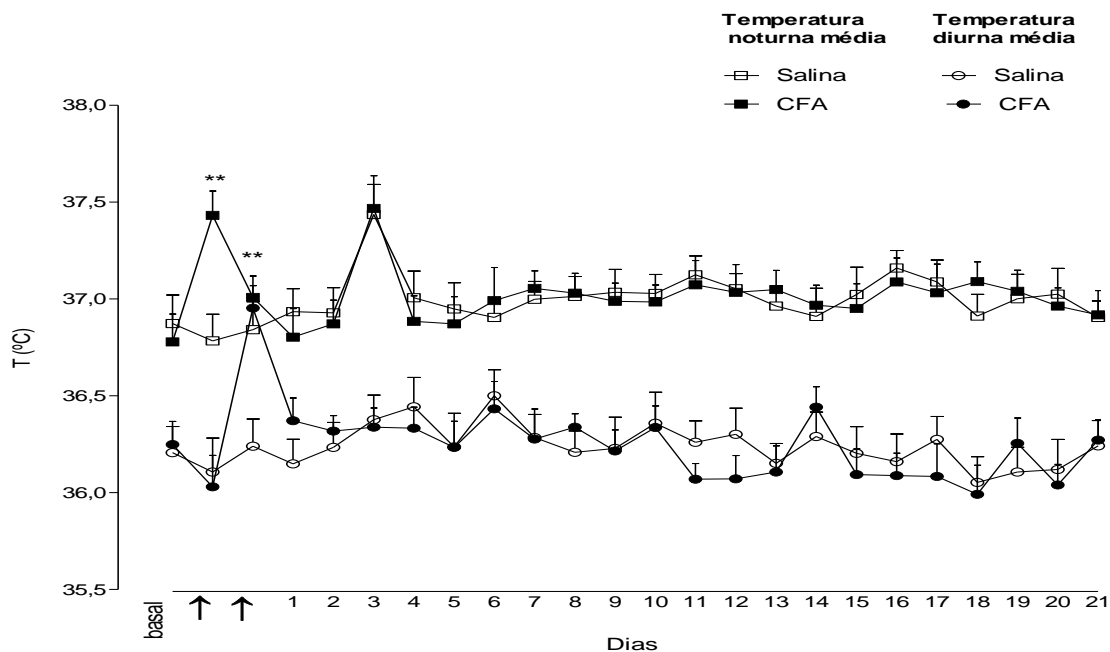


Figura 12 – Efeito induzido pelas três injeções de CFA (100 μ L, 1 mg/mL) ou salina sobre as temperaturas corporais diurna e noturna durante o período de 21 dias. ** Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle injetado com salina ($p < 0,01$; $n=6$).

5.1.2 Avaliação da alodínia mecânica e do edema nas patas ipsi e contralateral

Com o objetivo de investigar se as injeções de CFA, como realizadas no presente estudo, resultaram em um modelo experimental de mono ou poliartrite, foi feito um experimento no qual a sensibilidade ao estímulo mecânico e o volume foram avaliados em ambas as patas posteriores (ipsi e contralateral). Nesse experimento, os parâmetros foram avaliados diariamente até o terceiro dia, com o objetivo de investigar de forma mais precisa as alterações iniciais induzidas pelo CFA, e, após esse período, de três em três dias, até o 21^o dia.

De forma semelhante ao observado em protocolo anterior, as administrações de CFA reduziram o limiar nociceptivo (**Figura 13**) e induziram edema na pata ipsilateral (**Figura 14**). Entretanto, essas alterações não foram observadas na pata contralateral. Durante o período de avaliação, os limiares nociceptivos determinados nas patas ipsilaterais dos animais que receberam as injeções de CFA sempre foram inferiores a 25,00 g, alcançando o valor mínimo de $11,50 \pm 1,52$ g no 12^o dia após as injeções do estímulo inflamatório. Por outro lado, no mesmo período, os limiares nociceptivos determinados nas patas contralaterais desses mesmos animais sempre foram superiores a 37,00 g, alcançando o valor máximo de $54,40 \pm 4,03$ g no dia seguinte à última injeção de CFA. Em relação ao edema de pata, os valores nas patas ipsilaterais sempre foram superiores a 0,5 mL, alcançando o valor máximo de $0,85 \pm 0,05$ mL no terceiro dia após a terceira injeção de CFA. Essa resposta, entretanto, não foi verificada na pata contralateral, que apresentou elevação máxima do volume de $0,09 \pm 0,03$ mL no nono dia do período de observação. Finalmente, confirmando os resultados de protocolo anterior, os animais que receberam as três injeções de CFA apresentaram um aumento da massa corporal semelhante àquele observado nos animais que receberam as injeções de salina (**Figura 15**).

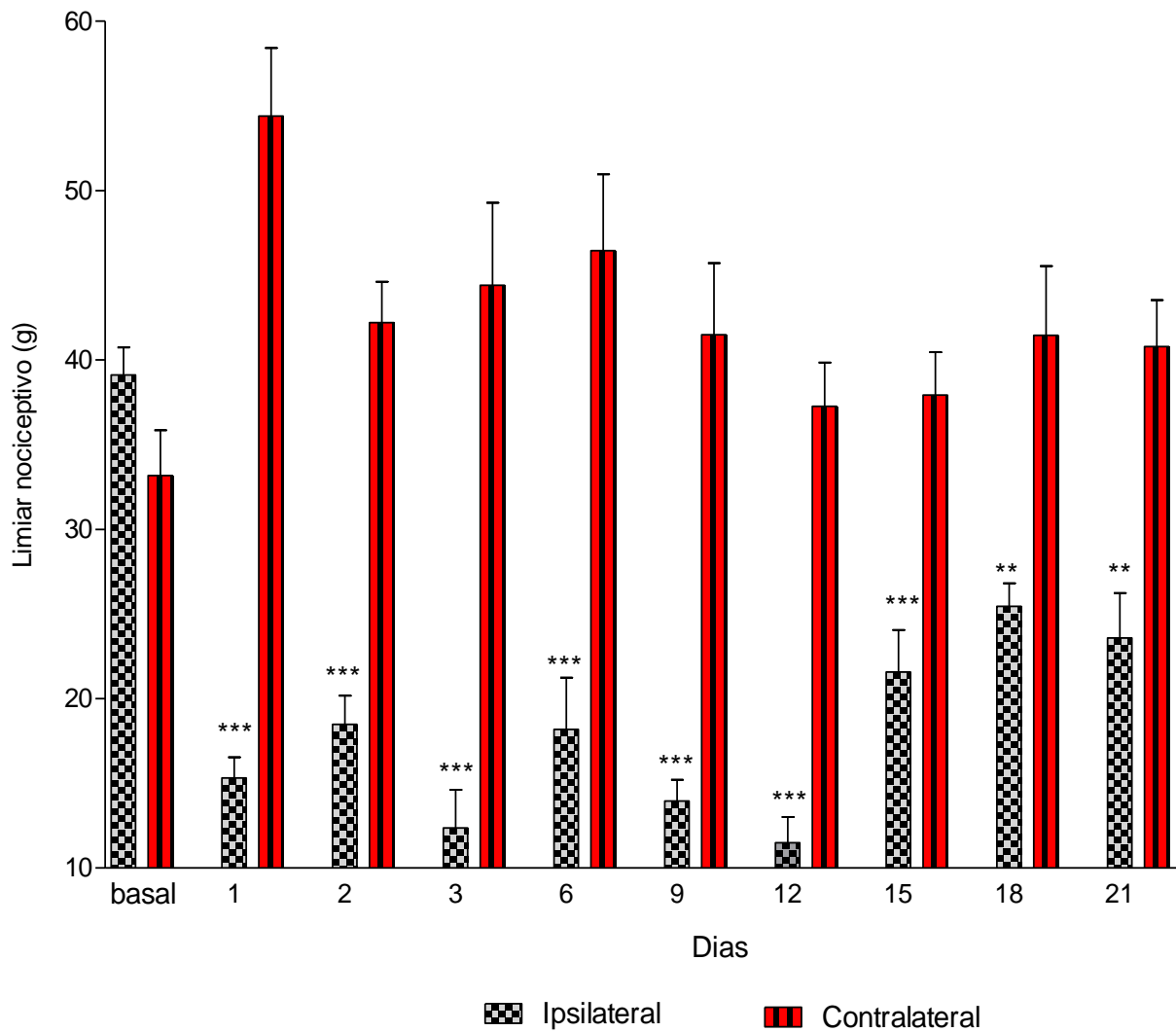


Figura 13 – Efeito induzido pelas injeções de CFA (100 μ L, 1 mg/mL) sobre o limiar nociceptivo mecânico nas patas ipsilateral e contralateral. ** e *** Diferença estatisticamente significativa em relação à pata contralateral ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente; $n=6$).

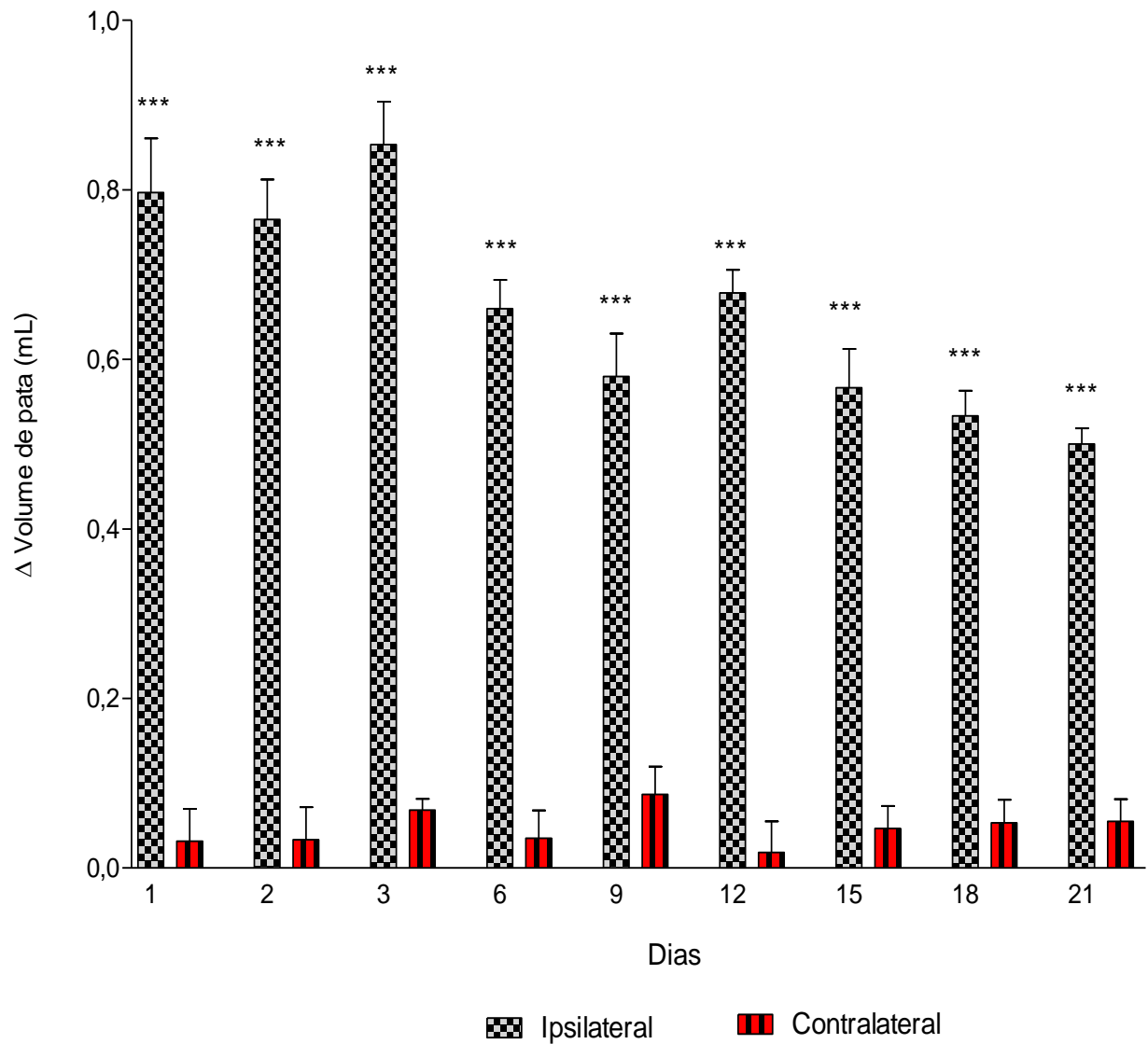


Figura 14 - Efeito induzido pelas injeções de CFA (100 μ L, 1 mg/mL) sobre o volume das patas ipsilateral e contralateral. *** Diferença estatisticamente significativa em relação à pata contralateral ($p < 0,001$; $n = 6$).

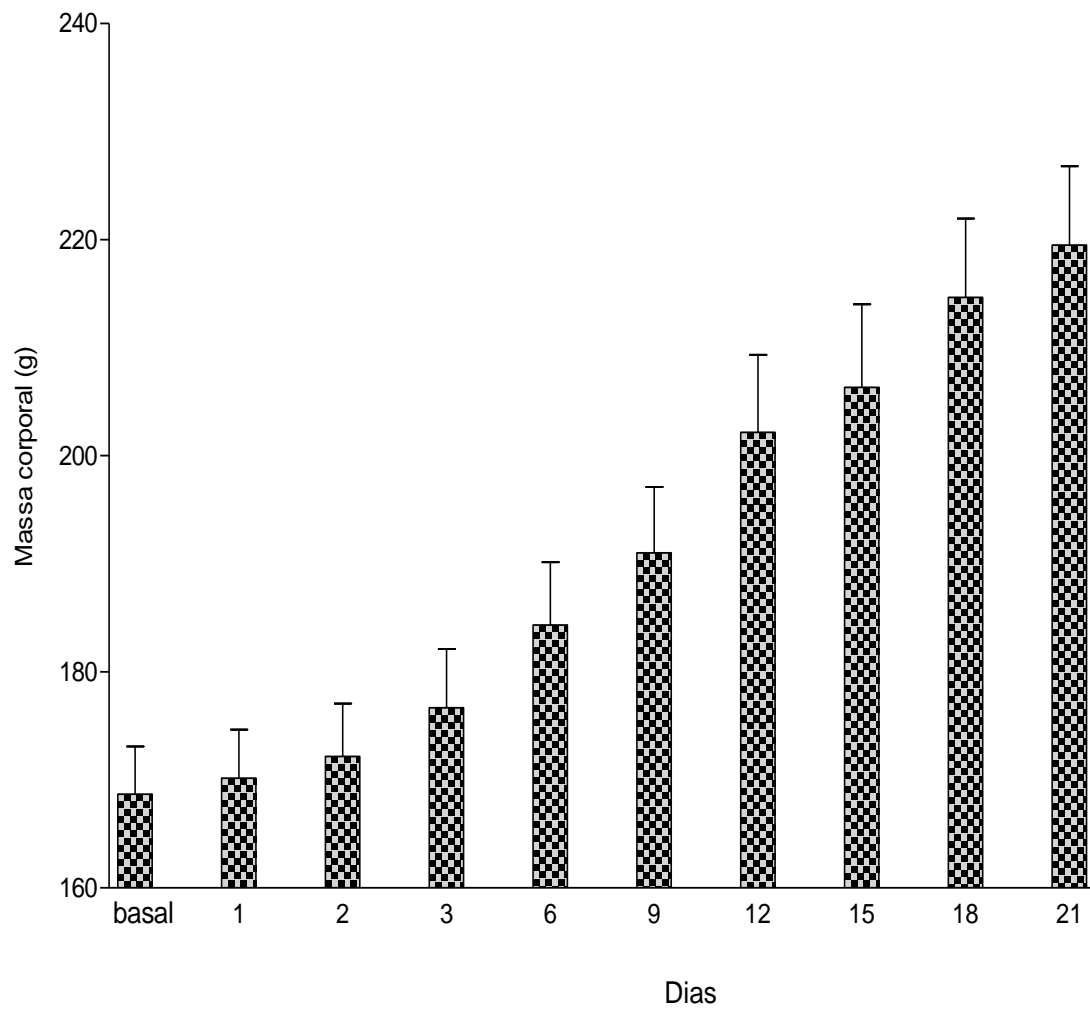


Figura 15 – Efeito induzido pelas injeções de CFA (100 μ L, 1 mg/mL) sobre a massa corporal (n=6).

5.1.3 Análises radiológica, histológica e bioquímica

Após a avaliação dos cursos temporais da alodínia mecânica, do edema de pata e da resposta febril induzidos pelas injeções de CFA, foram avaliados alguns parâmetros histológicos e bioquímico. Esses parâmetros foram avaliados 7, 14 e 21 dias após as injeções de CFA, de forma a obter informações sobre alterações teciduais e moleculares que pudessem ocorrer durante todo o curso temporal da resposta inflamatória.

O grupo controle, injetado com salina, não apresentou alterações evidentes nas avaliações macroscópicas, histológicas e radiográficas (**Figuras 16, 18 e 20**). Entretanto, em animais injetados com CFA foi observado pronunciado edema do tecido periarticular na pata ipsilateral nos diferentes momentos das avaliações (**Figuras 17 e 19**). Alterações do espaço articular, erosões ósseas ou de cartilagens da articulação tíbio-társica não foram observadas. A avaliação histológica demonstrou paniculite persistente e de alta magnitude durante todo o curso temporal. As alterações da sinóvia da articulação tíbio-társica, como a sinovite e a angiogênese, apresentaram-se discretas no sétimo dia após indução e, leves a moderadas no 14º dia. No 21º dia, não foram observadas alterações das mesmas. A neoangiogênese foi observada nos três momentos, com magnitudes que variavam de leve a moderada (**Figura 20**).

Alterações de alguns parâmetros bioquímicos também foram observadas após as injeções de CFA. A atividade da enzima MPO na pata dos animais injetados com CFA apresentou-se aumentada quando comparada com aquela observada no grupo controle somente no 21º dia (**Figura 22**).

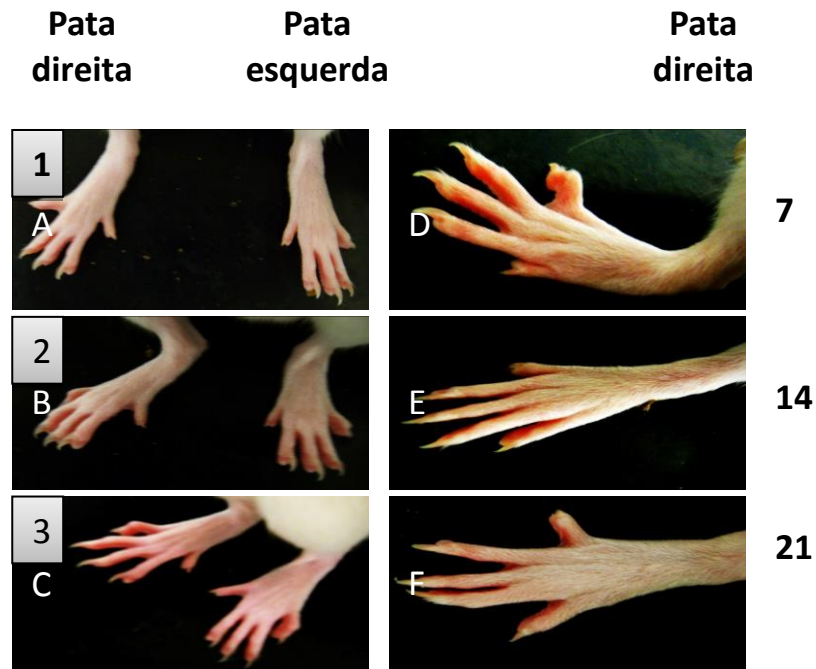


Figura 16 – Fotografias das patas posteriores (ipsilateral e contralateral – A, B e C; ipsilateral em maior aumento – D, E e F) de três animais, obtidas 7, 14 e 21 dias após as injeções de salina na pata direita.

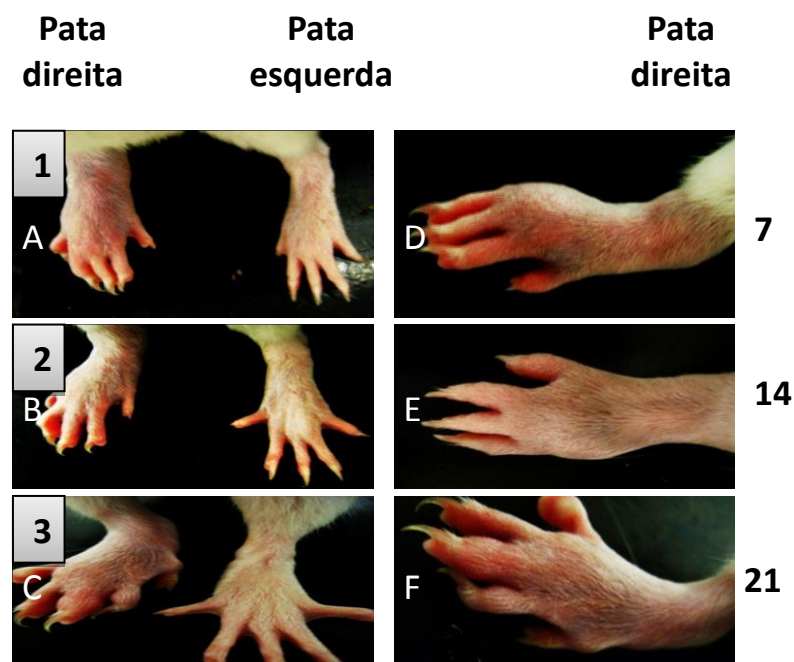


Figura 17 – Fotografias das patas posteriores (ipsilateral e contralateral – A, B e C; ipsilateral em maior aumento – D, E e F) de três animais, obtidas 7, 14 e 21 dias após as injeções de CFA na pata direita.

