

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA**

**FELIPE FERNANDES RODRIGUES**

**ATIVIDADES DA CLINDAMICINA E DE UM ANÁLOGO ACETILADO EM  
MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO ARTICULAR**

**BELO HORIZONTE - MG**

**2021**

**FELIPE FERNANDES RODRIGUES**

**ATIVIDADES DA CLINDAMICINA E DE UM ANÁLOGO ACETILADO EM  
MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO ARTICULAR**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obter o grau de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Renes de Resende Machado

Coorientador: Dr. Márcio de Matos Coelho

**BELO HORIZONTE - MG**

**2021**

R696a Rodrigues, Felipe Fernandes.  
Atividades da clindamicina e de um análogo acetilado em modelos experimentais de inflamação articular [recurso eletrônico] / Felipe Fernandes Rodrigues. – 2021.  
1 recurso eletrônico (104 f.) : pdf

Orientador: Renes de Resende Machado.

Coorientador: Márcio de Matos Coelho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Clindamicina – Teses. 2. Antimicrobianos – Teses. 3. Inflamação – Teses. 4. Dor – Teses. 5. Infiltração de neutrófilos – Teses. 6. Fator de necrose tumoral alfa – Teses. I. Machado, Renes de Resende. II. Coelho, Márcio de Matos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615

Elaborado por Aline Guimarães Amorim – CRB-6/2292



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

**ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO FELIPE FERNANDES RODRIGUES**

Realizou-se, no dia 18 de novembro de 2021, às 13:30 horas, por videoconferência, a 157ª defesa de tese, intitulada *ATIVIDADES DA CLINDAMICINA E DE UM ANÁLOGO ACETILADO EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO ARTICULAR*, apresentada por FELIPE FERNANDES RODRIGUES, número de registro 2017712951, graduado no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Renes de Resende Machado - Orientador (UFMG), Prof(a). Márcio de Matos Coelho - Coorientador (UFMG), Prof(a). David do Carmo Malvar (UFRRJ), Prof(a). Raquel Silva Araújo (UFOP), Prof(a). Caryne Margotto Bertollo (UFMG), Prof(a). Paulo Sérgio de Almeida Augusto (UFMG).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.  
Belo Horizonte, 18 de novembro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **David do Carmo Malvar, Usuário Externo**, em 18/11/2021, às 17:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Caryne Margotto Bertollo, Professora do Magistério Superior**, em 18/11/2021, às 17:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renes de Resende Machado, Professor do Magistério Superior**, em 18/11/2021, às 17:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Silva Araújo, Usuário Externo**, em 18/11/2021, às 17:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Sérgio de Almeida Augusto, Usuário Externo**, em 22/11/2021, às 09:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcio de Matos Coelho, Chefe de departamento**, em 29/11/2021, às 11:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1079810** e o código CRC **0DCC67EC**.

## **Dedico o grau de Doutor**

Aos meus pais, Dimas e Lourdes

À minha avó, Rosinha

Às minhas irmãs, Gabriela e Débora

Ao meu sobrinho Samuel Lelo

E ao Lucas Marques

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me ajudado a chegar onde almejei.

A minha família e aos amigos que sempre estiveram ao meu lado de modo a apoiar minhas decisões e dando força para continuar.

A Universidade Federal de Minas Gerais e à Faculdade de Farmácia, que me concederam conhecimento e suporte para que esse trabalho fosse realizado.

Aos meus colegas de trabalho, por todos momentos de ajuda e diversão que vivemos nestes últimos quatro anos, em especial, Ivo, Sarah e Marcela.

À Maria Adelaide Fernandes, pelo apoio e cooperação, indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos colaboradores deste projeto tais como Renata Barbosa, Cleudiomar Inácio, Flávio Amaral, Vívian Oliveira, Lirlândia Sousa, Isabella Zaidan, Maria Alves, Ygor da Costa e Nicole Moreira.

Aos meus orientadores, Renes e Márcio, por todo apoio e orientação.

Às agências de fomento, pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

Ao CNPq, FAPEMIG e à Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG, pelo auxílio financeiro.