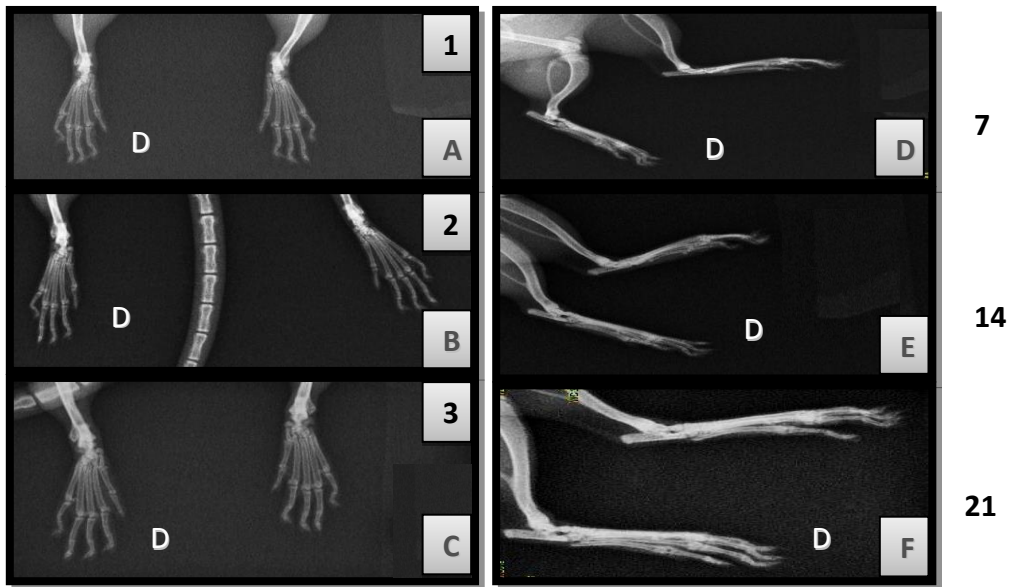


Figura 18 - Imagens radiográficas das patas posteriores de três animais obtidas 7, 14 e 21 dias após as injeções de salina na pata direita (D). Imagens obtidas em posição crânio-caudal (A, B, C) e posição médio-lateral (D, E, F).

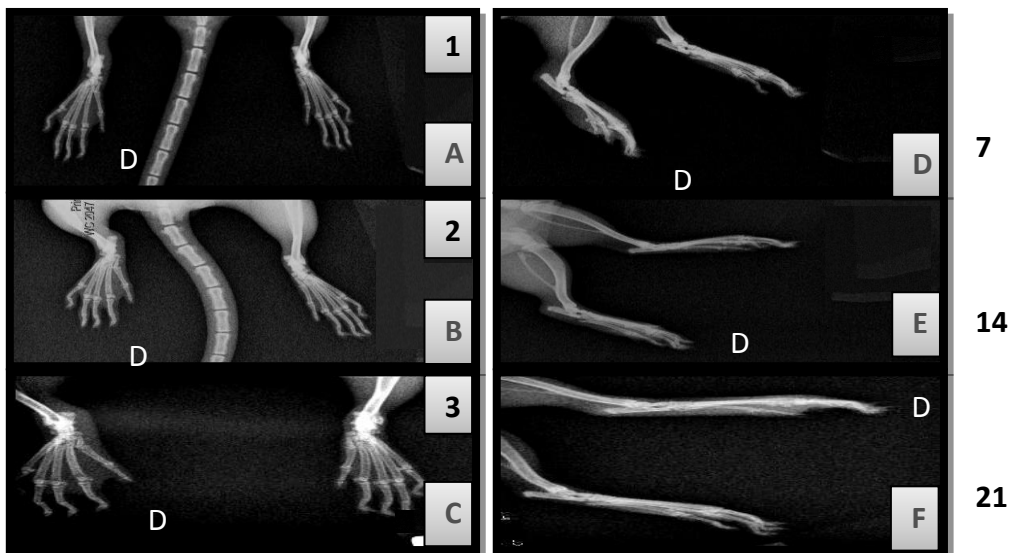


Figura 19 - Imagens radiográficas das patas posteriores de três animais obtidas 7, 14 e 21 dias após as injeções de CFA na pata direita (D). Imagens obtidas em posição crânio-caudal (A, B, C) e posição médio-lateral (D, E, F).

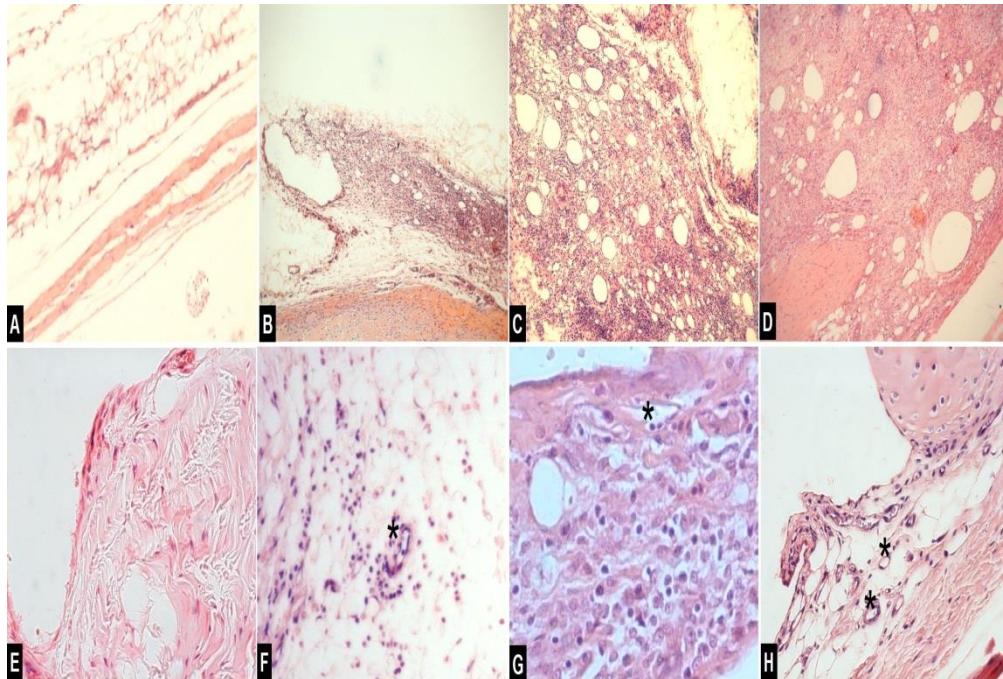


Figura 20 - Fotomicrografias representativas de cortes histológicos da articulação tíbio-társica e do tecido periarticular de animais controle (A, E) e de animais 7 dias (B, F) e 14 dias (C, G) e 21 dias (D, H) após as injeções de CFA. Aparência histológica normal do *panniculum* (A). Panniculite periarticular (B-D). Aparência histológica normal do tecido sinovial (E). Sinovite e angiogênese (asteriscos) (F-H). Ampliação original, '100 (A-D), '400 (E-H).

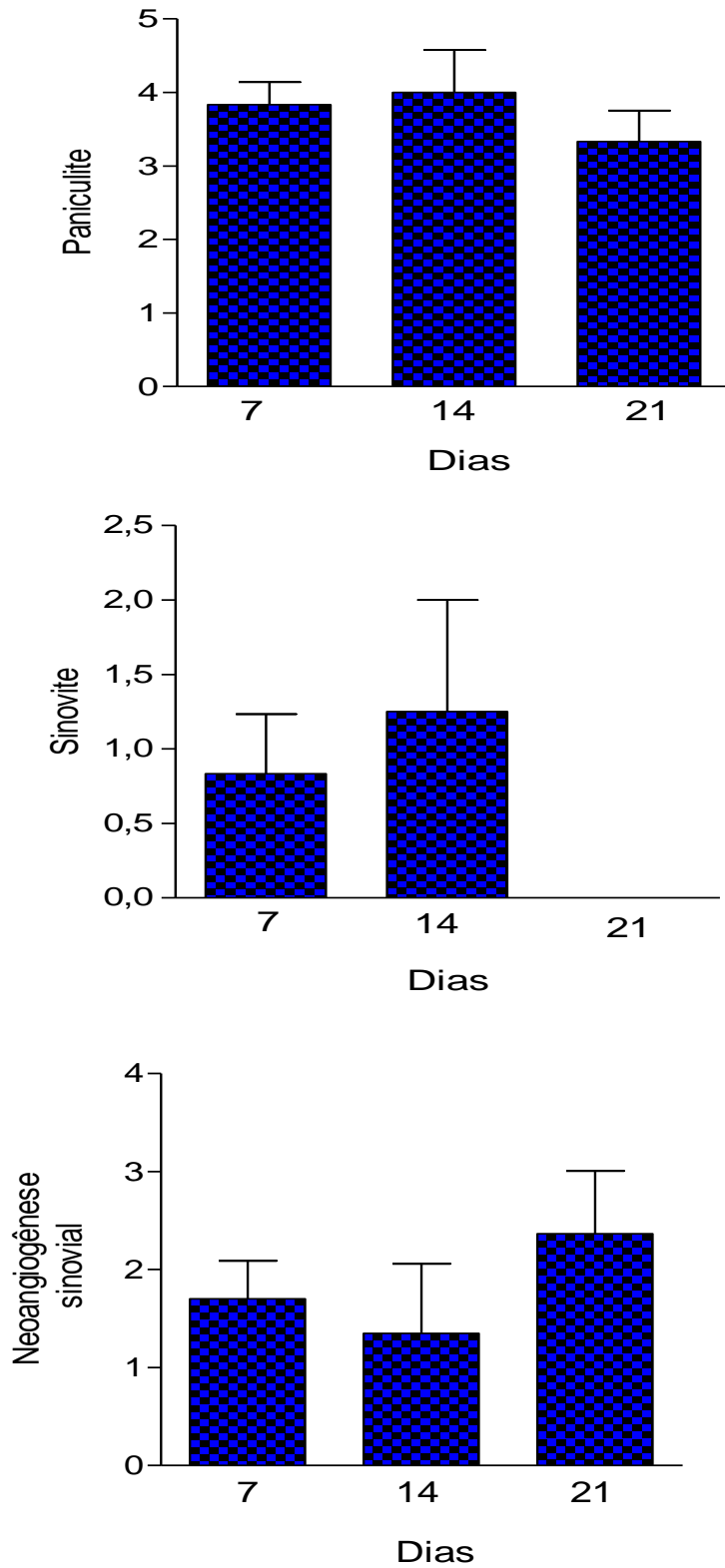


Figura 21 - Escores para paniculite, sinovite e neovascularização sinovial 7, 14 e 21 dias após as injeções de CFA. Paniculite: 0=ausente, 1=leve, 2=leve a moderada, 3=moderada, 4=moderada a intensa, 5=intensa. Neovascularização sinovial: 0=ausente, 1=leve, 2=leve a moderada, 3=moderada, 4=moderada a intensa. Sinovite: 0=ausente, 0,5=leve, 1,0=leve a moderada, 1,5=moderada, 2,0=moderada a intensa, 2,5=intensa. n=4.

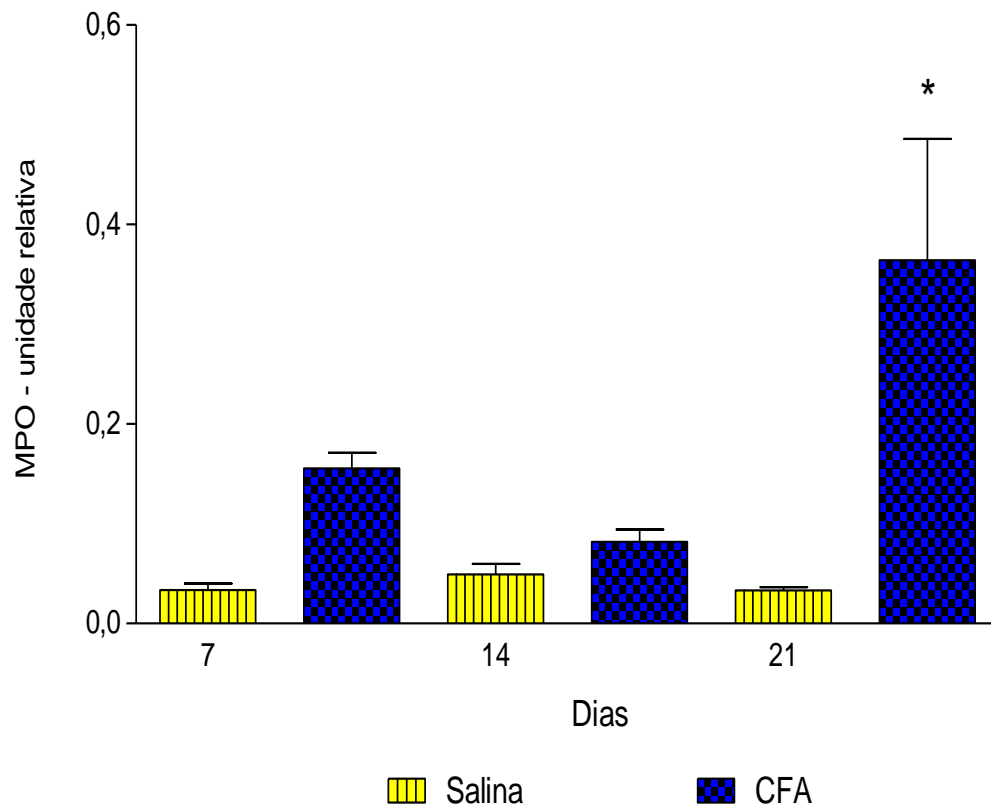


Figura 22 - Atividade da MPO na pata dos animais 7, 14 e 21 após as injeções de salina ou CFA. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle injetado com salina ($p < 0,001$; $n=4$).

5.2 Efeito induzido pela administração de riboflavina, isolada ou em associação com dexametasona, sobre a alodínia mecânica e o edema de pata

As injeções de CFA induziram alodínia mecânica marcante, evidente durante todo o período experimental, sendo máxima no terceiro dia. A administração de riboflavina (125, 250 ou 500 mg/Kg, duas vezes ao dia), iniciada no dia seguinte à última injeção de CFA e mantida diariamente durante todo o período experimental, não alterou de forma significativa a alodínia mecânica na maioria dos momentos de avaliação. Embora em dois momentos, nos 12^o e 21^o dias, tenha sido observado um aumento do limiar nociceptivo do grupo de animais tratados com a dose intermediária de riboflavina, a relevância desse resultado é reduzida, pois a alteração do limiar foi observada em momentos pontuais e também não foi observada uma relação dose-resposta (**Figura 23**).

As injeções de CFA também induziram edema de pata marcante, que se manteve em magnitudes semelhantes durante todo o período experimental, no mesmo grupo de animais no qual foi observada a alodínia mecânica. O tratamento com riboflavina não alterou de forma significativa o edema induzido pelo CFA (**Figura 24**). O tratamento dos animais com o anti-inflamatório esteroide dexametasona (0,5 mg/Kg, administração no dia da avaliação do edema ou da alodínia, 6 h antes da avaliação desses parâmetros) não inibiu a alodínia mecânica, mas inibiu parcialmente o edema de pata induzido pelo CFA (**Figuras 23 e 24**).

O aumento da massa corporal dos animais durante o período experimental não foi alterado pela administração diária de riboflavina. Entretanto, os animais que foram tratados com dexametasona a cada três dias tiveram um aumento de massa corporal significativamente menor do que aquele observado nos animais que receberam administrações diárias de CMC (**Figura 25**).

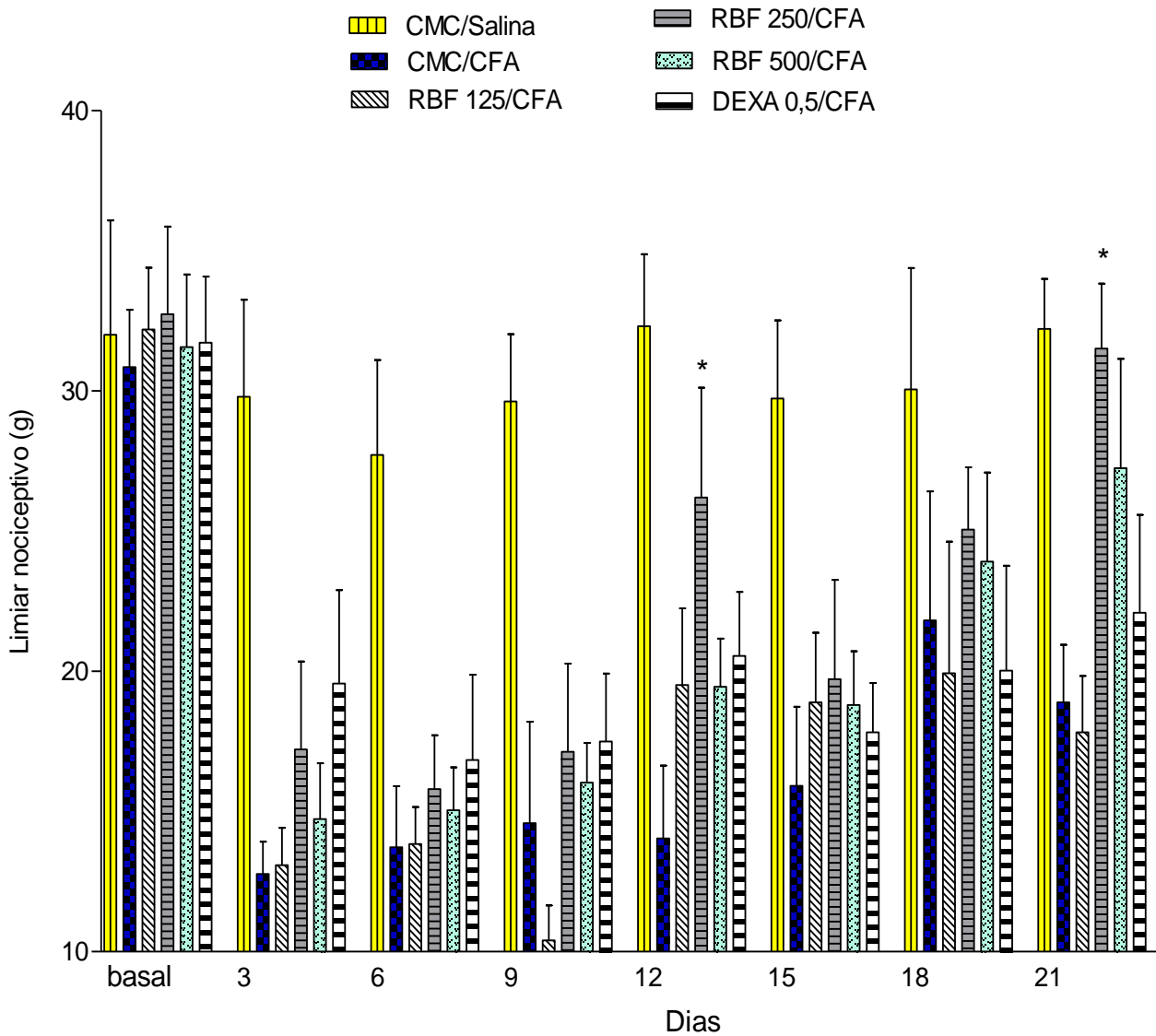


Figura 23 - Efeito induzido por riboflavina (RBF 125, 250 ou 500 mg/Kg; duas administrações por dia), dexametasona (DEXA 0,5 mg/Kg; uma administração a cada três dias) ou CMC (2 mL/Kg, duas administrações por dia) sobre a alodínia mecânica induzida pelas injeções de CFA. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com CMC/CFA ($p < 0,05$; $n = 6$).

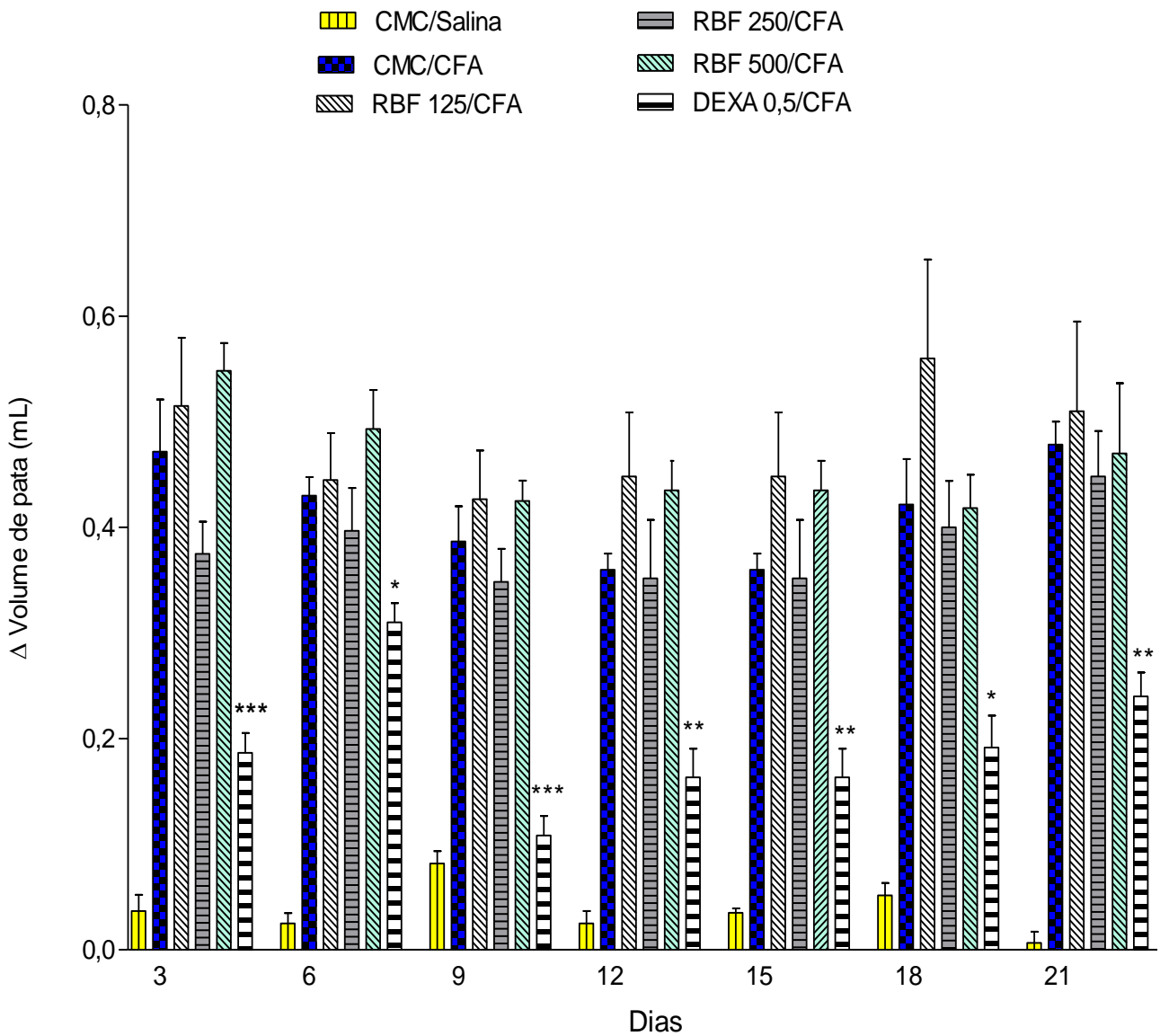


Figura 24 – Efeito induzido por riboflavina (RBF 125, 250 ou 500 mg/Kg; duas administrações por dia), dexametasona (0,5 mg/Kg; uma administração a cada três dias) ou CMC (2 mL/Kg, duas administrações por dia) sobre o edema de pata induzido pelas injeções de CFA. *, ** e *** Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com CMC/CFA ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente; $n=6$).

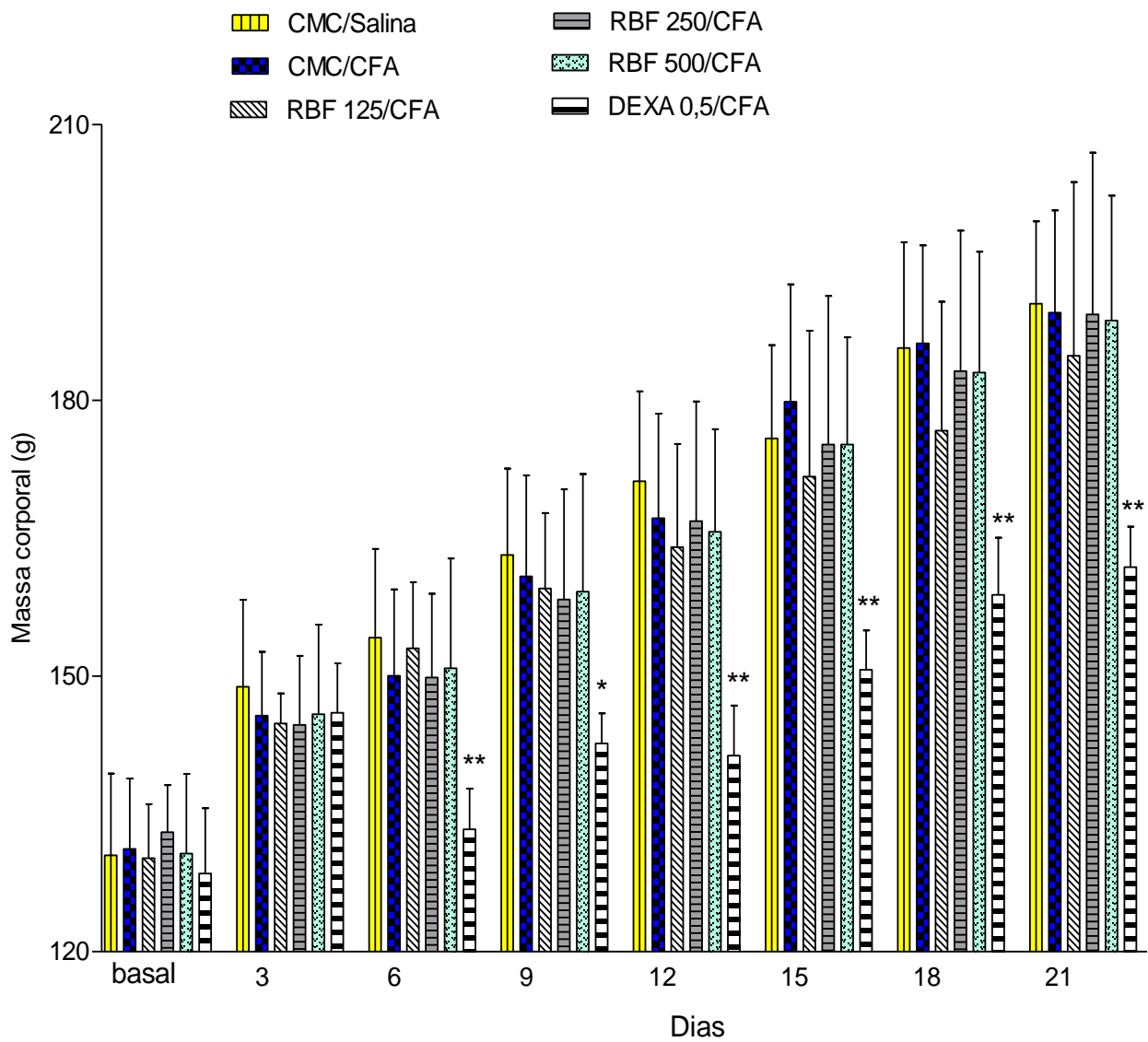


Figura 25 – Efeito induzido por riboflavina (RBF 125, 250 ou 500 mg/Kg; duas administrações por dia), dexametasona (0,5 mg/Kg; uma administração a cada três dias) ou CMC (2 mL/Kg, duas administrações por dia) sobre o aumento da massa corporal observado no período experimental. * e ** Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com CMC/CFA ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente; $n=6$).

Em outro protocolo, foi avaliado o efeito induzido pela associação da maior dose de riboflavina (500 mg/Kg) com dexametasona (0,5 mg/Kg) sobre a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos pelas injeções de CFA. Os esquemas de tratamento com riboflavina e com dexametasona foram idênticos àqueles descritos nos protocolos anteriores. A associação de dexametasona com riboflavina, de forma semelhante ao observado após o tratamento com cada fármaco de forma isolada, não induziu atenuação significativa da alodínia mecânica no período analisado (**Figura 26**). Em relação ao edema de pata, foi observado que nas três últimas avaliações (15^o, 18^o e 21^o dias), o efeito antiedematogênico induzido pela associação riboflavina e dexametasona apresentou maior magnitude quando comparado com aquele induzido unicamente pela dexametasona (**Figura 27**). O efeito inibitório induzido pela dexametasona sobre o aumento de massa corporal foi novamente observado nesse protocolo experimental, tanto no grupo de animais tratados somente com dexametasona quanto no grupo de animais tratados com a associação dexametasona e riboflavina (**Figura 28**).

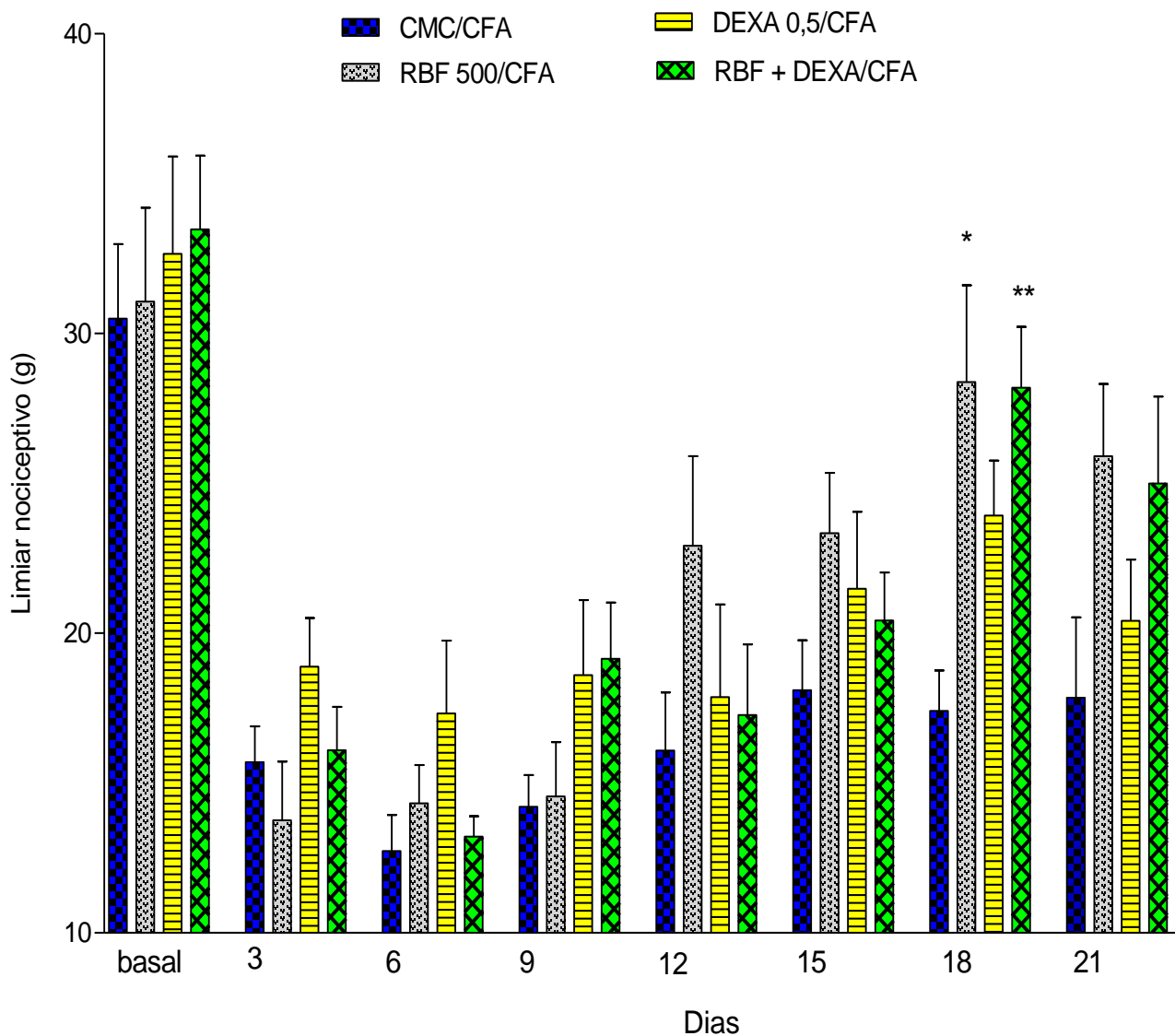


Figura 26 – Efeito induzido por riboflavina (RBF 500 mg/Kg; duas administrações por dia), dexametasona (0,5 mg/Kg; uma administração a cada três dias), associação riboflavina/dexametasona (riboflavina - 500 mg/Kg, duas administrações por dia; dexametasona - 0,5 mg/Kg, uma administração a cada três dias) ou CMC (2 mL/Kg, duas administrações por dia) sobre a alodínia mecânica induzida pelas injeções de CFA. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com CMC/CFA ($p < 0,05$; $n=6$).

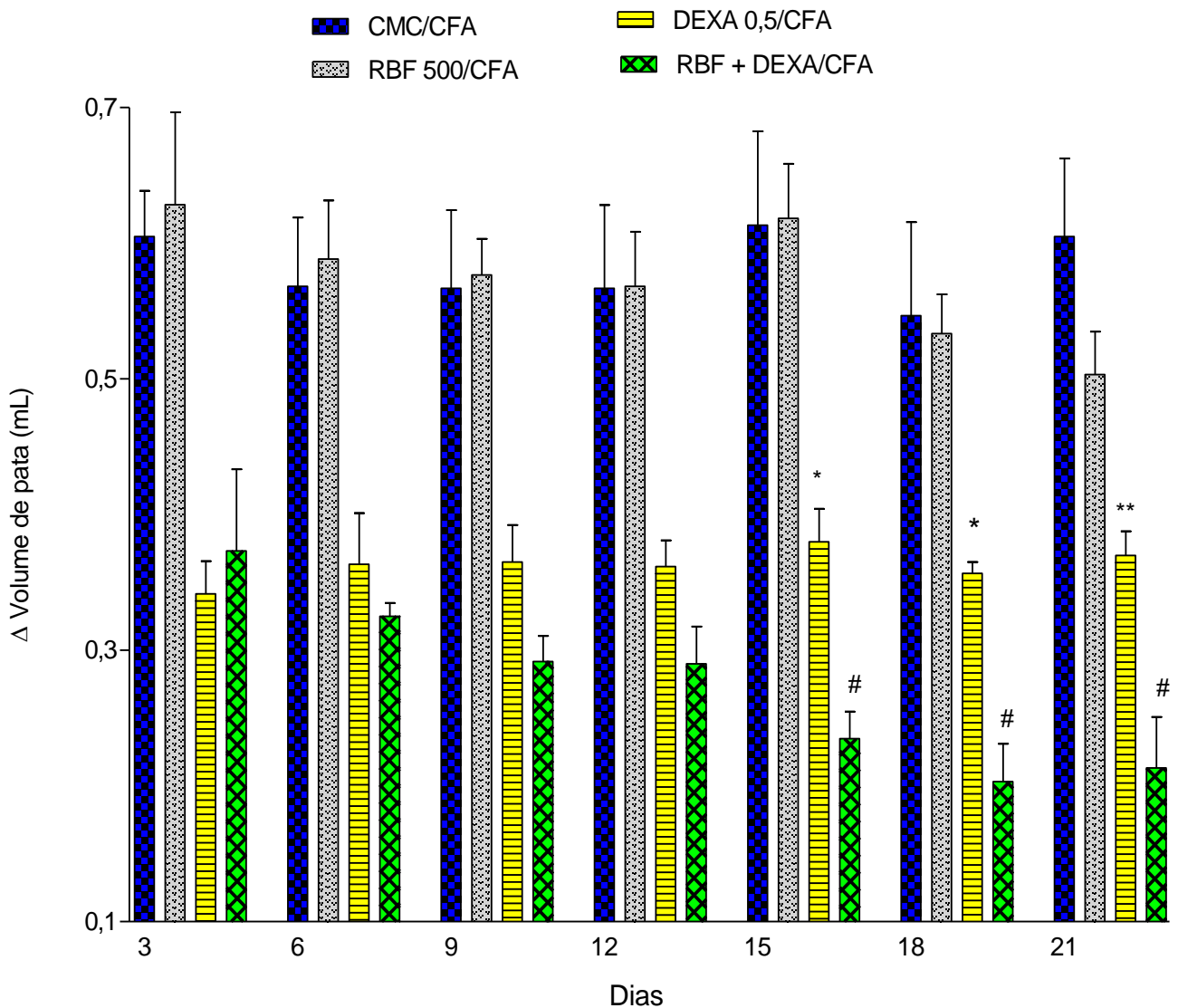


Figura 27 - Efeito induzido por riboflavina (RBF 500 mg/Kg; duas administrações por dia), dexametasona (0,5 mg/Kg; uma administração a cada três dias), associação riboflavina/dexametasona (riboflavina - 500 mg/Kg, duas administrações por dia; dexametasona - 0,5 mg/Kg, uma administração a cada três dias) ou CMC (2 mL/Kg, duas administrações por dia) sobre o edema de pata induzido pelas injeções de CFA. * e ** Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com CMC/CFA ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) # Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com DEXA/CFA ($p < 0,05$; $n = 6$).

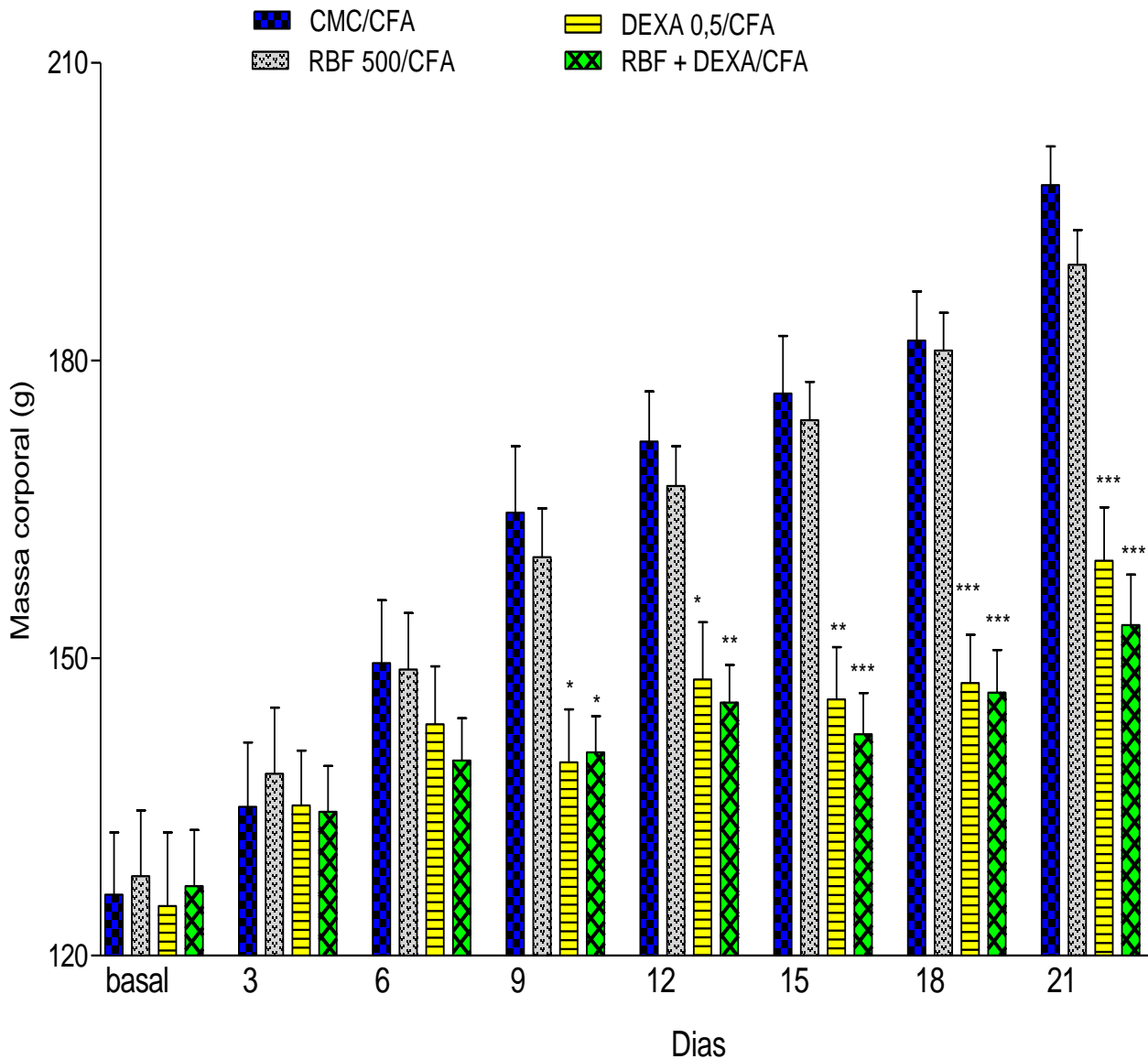


Figura 28 – Efeito induzido por riboflavina (500 mg/Kg; duas administrações por dia), dexametasona (0,5 mg/Kg; uma administração a cada três dias), associação riboflavina/dexametasona (riboflavina - 500 mg/Kg, duas administrações por dia; dexametasona - 0,5 mg/Kg, uma administração a cada três dias) ou CMC (2 mL/Kg, duas administrações por dia) sobre o aumento da massa corporal observado no período experimental. *, ** e *** Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com CMC/CFA ($p < 0,05$; $n=6$).