*“ O mistério gera curiosidade e a curiosidade é a base do desejo humano para compreender”.*

*Neil Armstrong*

## RESUMO

A clindamicina, antimicrobiano pertencente ao grupo farmacológico das lincosamidas, além de sua atividade antimicrobiana, exibe atividades em modelos de dor aguda e crônica e inflamação, indicando que os efeitos imunomoduladores podem contribuir para um potencial farmacológico mais amplo. No presente estudo, investigamos os efeitos da clindamicina e de um derivado acetilado da clindamicina (DAC) em modelos experimentais de inflamação articular aguda e em um ensaio microbiológico. A inflamação das articulações foi induzida por injeção intra-articular (i.a.) de zimosano (50 µg) ou cristais de urato monossódico (UMS; 100 µg) em camundongos. Clindamicina ou DAC foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) 1 h antes da injeção de zimosano ou UMS. Além disso, foi avaliado o efeito induzido pela clindamicina administrada 1 h após a injeção de zimosano. Foram avaliados o limiar de retirada da pata, o diâmetro da articulação, o recrutamento de neutrófilos, a atividade da mieloperoxidase, a produção de citocinas como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-1 e a fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$ . Um ensaio *in vitro* foi usado para avaliar os efeitos induzidos pela clindamicina ou DAC sobre a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos murinos RAW264.7 estimulados com zimosano. Um ensaio microbiológico *in vitro* foi usado para avaliar a atividade da clindamicina e DAC. A clindamicina, mas não o DAC, exibiu atividade contra as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Typhimurium* ATCC®. A administração de clindamicina aumentou o limiar nociceptivo e reduziu o edema articular induzido por zimosano. A atividade da clindamicina (400 mg/kg) no modelo de alodínia mecânica induzida por zimosano foi atenuada pela administração prévia de naltrexona, mas não pela glibenclamida ou AM251. A administração de clindamicina (400 mg/kg) ou DAC (436 mg/kg) aumentou o limiar nociceptivo e reduziu o edema articular, o recrutamento de neutrófilos, a atividade da mieloperoxidase, a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-1 e a fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$ . A clindamicina e o DAC inibiram a produção *in vitro* de TNF- $\alpha$  por macrófagos RAW264.7. A injeção i.a de UMS reduziu o limiar nociceptivo e induziu edema articular por 24 h, efeitos que foram reduzidos pela administração i.p. de clindamicina (400 mg/kg). Em resumo, fornecemos uma demonstração adicional dos efeitos imunomoduladores da clindamicina, cujo mecanismo foi associado à redução da produção de citocinas, do recrutamento de neutrófilos e da atividade do NF- $\kappa$ B. Tais efeitos foram estendidos ao DAC, o qual apresentou atividade antimicrobiana reduzida, indicando que os derivados de



clindamicina devem ser investigados como candidatos a fármacos que poderiam ser úteis no tratamento de condições inflamatórias e dolorosas.

Palavras-chave: clindamicina; derivado acetilado de clindamicina; inflamação; dor; recrutamento de neutrófilos; fator de necrose tumoral- $\alpha$ ; I $\kappa$ B $\alpha$ .