5.3 Efeito induzido pela administração de tiamina, isolada ou em associação com dexametasona, sobre a alodínia mecânica o edema de pata

A administração de tiamina (doses de 300 e 600 mg/Kg, mas não de 150 mg/Kg, duas vezes ao dia), iniciada no dia seguinte à última injeção de CFA e mantida diariamente durante todo o período experimental, elevou de forma significativa o limiar nociceptivo nos 6^o e 12^o dias de avaliação. Nos demais dias de avaliação, houve aumento do limiar nociceptivo dos grupos tratados com tiamina, embora não tenha sido observada uma diferença estatisticamente significativa em relação aos limiares do grupo tratado com CFA (**Figura 29**).

A administração prolongada de tiamina não alterou o edema de pata induzido pelas injeções de CFA nos mesmos grupos experimentais (**Figura 30**), bem como o aumento da massa corporal durante o período de avaliação (**Figura 31**).

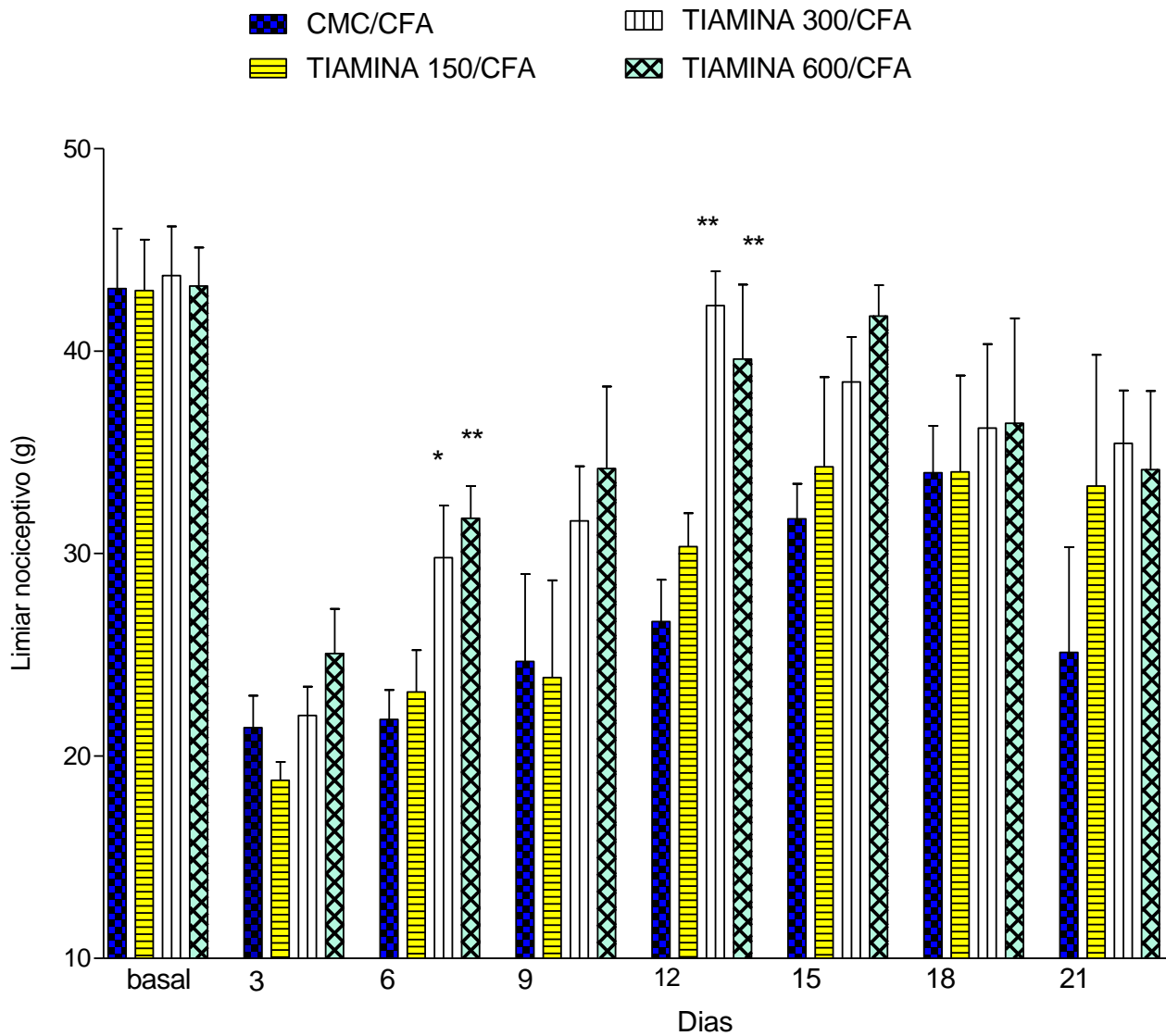


Figura 29 - Efeito induzido por tiamina (150, 300 ou 600 mg/Kg; duas administrações por dia) ou CMC (2 mL/Kg, duas administrações por dia) sobre a alodínia mecânica induzida pelas injeções de CFA. * e ** Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com CMC/CFA ($p < 0,05$; $n = 6$).

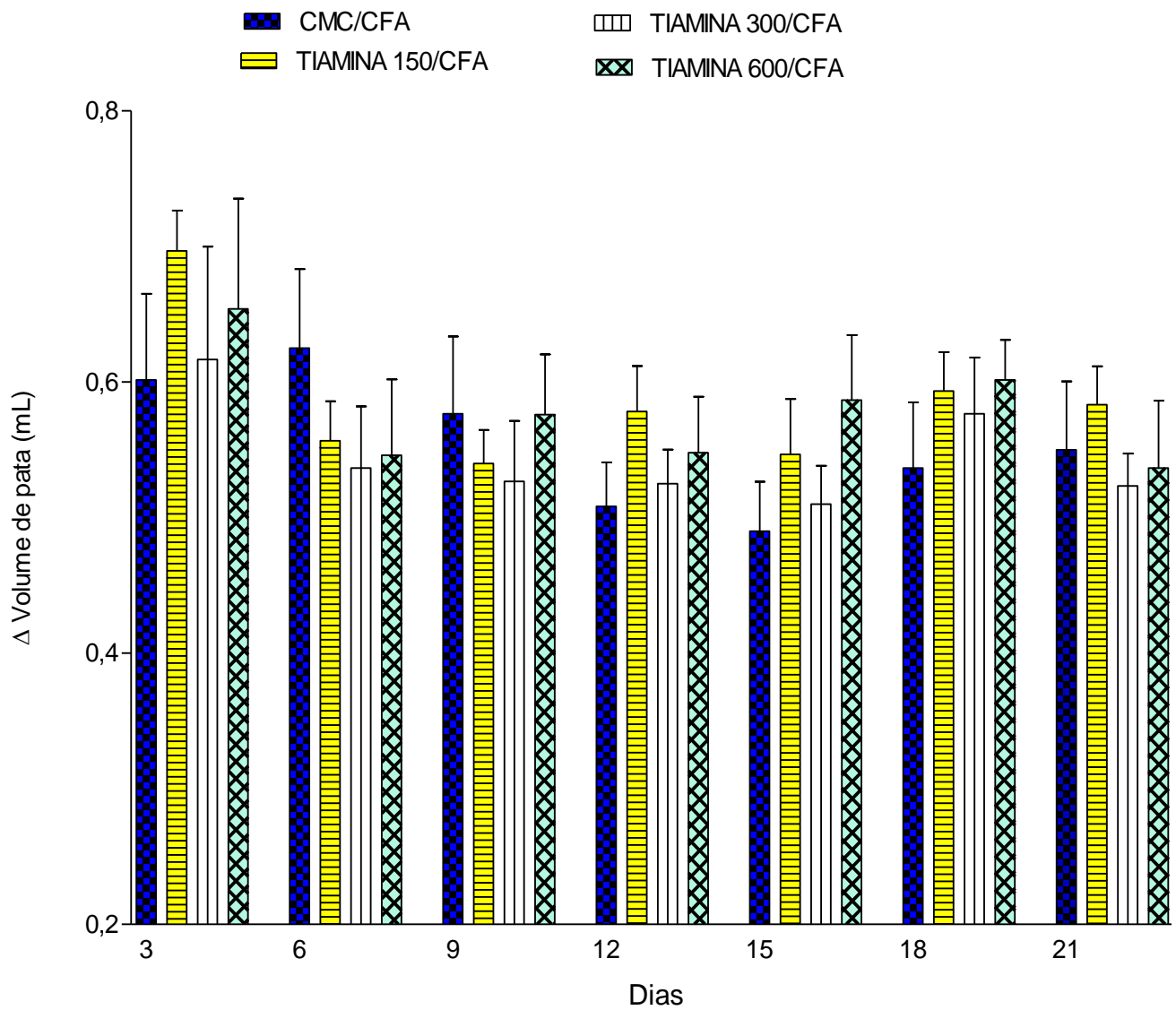


Figura 30 - Efeito induzido por tiamina (150, 300 ou 600 mg/Kg; duas administrações por dia) ou CMC (2 mL/Kg, duas administrações por dia) sobre o edema de pata induzido pelas injeções de CFA (n=6).

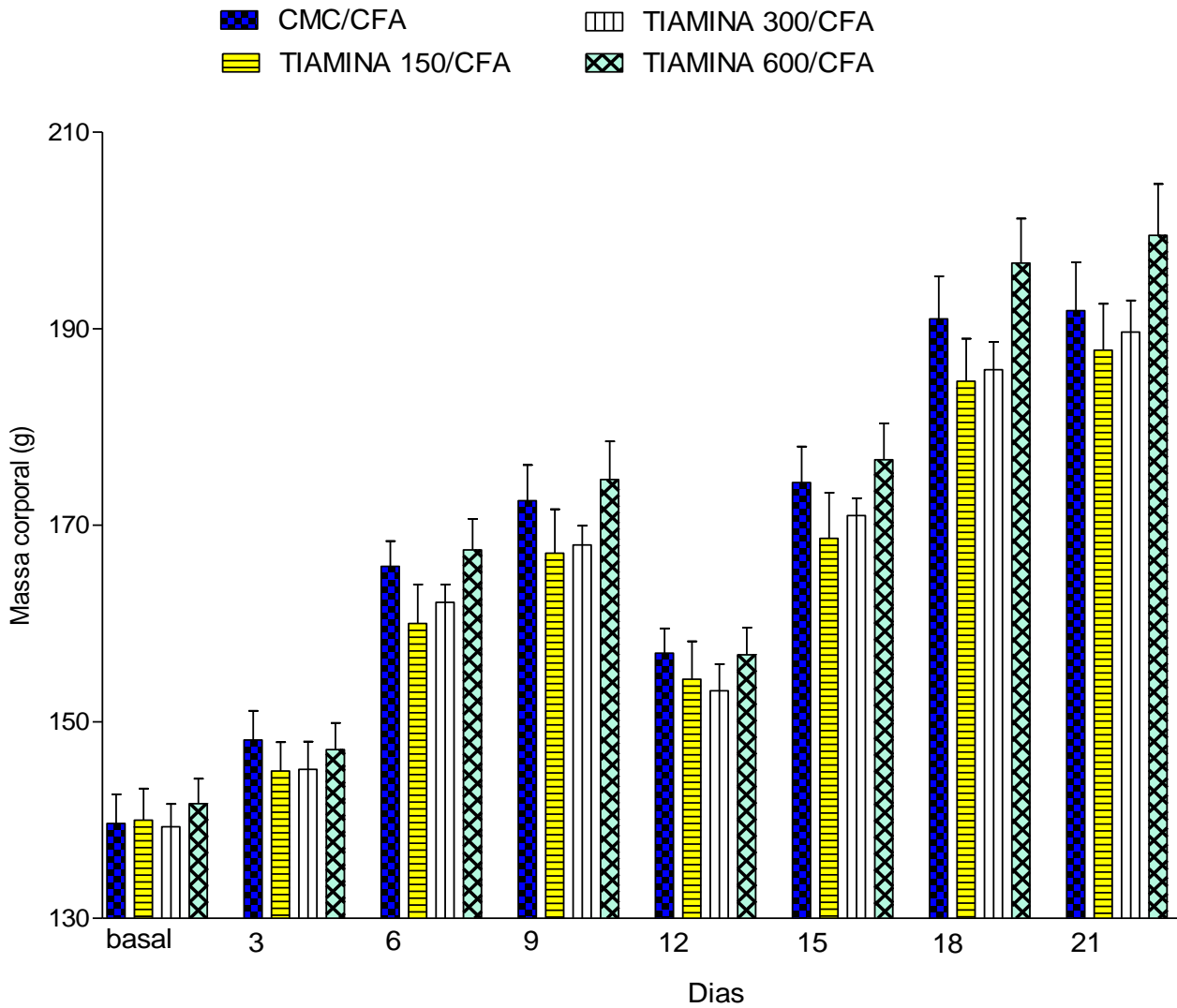


Figura 31 - Efeito induzido por tiamina (150, 300 ou 600 mg/Kg; duas administrações por dia) ou CMC (2 mL/Kg, duas administrações por dia) sobre o aumento da massa corporal observado no período experimental (n=6).

Em outro protocolo, foi avaliado o efeito induzido pela associação da maior dose de tiamina (600 mg/Kg) com dexametasona (0,5 mg/Kg) sobre a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos pelas injeções de CFA. Os esquemas de tratamento com tiamina e com dexametasona foram idênticos àqueles descritos nos protocolos anteriores. A associação de tiamina com dexametasona, mas não tiamina ou dexametasona isoladamente, atenuou de forma significativa a alodínia mecânica no 3º dia após as injeções de CFA. Nas avaliações do 6º, 9º e 12º dias após as injeções, houve aumento significativo do limiar nociceptivo tanto do grupo tratado com a associação quanto do grupo tratado somente com tiamina em relação ao grupo controle **(Figura 32)**.

Em relação ao edema de pata, foi observado que no período do 9º ao 18º dia, o efeito antiedematogênico induzido pela associação tiamina e dexametasona apresentou maior magnitude quando comparado com aquele induzido unicamente pela dexametasona **(Figura 33)**. O efeito inibitório induzido pela dexametasona sobre o aumento de massa corporal foi novamente observado nesse protocolo experimental, tanto no grupo de animais tratados somente com dexametasona quanto no grupo de animais tratados com a associação dexametasona e tiamina **(Figura 34)**.

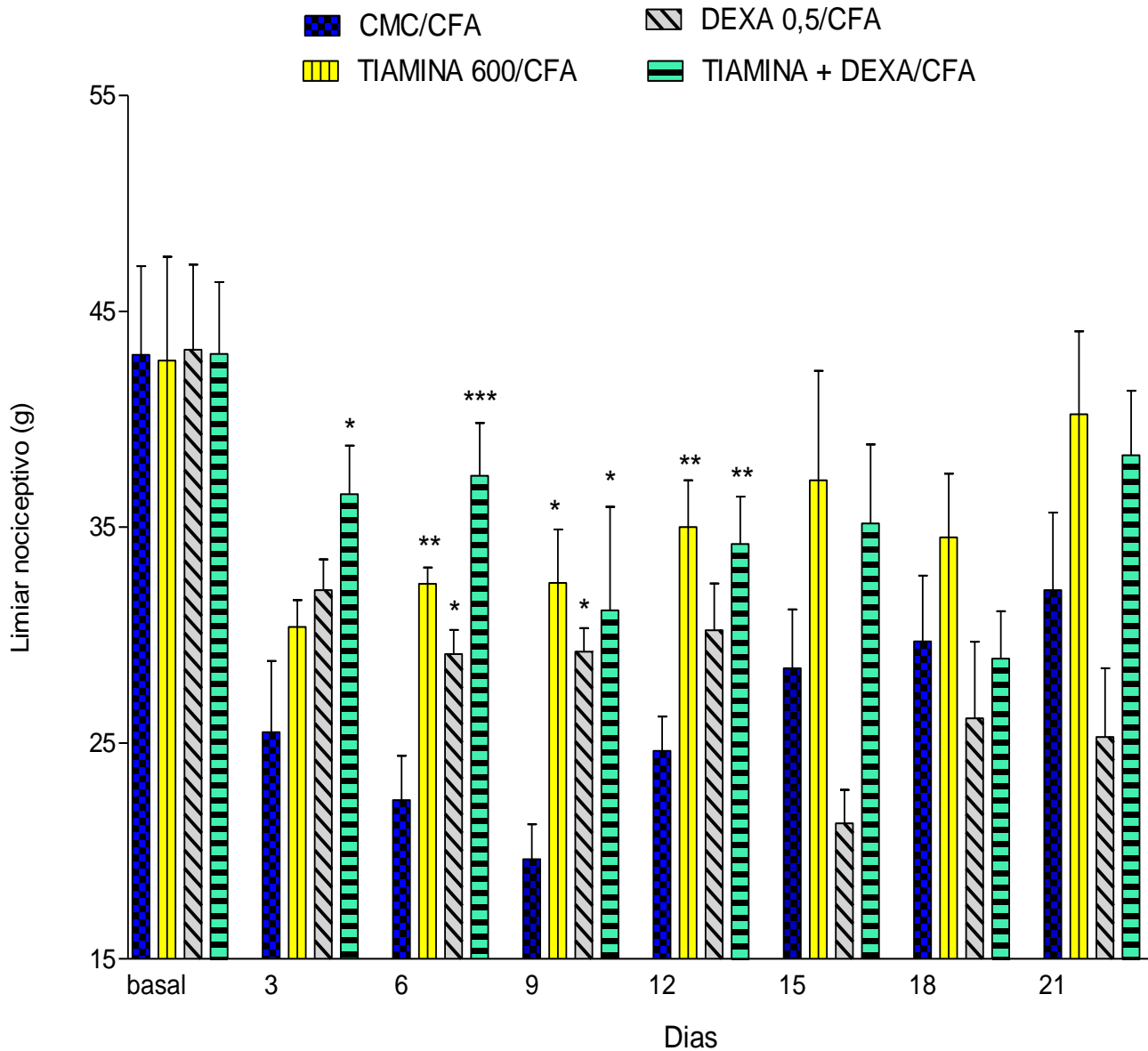


Figura 32 - Efeito induzido por tiamina (600 mg/Kg; duas administrações por dia), dexametasona (0,5 mg/Kg; uma administração a cada três dias), associação tiamina/dexametasona (tiamina - 600 mg/Kg, duas administrações por dia; dexametasona - 0,5 mg/Kg, uma administração a cada três dias) ou CMC (2 mL/Kg, duas administrações por dia) sobre a alodínia mecânica induzida pelas injeções de CFA. * e ** Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com CMC/CFA ($p < 0,05$ e $p < 0,01$; $n=6$).