## ABSTRACT

Clindamycin, a lincosamide antimicrobial, in addition to its antimicrobial activity, exhibits activities in models of acute and chronic pain and inflammation, indicating that immunomodulatory effects may contribute to a broader pharmacological potential. In the present study, we investigated the effects of clindamycin and a clindamycin acetylated derivative (CAD) in experimental models of acute joint inflammation and in a microbiological assay. Joint inflammation was induced by intra-articular injection (i.a.) of zymosan (50 µg) or monosodium urate (MSU; 100 µg) in mice. Clindamycin or CAD were administered intraperitoneally (i.p.) 1 h before injection of zymosan or MSU. In addition, the effect of clindamycin administered 1 h after zymosan injection was evaluated. The paw withdrawal threshold, joint diameter, neutrophil recruitment, myeloperoxidase activity, cytokine production such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 and CXCL-1, and the phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  were evaluated. An *in vitro* assay was used to evaluate the effects induced by clindamycin or ACD on TNF- $\alpha$  production by zymosan-stimulated RAW264.7 cells. An *in vitro* microbiological assay was used to evaluate the activity of clindamycin and CAD. Clindamycin, but not CAD, exhibited activity against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Typhimurium* ATCC® strains. Clindamycin administration increased the nociceptive threshold and reduced zymosan-induced joint edema. The activity of clindamycin (400 mg/kg) in the zymosan-induced mechanical allodynia model was attenuated by prior administration of naltrexone, but not by glibenclamide or AM251. Administration of clindamycin (400 mg/kg) or CAD (436 mg/kg) increased the nociceptive threshold and reduced joint edema, neutrophil recruitment, myeloperoxidase activity, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 production, CXCL-1 and the phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$ . Clindamycin and CAD inhibited the *in vitro* production of TNF- $\alpha$  by RAW264.7 macrophages. The i.a injection of MSU reduced the nociceptive threshold and induced joint edema for 24 h, effects that were reduced by the i.p. administration of clindamycin (400 mg/kg). In summary, we provide additional demonstration of the immunomodulatory effects of clindamycin. These effects may be associated with reduced cytokine production, neutrophil recruitment and NF- $\kappa$ B activity. Such effects were extended to CAD, which exhibited reduced antimicrobial activity. These results indicate that clindamycin derivatives should be investigated as

drug candidates that could be useful in the treatment of inflammatory and painful conditions.

Keywords: clindamycin; clindamycin acetylated derivative; inflammation; pain; neutrophil recruitment; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; I $\kappa$ B $\alpha$ .

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática de uma articulação normal e uma articulação com sinovite e alteação erosiva.....	20
<b>Figura 2:</b> Estrura molecular da clindamicina.....	30
<b>Figura 3:</b> Analgesímetro digital utilizado para avaliação da alodínia mecânica; aparato e forma da avaliação da alodínia.....	43
<b>Figura 4:</b> Paquímetro digital utilizado para medida do diâmetro articular.....	43
<b>Figura 5:</b> Síntese do análogo de clindamicina (DAC).....	50
<b>Figura 6:</b> Diâmetro articular e limiar nociceptivo após administração intrarticular de salina estéril ou zimosano.....	52
<b>Figura 7:</b> Efeito induzido por clindamicina sobre o edema articular induzido por zimosano.....	54
<b>Figura 8:</b> Efeito induzido por clindamicina sobre a alodínia mecânica induzida por zimosano.....	55
<b>Figura 9:</b> Efeito induzido por clindamicina sobre o edema articular induzido por zimosano.....	57
<b>Figura 10:</b> Efeito induzido por clindamicina sobre a alodínia mecânica induzida por zimosano.....	58
<b>Figura 11:</b> Efeito induzido por naltrexona sobre a atividade antialodínica da clindamicina.....	60

<b>Figura 12:</b> Efeito induzido por glibenclamida sobre a atividade antialodínica da clindamicina .....	62
<b>Figura 13:</b> Efeito induzido por AM251 sobre a atividade antialodínica da clindamicina.....	63
<b>Figura 14:</b> Efeito induzido por DAC sobre o edema articular induzido por zimosano.....	65
<b>Figura 15:</b> Efeito induzido por DAC sobre a alodínia mecânica induzida por zimosano.....	66
<b>Figura 16:</b> Efeito induzido por clindamicina ou DAC sobre as concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6 no tecido periarticular coletado na 24 <sup>a</sup> h .....	68
<b>Figura 17:</b> Efeito induzido por clindamicina ou DAC sobre a concentração de CXCL-1 no tecido periarticular coletado na 24 <sup>a</sup> h .....	69
<b>Figura 18:</b> Efeito induzido por clindamicina ou DAC sobre a produção de TNF- $\alpha$ em cultura de células RAW264.7.....	70
<b>Figura 19:</b> Efeito induzido por clindamicina ou DAC sobre os níveis de I $\kappa$ B $\alpha$ fosforilado induzidos por zimosano.....	71
<b>Figura 20:</b> Efeito induzido por clindamicina ou DAC sobre sobre o número total de células, neutrófilos e mononucleares no lavado obtido da cavidade articular após 24 h da injeção i.a. de zimosano.....	72
<b>Figura 21:</b> Efeito induzido por clindamicina sobre a atividade de MPO no tecido periarticular após 24 h da injeção i.a. de zimosano.....	73
<b>Figura 22:</b> Diâmetro articular e limiar nociceptivo após administração intrarticular de salina estéril ou UMS.....	74
<b>Figura 23:</b> Efeito induzido por clindamicina, dexametasona ou veículo sobre o edema articular induzido por UMS.....	76

**Figura 24:** Efeito induzido por clindamicina, dexametasona ou veículo sobre a alodínia mecânica induzida por UMS.....77

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Valores de Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima obtidos com clindamicina (CLI), derivado acetilado de clindamicina (DAC) e ampicilina (AMP) frente às cepas de referência ATCC® testadas .....51

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIES - Anti-inflamatório esteroide

AINES - Anti-inflamatório não esteroide

ATCC - American Type Culture

BSA - Albumina sérica bovina

CBM- Concentração bactericida mínima

CFA - Adjuvante completo de Freund

CIM - Concentração inibitória mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CMC - Carboximetilcelulose

COX - Ciclooxigenase

CXC - Família de quimiocina com dois resíduos de cisteína separados por um aminoácido

CXCL-1 - Chemokine (C-X-C motif) ligand 1

DAC - Derivado acetilado da clindamicina

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético

ELISA - Ensaio imunoenzimático

ERK - Proteína quinase reguladora extracelular

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GLUT1 - Transportador de glicose

i.a. - Intra-articular

I $\kappa$ B $\alpha$  - Inibidor de kappa B

IL - Interleucina

IL-1R – Receptor de membrana para IL-1

i.p. - Intraperitoneal



MPO – Mieloperoxidase

NFkB – Fator nuclear kappa B

OPD - Ortofenilenodiamina

PBS - Solução tampão fosfato

*p.o.* - *Per os*

Pro-IL-1 $\beta$  – Proteína citosólica inativa.

TGF-  $\beta$  – Fator de crescimento transformador beta

TNF - Fator de necrose tumoral

TNFR – Receptor de membrana para TNF

TLR - Receptor de potencial transitório

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

## SUMÁRIO

<b>1.0 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1 Osteoartrite .....	17
1.2 Artrite gotosa .....	23
1.3 Dor inflamatória articular .....	25
1.4 Farmacoterapia das inflamações articulares.....	27
1.5 Reposicionamento de fármacos: clindamicina como agente analgésico e anti-inflamatório .....	29
<b>2.0 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>33</b>
<b>3.0 OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
<b>4.0 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
4.1 Animais .....	35
4.2 Drogas, fármacos ou reagentes diversos.....	35
4.3 Preparo das soluções, suspensões, emulsões, vias de administração e doses usadas .....	37
4.4 Síntese do derivado acetilado de clindamicina (DAC).....	40
4.5 Avaliação microbiológica .....	40
4.5.1 Cepas bacterianas .....	40
4.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	41
4.5.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) .....	41
4.6 Avaliação da alodínia mecânica induzida por zimosano ou UMS.....	42
4.7 Avaliação do diâmetro articular .....	43