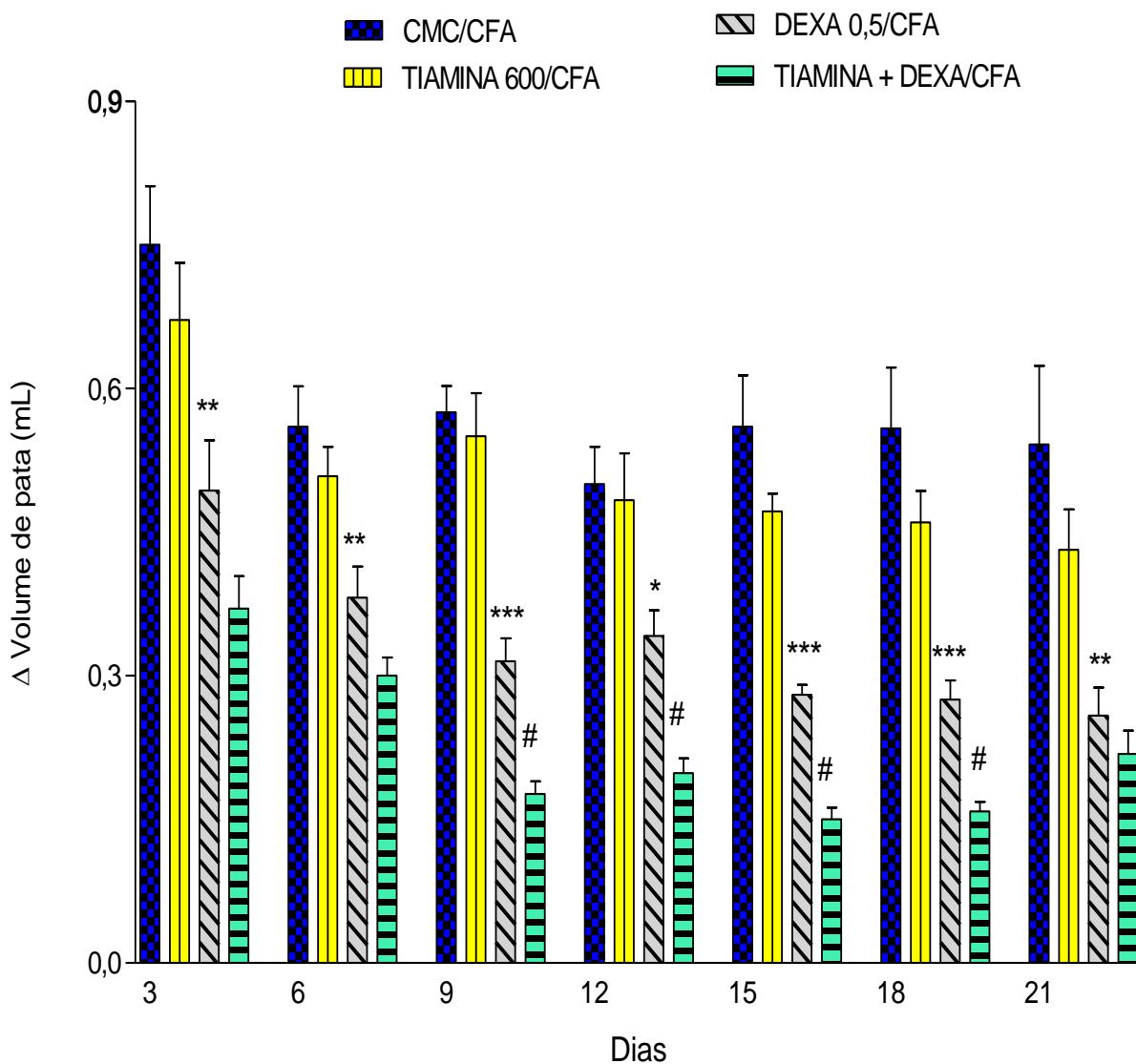


Figura 33 - Efeito induzido por tiamina (600 mg/Kg; duas administrações por dia), dexametasona (0,5 mg/Kg; uma administração a cada três dias), associação tiamina/dexametasona (tiamina - 600 mg/Kg, duas administrações por dia; dexametasona - 0,5 mg/Kg, uma administração a cada três dias) ou CMC (2 mL/Kg, duas administrações por dia) sobre o edema de pata induzido pelas injeções de CFA. * e ** Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com CMC/CFA ($p < 0,05$ e $p < 0,01$). # Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com DEXA/CFA ($p < 0,05$; $n = 6$).

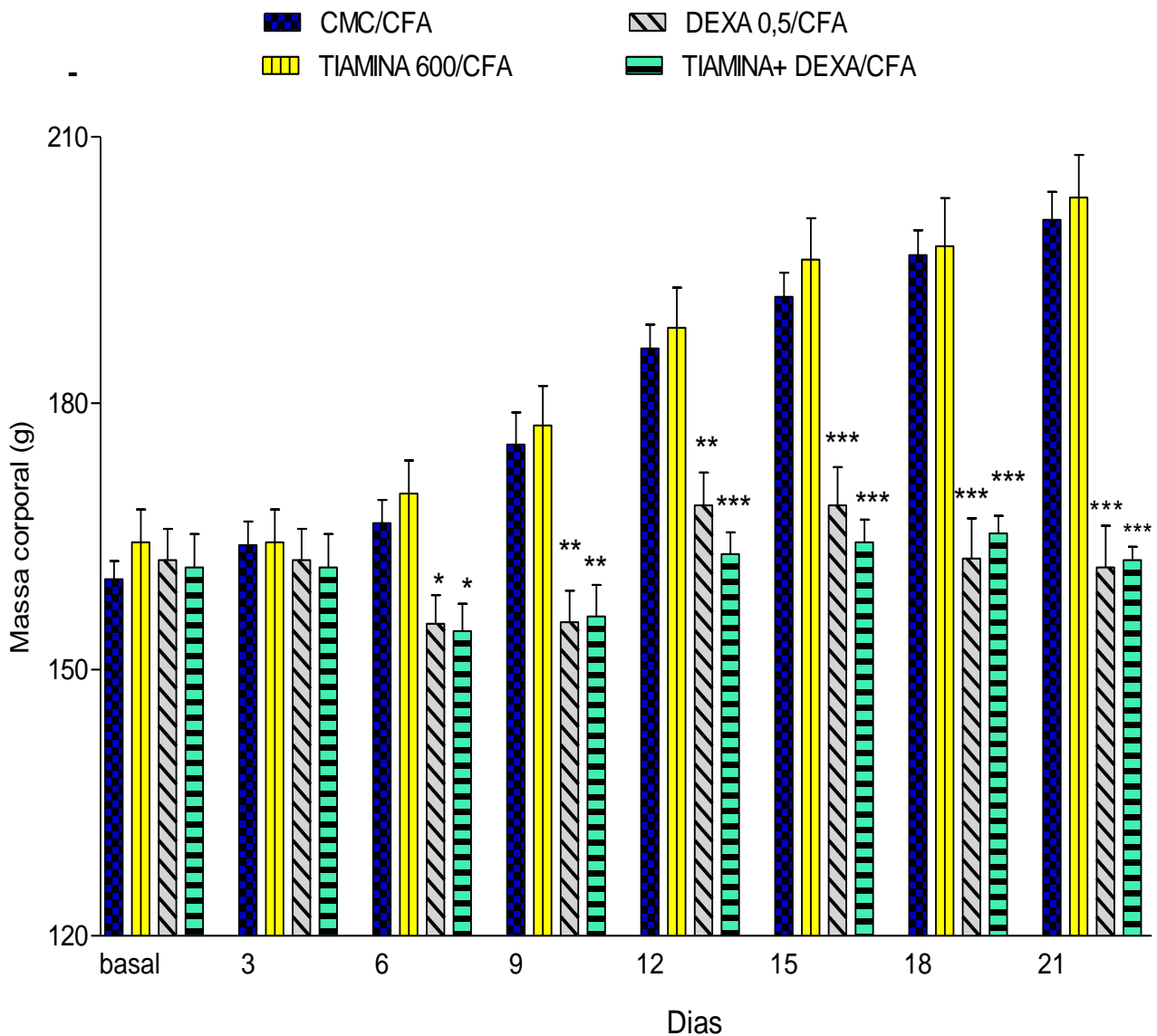


Figura 34 - Efeito induzido por tiamina (600 mg/Kg; duas administrações por dia), dexametasona (0,5 mg/Kg; uma administração a cada três dias), associação tiamina/dexametasona (tiamina - 600 mg/Kg, duas administrações por dia; dexametasona - 0,5 mg/Kg, uma administração a cada três dias) ou CMC (2 mL/Kg, duas administrações por dia) sobre o aumento da massa corporal observado no período experimental. *, ** e *** Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com CMC/CFA ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente; $n=6$).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, houve a caracterização de um modelo experimental de AR em ratos fêmeas da linhagem Holtzman, evidenciado por monoartrite persistente com características não invasivas e menos agressivas do que aquelas de outros modelos nos quais foi usado o CFA. O esquema de indução da monoartrite com CFA e a duração do período observacional foram determinados a partir da análise dos resultados de um estudo realizado por Helyes *et al.* (2004), no qual foram usados ratos machos da linhagem Lewis. Para a indução da monoartrite, o CFA foi administrado por via sistêmica (duas injeções i.d. na base da cauda) e em sítio próximo à articulação tíbio-társica (uma injeção i.pl.). Esse esquema de indução resultou em edema de pata e alodínia mecânica ipsilaterais marcantes durante todo o período experimental, muito semelhantes às alterações observadas no estudo de Helyes *et al.* (2004). Além disso, foram observadas alterações histológicas como paniculite, sinovite e neoangiogênese, também restritas à pata injetada, mas não alterações morfológicas de grande magnitude como erosão de cartilagem e de ossos. Ratos da linhagem Lewis são extremamente sensíveis ao CFA e desenvolvem uma resposta inflamatória intensa e duradoura. Um dos fatores que contribuem para essa resposta é a ausência de colonização por bactérias e outros microrganismos. Um aspecto positivo associado à obtenção de respostas semelhantes em ratos da linhagem Holtzman é a possibilidade de investigação de mecanismos da doença e também de intervenções farmacoterapêuticas em uma linhagem que não necessita de condições especiais como manipulação asséptica.

Em nosso estudo, foi usada a linhagem de ratos Holtzman, tendo em vista a escala de susceptibilidade ao CFA (KIM & MOUDGIL, 2009). Sabe-se que múltiplos fatores podem estar associados às diferenças de susceptibilidade aos agentes artritogênicos. Entre os fatores genéticos, há muito interesse no papel dos genes do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), embora outros genes já descritos também contribuam para a susceptibilidade à artrite (BRENNER *et al.*, 2005; KIM & MOUDGIL, 2009). Não somente diferenças genéticas, mas também fatores relacionados a agentes microbianos, incluindo bactérias comensais do intestino e o sexo dos animais podem estar envolvidos com a magnitude da inflamação e da

hiperalgesia induzidas pelo CFA (COOK & NICKERSON, 2005; GRIFFIN & WHITACRE, 1991; HOLMDAHL, 1995; KOHASHI *et al.*, 1979; VAN DE LANGERIJT, 1994).

Durante a caracterização do modelo experimental, três parâmetros foram avaliados, diariamente (temperatura corporal) ou cada três dias (volume da pata e sensibilidade a um estímulo mecânico). O edema de pata, evidente ao longo de todo o período de avaliação, é uma resposta relacionada à vasodilatação e ao aumento da permeabilidade vascular, com exsudação de proteínas plasmáticas e líquido, bem como, amplificação dos mecanismos inflamatórios resultante da ativação de precursores presentes no plasma (CIRINO, 1998). A alodínia mecânica, por sua vez, é resultado da sensibilização de neurônios sensoriais primários de limiar elevado (nociceptores) induzida pela alteração do microambiente químico local (pata) durante a resposta inflamatória, bem como, das alterações do processamento nociceptivo em estruturas espinhais e supraespinhais (MILLAN *et al.*, 1987; MILLAN, 1999). Vários estudos demonstraram de forma direta ou indireta que a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos por CFA em roedores são eventos multimediados que envolvem a participação de citocinas inflamatórias (IFN- γ , TNF α , IL-1 β e IL-6), eicosanoides, NO, bradicinina e purinas, entre outros (CHOU *et al.*, 2011; CUNHA *et al.*, 1992; FERREIRA *et al.*, 2001; GEGOUT *et al.*, 1994; GRUBB *et al.*, 1991; LIMA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre o perfil da resposta inflamatória induzida pelo CFA, a temperatura corporal dos animais foi registrada ao longo do período de avaliação. Esse parâmetro, apesar de raramente ser investigado durante a caracterização de modelos experimentais de AR, pode fornecer informação sobre a extensão da resposta inflamatória induzida pelo CFA, ou seja, se a resposta envolve apenas manifestações locais ou se envolve adicionalmente manifestações sistêmicas. Foi observada elevação marcante e estatisticamente significativa da temperatura corporal dos animais entre 7 e 17 h após as duas injeções iniciais de CFA. Após esse período inicial, mesmo após a terceira injeção de CFA, não foram observadas temperaturas corporais mais elevadas no grupo de animais que recebeu as três injeções de CFA durante os 21 dias de avaliação.

Esses resultados têm semelhanças com aqueles obtidos por Philippe *et al.* (1997) em um estudo no qual foram investigadas as relações entre os parâmetros funcionais, inflamatórios e degenerativos durante a poliartrite induzida por CFA em ratos Lewis. Esses autores observaram que a resposta febril foi marcante e máxima no primeiro dia após a injeção de CFA, seguida por uma redução da temperatura para valores semelhantes àqueles observados no grupo controle no dia seguinte. No estudo de Philippe *et al.* (1997), só foi observada nova elevação da temperatura duas semanas após a injeção de CFA, quando houve um aumento marcante do escore artrítico. Esse aspecto observado no presente estudo e também no estudo de Philippe *et al.* (1997), uma resposta febril que não apresenta um paralelismo com outras alterações inflamatórias como alodínia mecânica e edema de pata, pode parecer inesperado. Entretanto, essa ausência de paralelismo também já foi demonstrada em outro modelo de inflamação crônica induzida por um estímulo distinto. Em estudo realizado por Gegout *et al.* (1994), foi observado que a injeção intra-articular de zimosano em ratos induz resposta inflamatória caracterizada por edema, sinovite erosiva e depleção do conteúdo de proteoglicanos na cartilagem articular, de forma crescente ao longo de 20 dias de avaliação, sendo que a resposta febril só foi evidente no primeiro dia.

Embora várias citocinas inflamatórias, eicosanoides e cininas, entre outros mediadores, sejam importantes na mediação da resposta febril induzida por diferentes estímulos inflamatórios (KETTELHUT & GOLDEBERG, 1988; KLUGER, 1991; LE MAY *et al.*, 1990; MORIMOTO *et al.*, 1989), a mediação da resposta febril induzida por CFA ainda é pouco conhecida. O único estudo que investigou de forma preliminar esse aspecto indicou que a resposta febril induzida por CFA em ratos Lewis está associada com aumento das concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6 e é parcialmente dependente de eicosanoides (PHILIPPE *et al.*, 1997). É possível que a atenuação da resposta febril nos dias seguintes à injeção de CFA (presente estudo; PHILIPPE *et al.*, 1997) ou zimosano (GEGOUT *et al.*, 1994) esteja associada à produção de antipiréticos endógenos como arginina vasopressina (ROTH, 2006), IL-10 (CARTMELL *et al.*, 2003) ou corticosterona (COELHO *et al.*, 1992).

Em modelos experimentais de doenças inflamatórias crônicas, também é comum avaliar a gravidade do fenômeno por meio de avaliações radiográfica, histológica e bioquímica. Essas avaliações são fundamentais para que se tenha um conhecimento da extensão da destruição tecidual associada à inflamação, bem como das células e dos mediadores envolvidos.

Os métodos de imagem são importantes ferramentas para o diagnóstico, prognóstico e avaliação de tratamentos de pacientes com doenças inflamatórias crônicas, tendo como principal vantagem o caráter não invasivo (CHOI *et al.*, 2011; TAYLOR, 2003). Esses métodos também têm sido usados para avaliação da extensão da resposta inflamatória em modelos experimentais de AR (DUSTIN, 2003; JACOBSON *et al.*, 1999). No presente estudo, por meio da avaliação das imagens radiográficas, foi possível observar o edema dos tecidos periarticulares em três momentos distintos do curso temporal, em concordância com as avaliações do edema avaliado por meio de pletismometria. Lesões inflamatórias de tecidos moles têm sido consideradas sinal precoce de artrite e geralmente precedem as lesões de cartilagens e ossos (JACOBSON *et al.*, 1999). Entretanto, as imagens radiográficas obtidas inclusive no 21º dia não mostraram erosões do tecido ósseo e cartilaginoso, bem como destruição do espaço articular. Nas imagens radiográficas feitas no presente estudo, em virtude da resolução do aparelho utilizado, não foi possível avaliar a ocorrência de estreitamento do espaço articular, um achado comum em muitos modelos experimentais de AR em ratos. A limitação da radiografia para avaliação das alterações teciduais em modelos experimentais de AR em roedores também ficou evidente no estudo de Almarestani *et al.* (2011). Nesse estudo, os autores induziram a artrite por meio da injeção i.pl. de CFA em ratos Sprague-Dawley e avaliaram as alterações teciduais progressivas sete, 15 e 30 dias após. Embora algumas alterações tenham sido evidenciadas por meio das imagens radiográfica, só houve uma caracterização mais detalhada e de todos os parâmetros quando foram usadas outras técnicas como tomografia computadorizada e densitometria óssea.

Ao contrário da avaliação radiográfica, a avaliação histológica permitiu identificar alterações significativas na articulação tibio-társica em diferentes momentos da avaliação. Todos os animais experimentais, mas não os controles, desenvolveram graus variáveis de paniculite periarticular, caracterizados por edema e infiltração de

linfócitos, células plasmáticas, neutrófilos e macrófagos. Com a evolução do processo inflamatório também houve formação de células gigantes (aglomerados de macrófagos). Embora lesões de cartilagem e ósseas não tenham sido observadas no presente estudo, as alterações acima descritas geralmente precedem as alterações articulares (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

As alterações histológicas foram associadas a um aumento local da atividade da MPO, indicando a presença de um infiltrado de neutrófilos. Essas células secretam vários mediadores que contribuem para a inflamação articular e para a destruição tecidual, desempenhando papel importante na iniciação e manutenção do processo inflamatório nas articulações (WIPKE & ALLEN, 2001). Embora o papel de neutrófilos na alodínia mecânica e no edema de pata induzidos por CFA não tenham sido caracterizados nesse ou em outros estudos, há demonstração de que essas células contribuem para o edema induzido em roedores por estímulos inflamatórios como carragenina e lipopolissacarídeo, bem como para a alodínia mecânica induzida por carragenina (CUNHA *et al.*, 2008; THOMAZZI *et al.*, 1995).

Tendo em vista que as alterações observadas são características das fases iniciais da artrite, o modelo experimental descrito no presente estudo pode ser relevante para a avaliação de candidatos a fármacos úteis no tratamento de pacientes que apresentam a doença em uma fase inicial, a fim de evitar a progressão e prevenir a destruição de tecidos periarticulares. Outros aspectos do modelo experimental descritos no presente estudo que podem ser considerados positivos são a ausência de comprometimento do aumento da massa corporal dos animais durante o período de avaliação e a reprodutibilidade dos parâmetros avaliados entre os diferentes protocolos, sendo esse último aspecto um importante critério de elegibilidade de um modelo pré-clínico (BENDELE *et al.*, 1999). Modelos experimentais que induzem uma resposta inflamatória menos marcante e não causam sofrimento e debilidade marcantes dos animais podem ser mais úteis para demonstração dos efeitos induzidos por candidatos a fármacos para o tratamento de pacientes com AR em estágios menos avançados da doença, bem como suscitar menores questionamentos de natureza ética. Comprometimento marcante dos animais experimentais geralmente é observado em modelos experimentais de poliartrite (BUTLER *et al.*, 1992; DONALDSON *et al.*, 1993; GRUBB *et al.*, 1991; STEIN *et al.*,

1988), o que tem levado pesquisadores a propor modificações dos modelos tradicionais. Entretanto, deve ser enfatizado que, se o objetivo de um estudo é investigar se um candidato a fármaco pode reduzir a progressão ou reverter as alterações em estágios mais avançados da AR, o modelo descrito no presente estudo não é mais indicado.

Uma vez caracterizados a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos pelas injeções de CFA, o próximo objetivo foi avaliar os efeitos induzidos por duas vitaminas do complexo B, a riboflavina e a tiamina, de forma isolada ou em associação com dexametasona, sobre esses parâmetros. A investigação de novos usos para as vitaminas do complexo B, principalmente no tratamento de pacientes com doenças inflamatórias e condições dolorosas diversas, é justificada em função dos resultados promissores obtidos em estudos pré-clínicos nos quais foram investigadas as suas atividades em diferentes modelos experimentais de inflamação e dor (BERTOLLO *et al.*, 2006; CARAM-SALAS *et al.*, 2006; FRANÇA *et al.*, 2001; GRANADOS-SOTO *et al.*, 2004; MOALLEM *et al.*, 2008; NAIK *et al.*, 1970) e também pelo seu perfil de segurança bastante favorável (GOLDEBERG *et al.*, 2007).

Os resultados do presente estudo demonstraram que a riboflavina, nas doses e esquemas de administração avaliados, não reduziu significativamente o edema de pata e a alodínia mecânica induzidos pelas injeções de CFA. Resultados de outros estudos indicam que a riboflavina induz efeitos distintos em diferentes modelos de inflamação aguda e crônica.