4.8	Padronização do modelo de inflamação articular e dor inflamatória induzida por zimosano .....	43
4.9	Efeito induzido pelo pré- ou pós-tratamento com clindamicina sobre a alodínia mecânica e edema articular induzidos por zimosano .....	44
4.10	Efeitos induzidos por naltrexona, glibenclamida, AM251 sobre a atividade antialodínica da clindamicina .....	44
4.11	Efeito induzido pelo pré-tratamento com DAC sobre a alodínia mecânica e edema articular induzidos por zimosano .....	45
4.12	Contagem total e diferencial dos leucócitos no lavado articular.....	45
4.13	Coleta e preparo das amostras .....	46
4.14	Quantificação de citocinas <i>in vivo</i> .....	46
4.15	Quantificação de TNF- $\alpha$ <i>in vitro</i> .....	47
4.16	Efeito induzido por clindamicina ou DAC sobre a fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$ induzida por zimosano.....	47
4.17	Atividade da MPO .....	48
4.18	Padronização do modelo de inflamação articular induzida por UMS.....	49
4.19	Efeito induzido por clindamicina sobre a alodínia mecânica e o edema articular induzidos por UMS .....	49
4.20	Análise estatística .....	49
<b>5.0</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
5.1	Síntese do derivado acetilado de clindamicina .....	50
5.2	Avaliação da atividade antimicrobiana .....	50
5.3	Padronização do modelo de inflamação articular e dor inflamatória induzida por zimosano .....	51
5.4	Efeito induzido pelo pré-tratamento com clindamicina sobre o edema articular e a alodínia mecânica induzidos por zimosano .....	52
5.5	Efeito induzido pelo pós-tratamento com clindamicina sobre o edema articular e a alodínia mecânica induzidos por zimosano .....	56

5.6 Efeitos induzidos por naltrexona, glibenclamida, AM251 sobre a atividade antialodínica da clindamicina .....	59
5.7 Efeitos induzidos por DAC sobre o edema articular e a alodínia mecânica induzidos por zimosano .....	64
5.8 Efeito induzido por clindamicina sobre a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e CXCL-1 induzida por zimosano <i>in vivo</i> .....	67
5.9 Efeito induzido por CAD sobre a produção de TNF- $\alpha$ induzida por zimosano <i>in vitro</i> .....	70
5.10 Efeito induzido por clindamicina ou DAC sobre a fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$ induzida por zimosano.....	70
5.11 Efeito induzido por clindamicina sobre a contagem total e diferencial de leucócitos no lavado articular .....	72
5.12 Efeito induzido por clindamicina sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) ..	73
5.13 Padronização do modelo de inflamação articular induzida por UMS.....	73
5.14 Efeito induzido pelo pré-tratamento com clindamicina sobre o diâmetro articular e limiar nociceptivo induzidos por UMS .....	74
<b>6.0 DISCUSSÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>7.0 CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>86</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 OSTEOATRITE

A osteoartrite é um distúrbio inflamatório crônico degenerativo que afeta toda articulação, caracterizada pela perda de matriz cartilaginosa, hipertrofia óssea, espessamento da cápsula sinovial e alterações estruturais dos ligamentos peri-articulares e músculos periféricos (ZHENG et al., 2021). É tipicamente descrita como uma doença heterogênea desencadeada por fatores mecânicos, inflamatórios e metabólicos, que levam à destruição estrutural e falha da articulação sinovial (HUNTER & ZEINSTRA, 2019).

Embora possa afetar qualquer articulação do corpo, clinicamente, os joelhos são os mais acometidos pela osteoartrite, seguidos pelas mãos e quadril (HUNTER & ZEINSTRA, 2019; MORRIS et al., 2019). A osteoartrite é o tipo de artrite mais comum e a principal causa de dor e incapacidade. A osteoartrite está entre as dez doenças mais incapacitantes em países desenvolvidos e sua prevalência aumenta com o avanço da idade, afetando cerca de 75% da população idosa acima dos 65 anos, mas podendo, também, ocorrer em indivíduos mais jovens, especialmente mulheres com idade média de 50 anos. As consequências dessa condição inflamatória articular vão além de dores nas articulações, pois impactam negativamente na qualidade de vida dos indivíduos portadores da doença, principalmente no âmbito social. No Brasil, a osteoartrite representa 65% das causas de incapacidade no trabalho, sendo considerada a terceira causa de faltas e licenças médicas. Além disso, há excessivos gastos com terapias farmacológicas e não farmacológicas para essa condição patológica. A soma desses fatores resulta em consequências importantes para o país e o sistema de saúde (SOUZA et al., 2020).

A sequência exata dos eventos que levam ao desenvolvimento da osteoartrite ainda permanecem incertos. A relação temporal entre as alterações do osso subcondral, inflamação crônica do tecido sinovial e erosão cartilaginosa ainda é amplamente desconhecida (KAPOOR et al., 2011).