Administração *p.o.* ou *i.p.* de riboflavina inibe a resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos, bem como a alodínia mecânica, a hiperalgesia térmica e o edema de pata induzidos por carragenina em ratos (BERTOLLO *et al.*, 2006; GRANADOS-SOTO *et al.*, 2004). Entretanto, o edema de pata induzido por um ativador da proteína quinase C, o forbol 12,13-didecanoato, foi atenuado de forma reduzida por essa vitamina (BERTOLLO *et al.*, 2006). No estudo de Granados-Soto *et al.* (2004), foi observado que a riboflavina, mesmo em doses bem mais elevadas do que aquelas que inibiram as respostas em modelos experimentais de dor e inflamação agudas, não inibiu a alodínia mecânica em um modelo experimental de dor neuropática em ratos com ligadura dos nervos L5 e L6. Em

estudo recente (MAZUR-BIALY *et al.*, 2012), foi demonstrado que os efeitos induzidos pela administração i.p. de riboflavina (20, 50 ou 100 mg/kg) sobre as contorções abdominais induzidas por zimosano em camundongos foram variáveis, dependendo do momento de administração. Foi observado um efeito antinociceptivo quando houve o pré-tratamento com riboflavina, embora a administração dessa vitamina após a injeção de zimosano tenha induzido contorções abdominais.

Usando um modelo de artrite induzida por colágeno em camundongos, Verdrengh & Tarkowski (2005) demonstraram que o tratamento prolongado (17 dias) com riboflavina (20 mg/Kg, i.p.) não reduziu a gravidade da artrite. Nesse mesmo estudo, os autores observaram redução significativa do edema de pata agudo induzido por óleo de oliva em camundongos pré-tratados com a mesma dose de riboflavina. Assim, embora tenham sido observadas atividades antinociceptiva e antiedematogênica em modelos experimentais de inflamação aguda, a atividade da riboflavina em modelos experimentais de inflamação crônica ou de dor neuropática não é tão evidente. Esses resultados indicam que os efeitos induzidos pela riboflavina podem variar em função do modelo experimental, da espécie e do esquema de tratamento usados.

O tratamento prolongado dos animais com tiamina não inibiu o edema de pata induzido pelas injeções de CFA. Entretanto, entre os animais tratados com tiamina houve a detecção de uma atividade antialodínica de forma dose-dependente no 6º e no 12º dias de avaliação. A atividade antialodínica da tiamina no modelo experimental de artrite induzida por CFA apresenta relação com resultados obtidos por outros autores. Wang *et al.* (2005) demonstraram que a tiamina (50, 100 ou 125 mg/kg i.p.) inibe a hiperalgisia térmica em dois modelos experimentais de dor neuropática, compressão de gânglio espinhal e ligadura do nervo ciático em ratos. Essa vitamina também apresenta atividade no modelo da placa quente em camundongos, um modelo experimental de dor nociceptiva (MOALLEM *et al.*, 2008). A confirmação da atividade antinociceptiva da tiamina em modelos de dor neuropática foi obtida por Moallem *et al.* (2008), em camundongos com constrição do nervo ciático, e por Song *et al.* (2009), em ratos com compressão crônica do gânglio da raiz dorsal. Em um dos raros estudos a fornecer informações de naturezas eletrofisiológica e molecular que podem ajudar a explicar a atividade

antinociceptiva da tiamina, Song *et al.* (2009) demonstraram que essa vitamina reduz a hiperexcitabilidade e a magnitude das correntes de Na⁺ dos neurônios do gânglio da raiz dorsal.

Tendo em vista que associações de fármacos são comuns no tratamento de pacientes com AR e também que associações de vitaminas do complexo B, entre si ou com outros fármacos, estão presentes em alguns medicamentos indicados para o tratamento de pacientes com condições inflamatórias e dolorosas, foi investigado se a riboflavina ou a tiamina poderiam exacerbar o efeito induzido pela dexametasona, um anti-inflamatório esteroide, no modelo experimental de artrite induzida pelo CFA. Outra motivação para essa investigação foi o conjunto de resultados obtido por diferentes autores indicando que associações de vitaminas do complexo B, entre si ou com outros fármacos, podem induzir efeitos de grandes magnitudes, maiores que aqueles induzidos por uma droga ou fármaco de forma isolada, em modelos experimentais de dor e inflamação agudas (JURNA, 1998; MIXCOATL-ZECUATL *et al.*, 2008; NAKAEMA *et al.*, 2005; REYES-GARCÍA *et al.*, 1999; REYES-GARCÍA *et al.*, 2003; REYES-GARCÍA *et al.*, 2004) e também em estudos clínicos (GOLDEBERG *et al.*, 2007; GOLDEBERG *et al.*, 2009; MEDINA SANTILLÁN *et al.*, 2000).

Inicialmente, foi investigado o efeito induzido pela associação de riboflavina com dexametasona sobre o edema de pata e a alodínia mecânica induzidos pelas injeções de CFA. A alodínia mecânica não foi atenuada pelo tratamento com dexametasona e também não foi observado efeito antialodínico induzido pela associação de riboflavina com dexametasona. Embora existam estudos demonstrando que a produção de TNF- α e IL-1 β (MAL *et al.*, 2013; SUZUKI *et al.*, 1995), citocinas que induzem inflamação local e contribuem para o edema inflamatório, seja inibida pela riboflavina, essa vitamina, de forma isolada, nas doses e esquemas de administração usados, não inibiu o edema induzido pelas injeções de CFA. Entretanto, a riboflavina exacerbou o efeito antiedematogênico induzido pela dexametasona do 15^o ao 21^o dia após indução da artrite. Esses resultados servem de estímulo para investigações de natureza molecular, com o objetivo de avaliar se a riboflavina exacerba o conhecido efeito inibitório induzido por anti-inflamatórios sobre a produção de citocinas inflamatórias e eicosanoides (FLOWER

& ROTHWELL, 1994; TEGEDER *et al.*, 2001), mediadores que contribuem de forma marcante para muitas manifestações do processo inflamatório.

Os resultados proporcionados pela associação de tiamina e dexametasona foram mais promissores. A associação tiamina e dexametasona induziu efeito antiedematogênico de maior magnitude do que aquele induzido pela tiamina ou dexametasona isoladamente, a partir do 9º dia de avaliação, mantendo-se até o último dia de avaliação. A análise de resultados de estudos publicados não fornece evidências de natureza molecular que possam auxiliar na explicação do efeito antinociceptivo de pequena magnitude induzido pela tiamina e da exacerbação promovida por essa vitamina da atividade antiedematogênica de anti-inflamatórios esteroides. O único estudo de relevância nesse contexto, conduzido por Shoeb & Ramana (2012), demonstrou que um análogo lipossolúvel da tiamina, a benfotiamina, inibe a expressão de genes de enzimas como COX-2 e lipoxigenase-5, a ativação da fosfolipase A₂ e a produção de eicosanoides por macrófagos em cultura estimulados por lipopolissacarídeo. Caso a tiamina também apresente tais atividades, essas poderiam contribuir para os efeitos induzidos por essa vitamina, de forma isolada ou em associação com dexametasona, no modelo experimental do presente estudo.

Outro aspecto relevante dos perfis da riboflavina e da tiamina é o fato de que ambas, de forma isolada, não alteraram o aumento da massa corporal dos animais durante o período de avaliação. Resultados obtidos por Fukuwatari *et al.* (2009) vão ao encontro dos resultados do presente estudo. Esses autores demonstraram que ratos desmamados expostos a uma dieta com excesso de tiamina ou riboflavina durante o período de 22 dias não apresentaram comprometimento do aumento de massa corporal bem como redução da ingestão alimentar e das massas dos tecidos. Esses resultados indicam que o tratamento prolongado com riboflavina ou tiamina não deve interferir em aspectos importantes da digestão e do metabolismo.

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstraram que o modelo de monoartrite induzida por CFA em ratos Holtzman foi reprodutível, sendo observadas alterações inflamatórias importantes como sinovite, paniculite, neoangiogênese, edema de pata e alodínia mecânica persistentes. Entre as vantagens de um modelo experimental de AR no qual os animais desenvolvem monoartrite, quando comparado com modelos nos quais os animais desenvolvem poliartrite, podem ser mencionadas o fato de que alterações características da doença são observadas em apenas uma articulação, com menor comprometimento das funções fisiológicas, menor sofrimento dos animais e maior probabilidade de observação de efeitos induzidos por candidatos a fármacos. Os resultados também indicam que a riboflavina e, principalmente, a tiamina apresentam potencial no tratamento de pacientes com AR, principalmente em associação com outros fármacos com indicação já estabelecida. A associação de vitaminas do complexo B com fármacos tradicionalmente usados no tratamento de pacientes com AR conduz à expectativa de obtenção de efeitos benéficos de maior magnitude, bem como, redução de doses dos fármacos do segundo grupo e, conseqüentemente, dos riscos de reações adversas associadas ao seu uso crônico. Por fim, a demonstração da atividade das vitaminas do complexo B em modelos de inflamação crônica, e não somente em modelos de inflamação aguda, aumenta ainda mais o interesse na estratégia de reposicionamento de fármacos em um momento no qual há um aumento expressivo da representação de idosos na população geral e pelo desenvolvimento cada vez mais lento e dispendioso de novos fármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELL, J. E.; HOOTMAN, J. M.; ZAC, M. M.; MORIARTY, D.; HELMICK, C. G. **Physical activity and health related quality of life among people with arthritis.** J. Epidemiol. Community Health, London, v. 59, n. 5, p. 380-385, may 2005.

AHLQVIST, E.; HULTQVIST, M.; HOLMDAHL, R. **The value of animal models in predicting genetic susceptibility to complex diseases such as rheumatoid arthritis.** Arthritis Res. Ther., London, v. 11, n. 3, p. 226, may 2009.

ALHO, J. M. **Migration, fertility, and aging in stable populations.** Demography, Washington, v. 45, n. 3, p. 641-650, aug. 2008.

ALMARESTANI, L.; FITZCHARLES, M. A.; BENNETT, G. J.; RIBEIRO-DA-SILVA, A. **Imaging studies in Freund's complete adjuvant model of regional polyarthritis, a model suitable for the study of pain mechanisms, in the rat.** Arthritis Rheum., Atlanta, v. 63, n. 6, p. 1573-1581, jun. 2011.

ANDERSON, G.; HORVATH, J. **The growing burden of chronic disease in America.** Public Health Rep., Ottawa, v. 119, n. 3, p. 263-270, may-jun. 2004.

ATKINS, E. **Fever: the old and new.** J. Infect. Dis., Chicago, v. 149, n. 3, p. 339-348, mar.1984.

AVIÑA-ZUBIETA, J. A.; CHOI, H. K.; SADATSAFAVI, M.; ETMINAN, M.; ESDAILE, J. M.; LACAILLE, D. **Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis of observational studies.** Arthritis Rheum., Atlanta, v. 59, n. 12, p. 1690–1697, dec. 2008.

BAE, S. C.; CORZILLIUS, M.; KUNTZ, K. M.; LIANG, M. H. **Cost-effectiveness of low dose corticosteroids versus non-steroidal anti-inflammatory drugs and COX-2 specific inhibitors in the long-term treatment of rheumatoid arthritis.** Rheumatology, Oxford, v. 42, n. 1, p. 46-53, jan. 2003.

BAO, F.; WU, P.; XIAO, N.; QIU, F.; ZENG, Q. P. **Nitric oxide-driven hypoxia initiates synovial angiogenesis, hyperplasia and inflammatory lesions in mice.** PLoS ONE, San Francisco, v. 7, n. 3, e. 34494, mar. 2012.

BARTON, N. J.; STEVENS, D. A.; HUGHES, J. P.; ROSSI, A. G.; CHESSEL, I. P.; REEVE, A. J.; McQUEEN, D. S. **Demonstration of a novel technique to quantitatively asses inflammatory mediators and cells in rat knee joints.** J. Inflamm., London, v. 4, n. 13, p. 1-8, jun. 2007.

BAUEROVÁ, K.; PONIŠT, S.; MIHALOVÁ, D.; DRÁFI, F.; KUNCÍROVÁ, V. **Utilization of adjuvant arthritis model for evaluation of new approaches in rheumatoid arthritis therapy focused on regulation of immune process and oxidative stress.** Interdisc. Toxicol., Bratislava, v. 4, n. 1, p. 33-39, mar. 2011.

BENDELE, A. M.; McCOMB, J.; GOULD, T.; McABEE, T.; SENNELLO, G.; CHLIPALA, E.; GUY, M. **Animal models of arthritis: relevance to human disease.** Toxicol. Pathol., Thousand Oaks, v. 27, n. 1, p. 134-142, jan-feb. 1999.

BENDELE, A. M. **Animal models of rheumatoid arthritis.** J. Musculoskel. Neuron. Interact., Kifissia, v. 1, n. 4, p. 377-385, jan. 2001.

BERNATSKY, S.; HUDSON, M.; SUISSA, S. **Anti-rheumatic drug use and risk of serious infections in rheumatoid arthritis.** Rheumatology, Oxford, v. 46, n. 7, p.1157–1160, jul. 2007.

BERTOLLO, C. M.; OLIVEIRA, A. C.; ROCHA, L. T.; COSTA, K. A.; NASCIMENTO JR, E. B.; COELHO, M. M. **Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of riboflavin in different experimental models.** Eur. J. Pharmacol., Amsterdam, v. 547, n. 1-3, p. 184-191, oct. 2006.

BEVAART, L.; VERVOORDELDONK, M. J.; TAK, P. P. **Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis.** Arthritis Rheum., Atlanta, v. 62, n. 8, p. 2192-2205, aug. 2010.

BIJLSMA, J. W. J. **Disease control with glucocorticoid therapy in rheumatoid arthritis.** Rheumatology, Oxford, v. 51, s. 4, p. iv 9-iv 13, jun. 2012.

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. **Modes of action of Freund's adjuvant in experimental models of autoimmune disease.** J. Leukoc. Biol., New York, v. 70, n. 6, p. 849-860, dec. 2001.

BLATTEIS, C. M. **Fever: is it beneficial?** Yale J. Biol. Med., New Haven, v. 59, n. 2, p. 107-116, mar-apr.1986.

BLATTEIS, C. M.; SEHIC, E. **Circulating pyrogen signaling of the brain. A new working hypothesis.** Ann. N. Y. Acad. Sci., New York, v. 813, n. 1, p. 445-447, mar. 1997.

BLATTEIS, C. M. **Fever: Pathological or physiological, injurious or beneficial?** J. Therm. Biol., Oxford, v. 28, n. 1, p. 1-13, jan. 2003.

BLATTEIS, C. M. **Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management.** Pharmacol. Ther., Oxford, v. 111, n. 1, p. 194-223., jul. 2006.

BLAY, S. L.; FILLENBAUM, G. G.; ANDREOLI, S. B.; GASTAL, F. L. **Prevalence and concomitants of arthritis in the elderly in Rio Grande do Sul, Brazil.** PLoS Med., San Francisco, v. 7, n. 9, e. 45418, sep. 2012.

BLUMBERG, S. N.; FOX, D. A. **Reumathoid Arthritis: guidelines of emerging therapies.** Am. J. Manag. Care., New Jersey, v. 7, n. 6, p. 617-626, jun. 2001.

BÖEHNKE, C.; REUTER, U.; FLACH, U.; SCHUH-HOFER, S.; EINHÄUPL, K. M.; ARNOLD, G. **High-dose riboflavin treatment is efficacious in migraine prophylaxis: an open study in a tertiary care centre.** Eur. J. Neurol., Oxford, v. 11, n. 7, p. 475-477, jul. 2004.

BOLON, B.; STOLINA, M.; KING, C.; MIDDLETON, S.; GASSER, J.; ZACK, D.; FEIGE, U. **Rodent preclinical models for developing novel antiarthritic molecules: comparative biology and preferred methods for evaluating efficacy.** J. Biomed. Biotechnol., Ohio, v. 2011, p. 21, 2011.

BOULANT, J. A. **Role of the preoptic - anterior hypothalamus in thermoregulation and fever.** Clin. Infect. Dis., Chicago, v. 31, s. 5, p. S157-S161, oct. 2000.

BRANDÃO, L.; FERRAZ, M. B.; ZERBINI, C. A. F. **Evaluation of quality of life in rheumatoid arthritis.** Rev. Bras. Reumatol., São Paulo, v. 37, n. 5, p. 275-281, oct. 1997.

BRETT D. S.; SNYDER S. H. **Nitric Oxide: A physiologic messenger molecule.** Annu. Rev. Biochem., Califórnia, v. 63, p. 175-195, jul. 1994.

BRENNER, M.; MENG, H. C.; YARLETT, N. C.; JOE, B.; GRIFFITHS, M. M.; REMMERS, E. F.; WILDER, R. L.; GULKO, P. S. **The non-MHC quantitative trait locus Cia 5 contains three major arthritis genes that differentially regulate disease severity, pannus formation, and joint damage in collagen-and pristane-induced arthritis.** J. Immunol., Baltimore, v. 174, n. 12, p. 7894-7903, jun. 2005.

BUTLER, S. H.; GODEFROY, F.; BESSON, J. M.; WEIL-FUGAZZA, J. **A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat.** Pain, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 73-81, jan. 1992.

CAI, X.; WONG, Y. F.; ZHOU, H.; LIU, Z. Q.; XIE, Y.; JIANG, Z. H.; BIAN, Z. X.; XU, H. X.; LIU, L. **Manipulation of the induction of adjuvant arthritis in Sprague-Dawley rats.** Inflamm. Res, Basel, v. 55, n. 9, p. 368-377, sep. 2006.

CANNON, G. W.; WOODS, M. L.; CLAYTON, F.; GRIFFITHS, M. M. **Induction of arthritis in DA rats by incomplete Freund's adjuvant.** J. Rheumatol., Toronto, v. 20, n. 1, p. 7-11, jan. 1993.

CARAM-SALAS, N. L.; REYES-GARCÍA, G.; MEDINA-SANTILLÁN, R.; GRANADOS-SOTO, V. **Thiamine and cyanocobalamin relieve neuropathic pain in rats: synergy with dexamethasone.** Pharmacology, Basel, v. 77, n. 2, p. 53-62, apr. 2006.

CARTMELL, T.; BALL, C.; BRISTOW, A. F.; MITCHELL, D.; POOLE, S. **Endogenous interleukin-10 is required for the defervescence of fever evoked by local lipopolysaccharide-induced and *Staphylococcus aureus*-induced inflammation in rats.** J. Physiol., Oxford, v. 549, pt. 2, p. 653-664, jun. 2003.

CARVALHO, L. F. C. S.; NEVES, A. C. C.; RICARDO, L. H.; RODE, S. M.; MARTINS, A. M. A. **Time descalcification and preservation of the cellular nucleus of the desmineralized tissue decalcified by nitric acid 5 %, EDTA 7 % and Biodec** – R. Periodontia, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 71-76, may 2008.

CERHAN, J. R.; SAAG, K. G.; MERLINO, L. A.; MIKULS, T. R.; CRISWELL, L. A. **Antioxidant micronutrients and risk of rheumatoid arthritis in a cohort of older women.** Am. J. Epidemiol., Baltimore, v. 157, n. 4, p. 345-354, feb. 2003.

CHOI, S.; CHAE, S. J.; KANG, S. W.; CHEONG, Y.; HONG, S. J.; PARK, H. K. **Non-invasive screening of progressive joint defects in the type II collagen-induced arthritis animal model using radiographic paw images.** Inflamm. Res., Basel, v. 60, n. 5, p. 447-456, may 2011.

CHONG, C. R.; SULLIVAN, D. J.; JR. **New uses for old drugs.** Nature, London, v. 448, n. 7154, p. 645-646, aug. 2007.

CHOU, L. W.; WANG, J.; CHANG, P. L.; HSIEH, Y. L. **Hyaluronan modulates accumulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha, inducible nitric oxide synthase, and matrix metalloproteinase-3 in the synovium of rat adjuvant-induced arthritis model.** Arthritis Res. Ther., London, v. 13, n. 3, R. 90, jun. 2011.

CHRISTOPHER, M. R.; GARY, S. G. **Use of genetic knockouts to modulate disease expression in a murine model of lupus, MRL/lpr mice.** Immunol. Res., New York, v. 25, n. 2, p. 143-153, apr. 2002.

CIRINO, G. **Multiple controls in inflammation: extracellular and intracellular phospholipase A₂ inducible and constitutive cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase.** Biochem. Pharmacol., Oxford, v. 55, n. 2, p. 105-111, jan. 1998.

COELHO, M. M.; SOUZA, G. E.; PELA, I. R. **Endotoxin-induced fever is modulated by endogenous glucocorticoids in rats.** Am. J. Physiol., Bethesda, v. 263, n. 2, p. R423- R427, aug. 1992.

COOK, C. D.; NICKERSON, M. D. **Nociceptive sensitivity and opioid antinociception and antihyperalgesia in Freund's adjuvant-induced arthritic male and female rats.** J. Pharmacol. Exp. Ther., Baltimore, v. 313, n. 1, p. 449-459, apr. 2005.

COOK, C. D.; MOORE, K. I. **Effects of sex, hindpaw injection site stimulus modality on nociceptive in sensivity in arthritis rats.** Physiol. Behav., Oxford, v. 87, n. 3, p. 552-562, mar. 2006.

COSTA, M. C.; SUTTER, P.; GYBELS, J.; VAN HEES, J. **Adjuvant-induced arthritis in rats: a possible model of chronic pain.** Pain, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 173-185, apr. 1981.

CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. **The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia.** Br. J. Pharmacol., London, v. 107, n. 3, p. 660-664, nov. 1992.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. JR.; SCHIVO, I. R.; NAPIMOGA, M. H.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. **Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception.** J. Leukoc. Biol., New York, v. 83, n. 4, p. 824-832, apr. 2008.

DINARELLO, C. A.; GANNON, J. G.; WOLFF, S. M.; BERNHEIM, H. A.; BEUTLER, B.; CERAMI, A.; FIGARI, I. S.; PALLADINO JUNIOR, M. A.; O'CONNOR, J. V. **Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1.** J. Exp. Med., New York, v. 163, n. 6, p. 1433-1450, jun. 1986.

DONALDSON, L. F.; SECKEL, J. R.; McQUEEN, D. S. **A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rats: effects of adjuvant dose.** J. Neurosci. Methods, Amsterdam, v. 49, n. 1-2, p. 5-10, aug. 1993.

DÖRNER, T.; BURMESTER, G. R. **The role of B cells in rheumatoid arthritis: mechanisms and therapeutic targets.** Curr. Opin. Rheumatol., Philadelphia, v. 15, n. 3, p. 246-252, may 2003.

DUSTIN, M. L. ***In vivo* imaging approaches in animal models of rheumatoid arthritis.** Arthritis Res. Ther., London, v. 5, n. 4, p. 165-171, may 2003.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M.; MAINI, R. N. **Role of cytokines in rheumatoid arthritis.** Annu. Rev. Immunol., California, v. 14, p. 397-440, apr. 1996.

FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PESQUERO, J. B.; ARAÚJO, R. C.; BADER, M.; CALIXTO, J. B. **Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice.** Neuropharmacology, Oxford, v. 41, n. 8, p. 1006-1012, dec. 2001.

FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G. P. **Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function.** Free Radic. Biol. Med., New York, v. 42, n. 2, p. 153-164, jan. 2007.

FLOWER, R. J.; ROTHWELL, N. J. **Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance.** Trends Pharmacol. Sci., Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 71-76, mar. 1994.

FRANÇA, D. S.; SOUZA, A. L. S.; ALMEIDA, K. R.; DOLABELLA, S. S.; MARTINELLI, C.; COELHO, M. M. **B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice.** Eur. J. Pharmacol., Amsterdam, v. 421, n. 3, p. 157-164, jun. 2001.

FRANCISCHI, J. N., YOKORO, C. M. POOLE, S., TAFURI, W. L., CUNHA, F. Q., TEIXEIRA, M. M. **Anti-inflammatory and analgesic effects of the phosphodiesterase 4 inhibitor rolipram in a rat model of arthritis.** Eur. J. Pharmacol., Amsterdam, v. 399, n. 2-3, p. 243-249, jul. 2000.

FUGGER, L.; SVEJGAARD, A. **Association of MHC and rheumatoid arthritis. HLA-DR4 and rheumatoid arthritis: studies in mice and men.** Arthritis Res., London, v. 2, n. 3, p. 208-211, apr. 2000.

FUKUWATARI, T.; KUZUYA, M.; SATOH, S.; SHIBATA, K. **Effects of excess vitamin B₁ or vitamin B₂ on growth and urinary excretion of water-soluble vitamins in weaning rats.** Shokuhin Eiseigaku Zasshi, Tokio, v. 50, n. 2, p. 70-74, apr. 2009.

GABRIEL, S. E.; MICHAUD, K. **Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases.** Arthritis Res. Ther., London, v. 11, n. 3, p. 229, may 2009.

GAMBARO, G.; PERAZELLA, M. A. **Adverse renal effects of anti-inflammatory agents: evaluation of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors.** J. Intern. Med., Oxford, v. 253, n. 6, p. 643-652, jun. 2003.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; CHEVRIER, D.; GUINGAMP, C.; TERLAIN, B.; NETTER, P. **Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism.** Life Sci., Oxford, v. 55, n. 17, p. 321-326, 1994.

GIBOFSKY, A. **Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis.** Am. J. Manag. Care, New Jersey, v. 18, S.13, s. 295-302, nov. 2012.

GOLDEBERG, H.; KEDE, J.; RIBEIRO, M. G.; HIGINO, K. S.; NUNES, C. P.; NUNES, F. P., GELLER, M. **Safety and efficacy of a combination of dexamethasone plus B-vitamins in the treatment of inflammatory neuropathies.** RBM, São Paulo, v. 64, n. 4, p. 177-181, 2007.

GOLDEBERG, H.; NUNES, C. P.; CARDOSO, C. A. F.; PAOLI, F.; RIBEIRO, M. G.; HIGASHI, R.; GELLER, M.; OLIVEIRA, L.; MARQUES, C. **Treatment of inflammatory neuropathy with dexamethasone plus B-vitamins: a clinical evaluation.** RBM, São Paulo, v. 66, n. 6, p. 169-173, jun. 2009.

GOLDENBERG, J. **Rheumatic diseases in old age: a new reality and new challenges.** Einstein, São Paulo, v. 6, n. S1, p. S1-S3, 2008.

GOLDING, D. N. **Reumatologia em medicina e reabilitação.** São Paulo, Ed. Atheneu, 1999.

GORDON, C. J. **Thermal biology of the laboratory rat.** Physiol. Behav., Oxford, v. 47, n. 5, p. 963-991, may 1990.

GRANADOS-SOTO, V.; TERÁN-ROSALES, F.; ROCHA-GONZÁLEZ, H. I.; REYES-GARCÍA, G.; MEDINA-SANTILLÁN, R.; RODRÍGUEZ-SILVERIO, J.; FLORES-MURRIETA, F. J. **Riboflavin reduces hyperalgesia and inflammation but not tactile allodynia in the rat.** Eur. J. Pharmacol., Amsterdam, v. 492, n. 1, p. 35-40, may 2004.

GREGERSEN, P. K.; SILVER, J.; WINCHESTER, R. J. **The shared epitope hypothesis. an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis.** Arthritis Rheum., Atlanta, v. 30, n. 11, p. 1205-1213, nov. 1987.

GRIFFIN, A. C.; WHITACRE, C. C. **Sex and strain differences in the circadian rhythm fluctuation of endocrine and immune function in the rat: implications for rodent models of autoimmune disease.** J. Neuroimmunol., Amsterdam, v. 35, n. 1-3, p. 53-64, dec. 1991.

GROSSER, T.; SMYTH, E.; FITZGERALD, A. G. **Pharmacokinetics and pharmacodynamics. The dynamics of drugs absorption, distribution, action, and elimination.** In: BRUNTON L.L.; CHABNER B.A.; KNOLLMANN B.C. (Eds.). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 12th ed. New York: McGraw-Hill, 2011. chap. 34, p. 959-1004.

GRUBB, B. D.; BIRRELL, G. J.; McQUEEN, D. S.; IGGO, A. **The role of PGE₂ in the sensitization of mechanoreceptors in normal and inflamed ankle joints of the rat.** Exp. Brain Res., London, v. 84, n. 2, p. 383-392, 1991.

GUERRERO, A. T. G.; VERRY, W. A. JR; CUNHA, T. M.; SILVA, T. A.; ROCHA, F. A. C.; FERREIRA, S. W.; CUNHA F. Q.; PARADA, C. A. **Hypernociception elicited by tibio-tarsal joints flexion in mice: A novel experimental arthritis model for pharmacological screening.** Pharmacol. Biochem. Behav., New York, v. 84, n. 2, p. 244-251, jun. 2006.

HAROON N.; INMAN R. D. **Infectious complications of biological therapy.** Curr. Opin. Rheumatol., Philadelphia, v. 21, n. 4, p. 397-403, jul. 2009.

HARRIS, J. R. E. D. **Clinical features of rheumatoid arthritis.** In: HARRIS, J. R. E. D.; BUDD, R. C.; FIRESTEIN, G. S.; GENOVESE, M. C.; SERGENT, J. S.; RUDDY S (Eds.) Kelleys Textbook of Rheumatology. 7th ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders 2005; 1043-100.

HEINECKE, J. W.; FRANCIS, G. A.; GOLDSTEIN, J. A. **Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins** J. Clin. Invest., New Haven, v. 91, n. 6, p. 2866–2872, jun. 1993.

HELYES, Z.; SZABÓ, A.; NÉMETH, J.; JAKAB, B.; PINTÉR, E.; BÁNVÖLGYI, A.; KERESKAI, L.; KÉRI, G.; SZOLCSÁNYI, J. **Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat.** Arthritis Rheum., Atlanta, v. 50, n. 5, p. 1677-1685, may 2004.

HILL, K.; YOU, D.; INOUE, M.; OESTERGAARD, M. Z. **Child mortality estimation: accelerated progress in reducing global child mortality, 1990–2010.** PLoS Med., San Francisco, v. 9, n. 8, e. 10011301, aug. 2012.

HILLMAN, R. S. **Hematopoietic agents. Growth factors, minerals, and vitamins.** in: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN, A. D. (Eds.). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. cap. 54, p.1487-1517.

HITCHON, C. A.; EL-GABALAWY, H. S. **Oxidation in rheumatoid arthritis.** Arthritis Res. Ther., London, v. 6, n. 6, p. 265-278, oct. 2004.

HOFFMAN, C.; RICE, D.; SUNG, H. Y. **Persons with chronic conditions: their prevalence and costs.** JAMA, Chicago, v. 276, n. 18, p. 1473-1479, nov. 1996.

HOLMDAHL, R. **Female preponderance for development of arthritis in rats is influenced by both sex chromosomes and sex steroids.** Scand. J. Immunol., Oxford, v. 42, n. 1, p. 104-109, jul. 1995.

HOOTMAN, J. M.; HELMICK, C. G.; BRADY, T. J. **A public health approach to addressing arthritis in older adults: the most common cause of disability.** Am. J. Public Health, New York, v. 102, n. 3, p. 426-433, mar. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE- **Perfil dos idosos responsáveis pelos domicílios.** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/25072002pidoso.shtm>> Acesso em: 30 mai. 2011.

JACOBSON, P. B.; MORGAN, S. J.; WILCOX, D. M.; NGUYEN, P.; RATAJCZAK, C. A.; CARLSON, R. P., HARRIS, R. R.; NUS, M. **A new spin on an old model: in vivo evaluation of disease progression by magnetic resonance imaging with respect to standard inflammatory parameters and histopathology in the adjuvant arthritic rat.** Arthritis Rheum., Atlanta, v. 42, n. 10, p. 2060-2073, oct.1999.

JORTNER, B.S.; CHERRY, J.; LIDSKY, T.I.; MANETTO, C.; SHELL, L. **Peripheral neuropathy of dietary riboflavin deficiency in chickens.** J. Neuropathol. Exp. Neurol., Baltimore, v. 46, n. 5, p. 544-555, sep. 1987.

JURNA, I. **Analgesic and analgesia-potentiating action of B vitamins.** Schmerz, Berlin, v. 12, n. 2, p. 136-141, apr. 1998.

KETTELHUT, I. C., GOLDEBERG, A. L. **Tumor necrosis factor can induce fever in rats without activating protein breakdown in muscle or lipolysis in adipose tissue.** J. Clin. Invest., New Haven, v. 81, n. 5, p. 1384-1389, may 1988.

KHURANA, R.; BERNEY, S. M. **Clinical aspects rheumatoid arthritis.** Phatophysiology, Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 153-165, oct. 2005.

KIM, E. Y.; MOUDGIL, K. D. **The determinants of susceptibility/resistance to adjuvant arthritis in rats.** Arthritis Res. Ther., London, v. 11, n. 4, p. 239, aug. 2009.

KITSIS, E.; WEISSMANN, G. **The role of the neutrophil in rheumatoid arthritis.** Clin. Orthop. Relat. Res., Philadelphia, v. 265, p. 63-72, apr. 1991.

KLIMIUK, P. A.; YANG, H.; GORONZY, J. J.; WEYAND, C. M. **Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent.** Clin. Immunol., Orlando, v. 90, n. 1, p. 65-78, jan. 1999.

KLUGER, M. J. **Fever: role of pyrogens and cryogens.** Physiol. Rev., Washington, v. 71, n. 1, p. 93-127, jan. 1991.

KOCH, A. E.; KUNKEL S. L.; HARLOW L. A.; MAZARAKIS, D. D.; HAINES, G. K.; BURDICK, M. D.; POPE, R. M.; STRIETER, R. M. **Macrophage inflammatory protein-1 alpha: a novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis.** J. Clin. Invest., New Haven, v. 93, n. 3, p. 921-928, mar. 1994a.

KOCH, A. E.; KUNKEL, S. L.; HARLOW, L. A.; MAZARAKIS, D. D.; HAINES, G. K.; BURDICK, M. D.; POPE, R. M.; WALZ, A.; STRIETER, R. M. **Epithelial neutrophil activating peptide-78: a novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis.** J. Clin. Invest., New Haven, v. 94, n. 3, p. 1012-1018, sep. 1994b.

KOHASHI, O.; KUWATA, J.; UMEHARA, K.; UMEHARA, F.; TAKAHASHI, T.; OZAWA, A. **Susceptibility to adjuvant-induced arthritis among germ-free specific pathogen-free and conventional rats.** Infect. Immun., Washington, v. 26, n. 3, p. 791-794, dec. 1979.

KONTUREK, S. J.; PIASTUCKI, I.; BRZozowski, T.; RADECKI, T.; DEMBINSKAKIEC, A.; ZMUDA, A.; GRYGLEWSKI, R. **Role of prostaglandins in the formation of aspirin-induced gastric ulcers.** Gastroenterology, Baltimore, v. 80, n. 1, p. 4-9, jan. 1981.

KORHONEN, R.; LAHTI, A.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. **Nitric oxide production and signaling in inflammation.** Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy, San Francisco, v. 4, n. 4, p. 471-479, aug. 2005.

KOVAR, M. G. **Health of the elderly and use of health services.** Public Health Rep., Ottawa, v. 92, n. 1, p. 9-19, jan. 1977.

KUKAR M.; PETRYNA, O.; EFTHIMIOU, P. **Biological targets in the treatment of rheumatoid arthritis: a comprehensive review of current and in-development biological disease modifying anti-rheumatic drugs.** Biologics, Auckland, v. 3, p. 443-457, out. 2009.

KVALVIK, A. G.; JONES, M. A.; SYMMONS, D. P. **Mortality in a cohort of Norwegian patients with rheumatoid arthritis followed from 1977 to 1992.** Scand. J. Rheumatol., Stockholm, v. 29, n. 1, p. 29-37, feb. 2000.

LAURINDO, I. M. M.; XIMENES, A. C.; LIMA, F. A. C.; PINHEIRO, G. R. C.; BATISTELLA, L. R.; ALENCAR, P.; XAVIER, R. M.; GIORGI, R. D. N.; CICONELLI, R. M.; RADOMINSKI, S. C. **Artrite reumatoide: diagnóstico e tratamento.** Rev. Bras. Reumatol., São Paulo, v. 44, n. 6, p. 435-442, nov-dez. 2004.

LE MAY, L. G.; VANDER, A. J.; KLUGER, M. J. **Role of interleukin-6 in fever in rats.** Am. J. Physiol., Washington, v. 258, n. 3, p. R798-803, mar. 1990.

LIMA, M. D.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; DE SANTANA, W. A.; MARTINS KANETO, C.; PEREIRA SOARES, M. B.; VILLARREAL, C. F. **Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10.** Eur. J. Pharmacol., Amsterdam, v. 699, n. 1-3, p.112–117, dec. 2012.

LIPSKY, P. E: **Rheumatoid arthritis.** In Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th edition. Edited by KASPER, D.; BRAUNWALD, E.; FAUCI, A.; HAUSER, S.; LONGO, D.; JAMESON, J. New York: McGraw-Hill; 2005:1968-1977.

MACKOWIAK, P. A.; BARTLETT, J. G.; BORDEN, E. C.; GOLDBLUM, S. E.; HASDAY, J. D.; MUNFORD, R. S.; NASRAWAY, S. A.; STOLLEY, P. D.; WOODWARD, T. E. **Concepts of fever: recent advances and lingering dogma.** Clin. Infect. Dis., Chicago, v. 25, n. 1, p. 119–138, jul. 1997.

MAL, P.; DUTTA, K.; BANDYOPADHYAY, D.; BASU, A.; KHAN, R.; BISHAYI, B. **Azithromycin in combination with riboflavin decreases the severity of *Staphylococcus aureus* infection induced septic arthritis by modulating the production of free radicals and endogenous cytokines.** Inflamm. Res., Basel, v. 62, n. 3, p. 259-273, mar. 2013.

MARCUS, R.; COULSTON, A. M. **Water-soluble vitamins. The vitamin B complex and ascorbic acid.** In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.D. (Eds.). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. cap. 63, p. 1753-1771.

MARSTON, B.; PALANICHAMY, A.; ANOLIK, J. H. **B cells in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis.** Curr. Opin. Rheumatol., Philadelphia, v. 22, n. 3, p. 307-315, may 2010.

MARTIN, P. R.; SINGLETON, C. K.; HILLER-STURMHÖFEL, S. **The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease.** Alcohol Res. Health., Washington, v. 27, n. 2, p. 134-142, 2003.

MASSEY, V. **The chemical and biological versatility of riboflavin.** Biochem. Soc. Trans., London, v. 28, n. 4, p. 283-96, may 2000.

MAZUR-BIALY, A. I.; KOLACZKOWSKA, E.; PLYTYCZ, B. **Modulation of zymosan-induced peritonitis by riboflavin co-injection, pre-injection or post-injection in male Swiss mice.** Life Sci., Oxford, v. 91, n. 25-26, p. 1351-1357, dec. 2012.

McINNIS, I. B.; SCHETT, G. **The pathogenesis of rheumatoid arthritis.** N. Engl. J. Med., Boston, v. 365, n. 23, p. 2205-2219, dec. 2011.

MEDINA SANTILLÁN, R.; REYES GARCÍA, G.; SÁNCHEZ MEJÍA, J. L.; MATEOS GARCÍA, E. **Dexamethasone alone versus dexamethasone plus complex B vitamins in the therapy of low back pain.** Proc. West. Pharmacol. Soc., Seattle, v. 43, p. 69-70, 2000.

MILLAN, M. J.; CZLONKOWSKI, A.; PILCHER, C. W.; ALMEIDA, O. F.; MILLAN, M. H.; COLPAERT, F. C.; HERZ, A. **A model of chronic pain in the rat: functional correlates of alterations in the activity of opioid systems.** J. Neurosci., Baltimore, v. 7, n. 1, p. 77-87, jan. 1987.

MILLAN, M. J. **The induction of pain: an integrative review.** Prog. Neurobiol., Oxford, v. 57, n. 1, p. 1-164, jan. 1999.

MIOSSEC, P. **An update on the cytokine network in rheumatoid arthritis.** Curr. Opin. Rheumatol., Philadelphia, v. 16, n. 3, p. 218-222, may 2004.

MIXCOATL-ZECUATL, T.; QUINONEZ-BASTIDAS, G. N.; CARAM-SALAS, N. L.; AMBRIZ-TUTUTI, M.; ARAIZA-SALDANA, C. I.; ROCHA-GONZALEZ, H. I.; MEDINA-SANTILLAN, R.; REYES-GARCIA, G.; GRANADOS-SOTO, V. **Synergistic antiallodynic interaction between gabapentin or carbamazepine and either benfotiamine or cyanocobalamin in neuropathic rats.** Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol., Barcelona, v. 30, n. 6, p. 431-441, jul-aug. 2008.

MOALLEM, S. A.; HOSSEINZADEH, H.; FARAHI, S. **A study of acute and chronic anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of thiamine in mice.** Iran. Biomed. J., Tehran, v. 12, n. 3, p. 173-178, jul. 2008.

MONTAGNA, P.; CORTELLI, P.; BARBIROLI, B. **Magnetic resonance spectroscopy studies in migraine.** Cephalalgia, London, v. 14, n. 3, p. 184-193, jun. 1994.

MORIMOTO, A.; SAKATA, Y.; WATANABE, T.; MURAKAMI, N. **Characteristics of fever and acute-phase response induced in rabbits by IL-1 and TNF.** Am. J. Physiol., Washington, v. 256, n. 1, p. 35-41, jan. 1989.

MOTA, L. M. H.; CRUZ, B. A.; BRENOL, C. V.; PEREIRA, I. A.; FRONZA, L. S. R.; BERTOLO, M. B.; FREITAS, M. V. C.; SILVA, N. A.; LOUZADA-JR, P.; GIORGI, R. D. N.; LIMA, R. A. C.; PINHEIRO, G. R. C. **Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para tratamento da artrite reumatoide.** Rev. Bras. Reumatol., São Paulo, v. 52, n. 2, p. 135-174, dez. 2011.

MUTRU, O.; LAAKSO, M.; ISOMÄKI, H.; KOOTA, K. **Ten year mortality and causes of death in patients with rheumatoid arthritis.** Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.), London, v. 290, n. 6484, p. 1797-1799, jun. 1985.

NAGAKURA, Y.; OKADA, M.; KOHARA, A.; KISO, T.; TOYA, T.; IWAI, A.; WANIBUCHI, F.; YAMAGUCHI, T. **Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: time course of progression and efficacy of analgesics.** J. Pharmacol. Exp. Ther., Baltimore, v. 306, n. 2, p. 490-497, aug. 2003.

NAIK, S. R.; RUPAWALLA, E. N.; SHETH, U. K. **Anti-inflammatory activity of thiamine and nicotinic acid.** Biochem. Pharmacol., Oxford, v. 19, p. 2867-2873, apr. 1970.

NAKAEMA, N. M. K.; FRACASSO, J. F.; LONGO, M. C.; SIQUEIRA, C. E.; GODÓI, P. H. B.; RODRIGUES, L. A. **Potentiating effect of treatment with some B vitamins on the anti-inflammatory and antinociceptive properties of diclofenac and thalidomide.** Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., São Paulo, v. 26, n. 3, p. 189-193, 2005.

NAKAGAWASAI, O.; TADANO, T.; TAN-NO, K.; HOZUMI, S.; TANIGUCHI, R.; NIIJIMA, F.; ASAO, T.; KINEMUCHI, H.; ARAI, Y.; YASUHARA, H.; KISARA, K. **Antinociceptive effect following dietary-induced thiamine deficiency in mice: involvement of substance P and somatostatin.** Life Sci., Oxford, v. 69, n. 10, p. 1155-1166, jul. 2001.

NAUSEEF, W. M.; OLSSON, I.; ARNLJOTS, K. **Biosynthesis and processing of myeloperoxidase - A marker for myeloid cell differentiation.** Eur. J. Haematol., Copenhagen, v. 40, n. 2, p. 97-110, feb. 1988.

NOURI, A. M.; PANAYI, G. S.; GOODMAN, S. M. **Cytokines and the chronic inflammation of rheumatic disease. I. The presence of interleukin-1 in synovial fluids.** Clin. Exp. Immunol., Oxford, v. 55, n. 2, p. 295-302, feb. 1984.

NOWOSSADECK, E. **Population aging and hospitalization for chronic disease in germany.** Dtsch. Arztebl. Int., Cologne, v. 109, n. 9, p. 151-157, mar. 2012.

OLIVEIRA, P. G.; BRENOL, C. V.; EDELWEISS, M. I.; MEURER, L.; BRENOL, J. C. T.; XAVIER, R. M. **Subcutaneous inflammation (panniculitis) in tibio-tarsal joint of rats inoculated with complete Freund's adjuvant.** Clin. Exp. Med., Milano, v. 7, n. 4, p. 184-187, dec. 2007.

OLIVEIRA, P. G.; BRENOL, C. V.; EDELWEISS, M. I.; BRENOL, J. C.; PETRONILHO, F.; ROESLER, R.; DAL-PIZZOL, F.; SCHWARTSMANN, G.; XAVIER, R. M. **Effects of an antagonist of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats.** Peptides, New York, v. 29, n. 10, p. 1726-1731, oct. 2008.

PEARSON, C. M. **Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats give adjuvants.** Proc. Soc. Exp. Biol. Med., Malden, v. 91, n. 1, p. 95-101, jan. 1956.

PHADKE, K.; FOUTS, R. L.; PARRISH, J. E.; BUTLER, L. D. **Evaluation of the effects of various anti-arthritic drugs on type II collagen-induced mouse arthritis model.** Immunopharmacology, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 51-60, aug. 1985.

PHILIPPE, L.; GEGOUT- POTTIE, P.; GUINGAMP, C.; BORDJI, K.; TERLAIN, B.; NETTER, P.; GILLET, P. **Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats.** Am. J. Physiol., Washington, v. 273, n. 4, p. R1550-1556, oct. 1997.

PINTO, J.; HUANG, Y.P.; RIVLIN, R.S. **Inhibition of riboflavin metabolism in rat tissues by chlorpromazine, imipramine, and amitriptyline.** J. Clin. Invest., Ann Arbor, v. 67, n. 5, p. 1500-1506, may 1981.

PINTO, J.; RAICZYK, G.B.; HUANG, Y.P.; RIVLIN, R.S. **New approaches to the possible prevention of side effects of chemotherapy by nutrition.** Cancer, Hoboken, v. 58, suppl. 8, p. 1911-1914, oct. 1986.

POWERS, H.J. **Riboflavin (vitamin B-2) and health.** Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v. 77, n. 6, p. 1352-1360, jun. 2003.

RAVELLI, A; MARTINI, A. **Juvenile idiopathic arthritis.** Lancet, London, v. 369, n. 9563, p. 767-778, mar. 2007.

REGINSTER, J. Y. **The prevalence and burden of arthritis.** Rheumatol., Oxford, v. 41, suppl.1, p. 3-6, apr. 2002.

RELAÇÃO NACIONAL DE MEDICAMENTOS ESSENCIAIS – **RENAME.** Ministério da Saúde. Brasil. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/anexos_rename_2012_pt_533_11_06_2012.pdf. Acessado em : janeiro 2013.

REYES-GARCÍA, G.; MEDINA-SANTILLÁN, R.; TERÁN-ROSALES, F.; MATEOS-GARCÍA, E.; CASTILLO-HENKEL, C. **Characterization of the potentiation of the antinociceptive effect of diclofenac by vitamin B complex in the rat.** J. Pharmacol. Toxicol. Methods, New York, v. 42, n. 2, p. 73-77, oct. 1999.

REYES-GARCÍA, G.; MEDINA-SANTILLÁN, R.; ROCHA-GONZÁLEZ, H. I., GRANATOS-SOTO, V. **Synergistic interaction between spinal gabapentin and oral B vitamins in a neuropathic pain model.** Proc. West. Pharmacol. Soc., Seattle, v. 46, p. 91-94, 2003.

REYES-GARCÍA, G.; CARAM-SALAS, N. L.; MEDINA-SANTILLÁN, GRANATOS-SOTO, V. **Oral administration of B vitamins increases the antiallodynic effect of gabapentin in the rat.** Proc. West. Pharmacol. Soc., Seattle, v. 47, p. 76-79, 2004.

RIBOFLAVIN MONOGRAPH. Altern. Med Rev., Idaho, v. 13, n. 4, p. 334-40, dec. 2008.

ROBERTS II, L. J.; MORROW, J. D. **Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout.** In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN, A. D. (Eds.). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. cap. 27, p. 687-731.

ROSENBERG, A. E. **Ossos, Articulações e Tumores de Tecidos Moles.** In: KUMAR, V; ABBAS, A. K; FAUSTO, N. (Eds.) Robbins & Cotran: Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. cap. 26, p. 1365-1370.

ROTH, J. **Endogenous antipyretics.** Clin. Chim. Acta, Amsterdam, v. 371, n. 1-2, p. 13-24, sep. 2006.

SCHAIBLE, H. G.; GRUBB, B. D. **Afferent and spinal mechanisms of joint pain.** Pain, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 5-54, oct. 1993.

SCHAIBLE, H. G.; SCHMIDT, R. F. **Mechanosensitivity of joint receptors with fine afferent fiber.** Exp. Brain Res., v. 9, p. 284-297, 1984.

SCHIMMER, B. P.; FUNDER, J. W. **Pharmacokinetics and pharmacodynamics. The dynamics of drugs absorption, distribution, action, and elimination.** In: BRUNTON L.L.; CHABNER B.A.; KNOLLMANN B.C. (Eds.). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 12th ed. New York: McGraw-Hill, 2011. chap. 42, p. 1209-1235.

SCHÖENEN, J.; JACQUY, J.; LENAERTS, M. **Effectiveness of high-dose riboflavin in migraine prophylaxis. A randomized controlled trial.** Neurology, Minneapolis, v. 50, n. 2, p. 466-470, feb. 1998.

SEEKAMP, A.; HULTQUIST, D. B.; TILL, G. O. **Protection by vitamin B₂ against oxidant-mediated acute lung injury.** Inflamm., New York, v. 23, n. 5, p. 449-460, oct. 1999.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. **Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Washington, v. 91, n. 25, p. 12013-7, dec.1994.

SENNA, E. R.; BARROS, A. L.; SILVA, E. O.; COSTA, I. F.; PEREIRA, L. V. B.; CICONELLI, R. M.; FERRAZ, M. B. **Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach.** J. Rheumatol., Toronto, v. 31, n. 3, p. 594-597, mar. 2004.

SHOEB, M.; RAMANA, K. V. **Anti-Inflammatory effects of benfotiamine are mediated through the regulation of arachidonic acid pathway in macrophages.** Free Radic. Biol. Med., New York, v. 52, n. 1, p. 182-190, jan. 2012.

SKARE, T. L. **Reumatologia: Princípios e práticas.** 1^a ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. São Paulo, 1999.

SNEKHALATHA, U.; ANBURAJAN, M.; VENKATRAMAN, B.; MENAKA, M. **Evaluation of complete Freund's adjuvant-induced arthritis in a Wistar rat model: comparison of thermography and histopathology.** Z. Rheumatol., Darmstadt, p. 1-7, dec. 2012.

SONG, X. S.; HUANG, Z. J.; SONG, X. J. **Thiamine suppresses thermal hyperalgesia, inhibits hyperexcitability, and lessens alterations of sodium currents in injured, dorsal root ganglion neurons in rats.** Anesthesiology, Philadelphia, v. 110, n. 2, p. 387-400, feb. 2009.

SOTO, H.; HEVEZI, P.; ROTH, R. B.; PAHUJA, A.; ALLEVA, D.; ACOSTA, H. M.; MARTINEZ, C.; ORTEGA, A.; LOPEZ, A.; ARAIZA-CASILLAS, R.; ZLOTNIK, A. **Gene array analysis comparison between rat collagen-induced arthritis and human rheumatoid arthritis**. *Scand. J. Immunol.*, Oxford, v. 68, n. 1, p. 43-57, jul. 2008.

SOUZA, A. C. S. D.; FERREIRA, C. V.; JUCÁ, M. B.; AOYAMA, H.; CAVAGIS, A. D. M.; PEPPELENBOSCH, M. P. **Riboflavina: uma vitamina multifuncional**. *Quím. Nov.*, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 887-891, sep-oct. 2005.

STAMP, L. K.; KHALILOVA, I.; TARR, J. M.; SENTHILMOHAN, R.; TURNER, R.; HAIGH, R. C.; WINYARD, P. G.; KETTLE, A. J. **Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis**. *Rheumatology*, Oxford, v. 51, n. 10, p. 1796-1803, oct. 2012.

STEIN, C.; MILLAN, M. J.; HERZ, A. **Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation alterations in behavior and nociceptive thresholds**. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, New York, v. 31, n. 2, p. 445-451, oct. 1988.

SUAREZ-ALMAZOR, M. E.; TAO, S.; MOUSTARAH, F.; RUSSELL, A. S.; MAKSYMOWYCH, W. **HLA-DR1, DR4, and DRB1 disease related subtypes in rheumatoid arthritis. Association with susceptibility but not severity in a city wide community based study**. *J. Rheumatol.*, Toronto, v. 22, n. 11, p. 2027-2033, nov. 1995.

SUZUKI, Y.; TANIHARA, M.; ICHIKAWA, Y.; OSANAI, A.; NAKAGAWA, M.; IDE, M.; MIZUSHIMA, Y. **Periarticular osteopenia in adjuvant induced arthritis: role of interleukin-1 in decreased osteogenic and increased resorptive potential of bone marrow cells**. *Ann. Rheum. Dis.*, London, v. 54, n. 6, p. 484-490, jun. 1995.

SZEKANECZ, Z.; SZEGEDI, G.; KOCH, A. E. **Angiogenesis in rheumatoid arthritis: pathogenic and clinical significance**. *J. Investig. Med.*, New Jersey, v. 46, n. 2, p. 27-41, feb. 1998a.

SZEKANECZ, Z.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L.; KOCH, A. E. **Chemokines in rheumatoid arthritis**. *Springer Semin. Immunopathol.*, Berlin, v. 20, n. 1-2, p. 115-132, mar. 1998b.

SZEKANECZ, Z.; HALLORAN, M. M.; VOLIN, M. V.; WOODS, J. M.; STRIETER, R. M.; KENNETH, HAINES, G. 3rd.; KUNKEL, S. L.; BURDICK, M. D.; KOCH, A. E. **Temporal expression of inflammatory cytokines and chemokines in rat adjuvant-induced arthritis**. *Arthritis Rheum.*, Atlanta, v. 43, n. 6, p. 1266-1277, jun. 2000.

SZEKANECZ, Z.; KOCH, A. E. **Chemokines and angiogenesis**. *Curr. Opin. Rheumatol.*, Philadelphia, v. 13, n. 3, p. 202-208, may 2001.

SZEKANECZ, Z.; GÀSPÁR, L.; KOCH, A. E. **Angiogenesis in rheumatoid arthritis**. *Front. Biosci.*, Nova York, v. 10, p. 1739-1753, may 2005.

SZEKANECZ, Z.; KOCH, A. E. **Macrophages and their products in rheumatoid arthritis**. *Curr. Opin. Rheumatol.*, Philadelphia, v. 19, n. 3, p. 289-295, may 2007.

TAYLOR, P. C. **The value of sensitive imaging modalities in rheumatoid arthritis**. *Arthritis Res. Ther.*, London, v. 5, n. 5, p. 210-213, jul. 2003.

TEGEDER, I.; PFEILSCHIFTER, J.; GEISLINGER, G. **Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors**. *FASEB J.*, Bethesda, v. 15, n. 12, p. 2057-2072, oct. 2001.

THIAMINE MONOGRAPH. *Altern. Med. Rev.*, Idaho, v. 8, n. 1, p. 59-62, dec. 2003.

THOMAZZI, S. M.; SOUZA, M. H.; MELO-FILHO, A. A.; HEWLETT, E. L.; LIMA, A. A.; RIBEIRO, R. A. **Pertussis toxin from *Bordetella pertussis* blocks neutrophil migration and neutrophil-dependent edema in response to inflammation**. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 120-124, jan. 1995.

TORIGOE, D. Y.; LAURINDO, I. M. M. **Artrite reumatoide e doenças cardiovasculares**. *Rev. Bras. Reumatol.*, São Paulo, v. 46, supl. 1, p. 60-66, apr. 2006.

TSUNEYAMA, K.; NOSE, M.; NISHIHARA, M.; KATAYANAGI, K.; HARADA, K.; NAKANUMA, Y. **Spontaneous occurrence of chronic non-suppurative destructive cholangitis and antimitochondrial autoantibodies in MRL/lpr mice: possible animal model for primary biliary cirrhosis**. *Pathol. Int.*, Carlton South, v. 51, n. 6, p. 418-424, jun. 2001.

VAN DE LANGERIJT, A. G.; VAN LENT, P. L.; HERMUS, A. R.; SWEEP, C. G.; COOLS, A. R.; VAN DEN BERG, W. B. **Susceptibility to adjuvant arthritis: relative importance of adrenal activity and bacterial flora**. *Clin. Exp. Immunol.*, Oxford, v. 97, n. 1, p. 33-38, jul. 1994.

VANE, J. R. **Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin-like drugs**. *Nature New Biol.*, London, v. 231, n. 25, p. 232-235, jun. 1971.

VANE, J. R. **Introduction: mechanism of action of NSAIDs**. *Br. J. Rheumatol.*, London, v. 35, Suppl 1, p.1-3, apr. 1996.

VASSILOPOULOS D.; CALABRESE, L. H. **Risks of immunosuppressive therapies including biologic agents in patients with rheumatic disease and coexisting chronic viral infections**. *Curr. Opin. Rheumatol.*, Philadelphia, v. 19, n. 19, p. 619-625, nov. 2007.

VERDRENCH, M.; TARKOWSKI, A. **Riboflavin in innate and acquired immune responses**. *Inflamm. Res.*, Basel, v. 54, n. 9, p. 390-393, sep. 2005.

VERHOEF, C.; VAN ROON, J. A. G.; VIANEN, M.; LAFEBER, F.; BIJLSMA, E. J. **The immune suppressive effect of dexamethasone in rheumatoid arthritis is accompanied by upregulation of interleukin 10 and by differential changes in interferon γ and interleukin 4 production.** Ann. Rheum. Dis., London, v. 58, n. 1, p. 49-54, jan. 1999.

VINGSBO, C.; SAHLSTRAND, P.; BRUN, J. G.; JONSSON, R.; SAXNE, T.; HOLMDAHL, R. **Pristane-induced arthritis with a chronic disease course influenced by both major histocompatibility complex genes.** Am. J. Pathol., Philadelphia, v. 149, n. 5, p. 1675-1683, nov. 1996.

WANG, Z. B.; GAN, Q.; RUPERT, R. L.; ZENG, Y. M.; SONG, X. J. **Thiamine, pyridoxine, cyanocobalamin and their combination inhibit thermal, but not mechanical hyperalgesia in rats with primary sensory neuron injury.** Pain, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 266-277, mar. 2005.

WASSENBERG, S.; RAU, R.; STEINFELD, P.; ZEIDLER, H. **Very low-dose prednisolone in early rheumatoid arthritis retards radiographic progression over two years: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial.** Arthritis Rheum., Atlanta, v. 52, n. 11, p. 3371-3380, nov. 2005.

WASSENBERG, S.; RAU, R.; ZEIDLER, H. **A dose of only 5 mg prednisolone daily retards radiographic progression in early rheumatoid arthritis - the Low-Dose Prednisolone Trial.** Clin. Exp. Rheumatol., Pisa, v. 5, n. 68, p. 68-72, sep. 2011.

WHITEHOUSE, M. W. **Adjuvant arthritis 50 years on: The impact of the 1956 article by C. M. Pearson, "Development of the arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvant".** Inflamm. Res., Basel, v. 56, p. 133-138, apr. 2007.

WILLIAMS, R. O.; FELDMANN, M.; MAINI, R. N. **Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 89, n. 20, p. 9784-9788, oct. 1992.

WILSON, A. W.; MEDHURST, S. J.; DIXON, C. I.; BONTOLT, N. C.; WINYARD, L. A.; BRACKENBOROUGH, K. T.; ALBA, J. D.; CLARKE, C. J.; GHUNTORPE, M. J.; HICKS, G. A.; BOUNTRA, C.; McQUEEN, D. S.; CHESSELL, I. P. **An animal model of chronic inflammatory pain: pharmacological and temporal differentiation from acute models.** Eur. J. Pain, London, v. 10, n. 6, p. 537-549, aug. 2006.

WIPKE, B. T.; ALLEN, P. M. **Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis.** J. Immunol., Baltimore, v. 167, n. 3, p. 1601-1608, aug. 2001.

WOLFF, J. L.; STARFIELD, B.; ANDERSON, G. **Prevalence, expenditures, and complications of multiple chronic conditions in the elderly.** Arch. Intern. Med., Chicago, v. 162, n. 20, p. 2269-2276, nov. 2002.

WORDSWORTH, P.; BELL, J. **Polygenic susceptibility in rheumatoid arthritis.** Ann. Rheum. Dis., London , v. 50, n. 6, p. 343-346, jun. 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO **Model List. Essential Medicines** 17th edition. Disponível em < http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/a95053_eng.pdf> Acessado em: mar. 2011.

YOSHINO, S.; CLELAND, L. G. **Depletion of alfa/beta T cells by a monoclonal antibody against of alfa/beta T cells receptor suppresses established adjuvant arthritis, but not established collagen-induced arthritis in rats.** J. Exp. Med., New York, v. 175, n. 4, p. 907-915, apr. 1992.

YU, Y. C.; KOO, S. T.; KIM, C. H.; LYU, Y.; GRADY, J. J.; CHUNG, J. M. **Two variables that can be used as pain indices in experimental animal models of arthritis.** J. Neurosci. Methods, Amsterdam, v. 115, n. 1, p. 107-113, mar. 2002.

ZHANG, L.; MIA, M. Y.; HOSSAIN, M. A.; YAMASAKI, F.; TOKUNAGA, O.; KOHASHI, O. **The preventive effects of incomplete Freund's adjuvant and other vehicles on the development of adjuvant-induced arthritis in Lewis rats.** Immunology, Oxford, v. 98, n. 2, p. 267-272, oct. 1999.

ZHANG, W.; BANSBACK, N.; BOONEN, A.; YOUNG, A.; SINGH, A.; ANIS, A. H. **Validity of the work productivity and activity impairment questionnaire--general health version in patients with rheumatoid arthritis.** Arthritis Res. Ther., London, v. 12, n. 5, R 177, p. 1-7, sep. 2010.

ZHENG, C.; HOSSAIN, A.; KUKITA, A.; OHKI, K.; SATOH, T.; KOHASHI, O. **Complete Freund's Adjuvant supresses the development and progression of pristane-induced arthritis in rats.** Clin. Immunol., Orlando, v. 103, n. 2, p. 204-209, may 2002.

ZIMMERMANN, M. **Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals.** Pain, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 109-110, jun.1983.