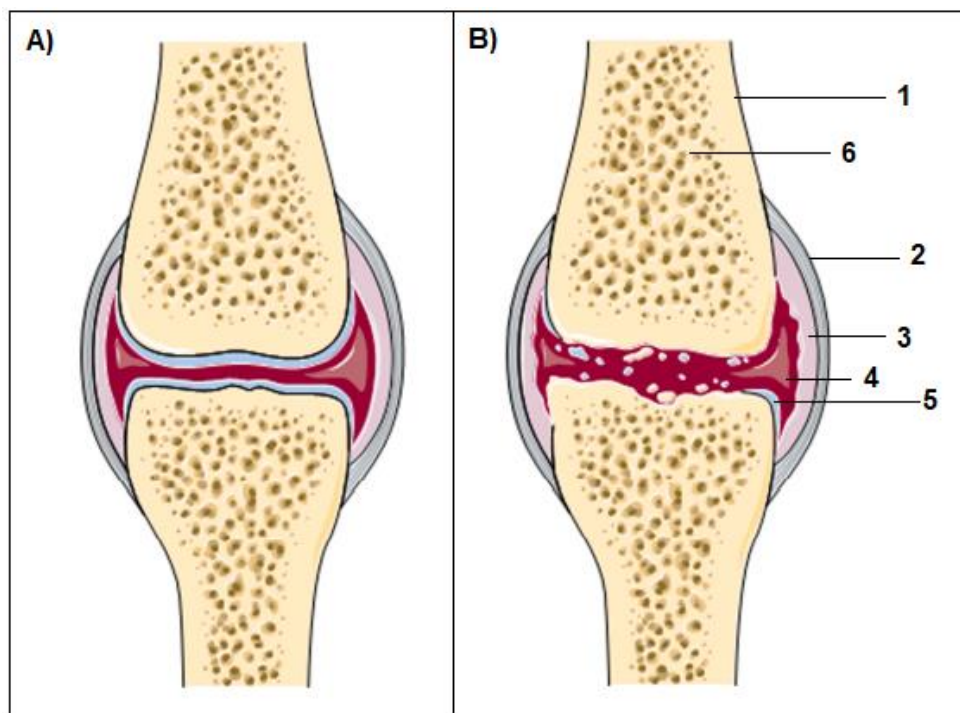
Em uma articulação saudável, os condrócitos, células responsáveis pela manutenção da matriz e pelo controle metabólico da cartilagem, estão em um estado de homeostase fisiológica e metabólica (BAI et al., 2019). Em contrapartida, em uma articulação com osteoartrite, sob condições inflamatórias, os condrócitos apresentam mudança na homeostase metabólica e remodelação da cartilagem, caracterizada por condrossenescência, distúrbios da via glicolítica e função mitocondrial. Alterações na homeostase metabólica e sua reprogramação também ocorrem em fibroblastos sinoviais e células imunes da articulação, incluindo macrófagos sinoviais (MOBASHERI et al., 2017).

Mudanças na cartilagem articular relacionadas à idade podem contribuir para o desenvolvimento e progressão da osteoartrite. Com o avanço da idade, os tecidos sofrem mudanças relacionadas à atividade metabólica, atividade mitótica e diminuição da sensibilidade dos condrócitos para fatores de crescimento, como fator de crescimento transformador (TGF- $\beta$ ). O envelhecimento modifica a estrutura e função da cartilagem articular e outros tecidos articulares, como o osso subcondral, músculo, tecidos moles, membrana sinovial e líquido sinovial. No envelhecimento, os condrócitos da cartilagem articular exibem um declínio relacionado à idade na proliferação e capacidade sintética, mantendo a capacidade de produzir mediadores inflamatórios e enzimas degradantes da matriz (MOBASHERI et al., 2015).

O edema articular é uma característica clínica da osteoartrite atribuída a inflamação e reflete a presença de sinovite. A sinovite frequentemente ocorre por lesão traumática e está associada ao aumento da dor e disfunção motora. A razão exata pela qual ocorre a sinovite ainda é incerta. A hipótese mais aceita é que, uma vez degradada, fragmentos de cartilagem alcançam a articulação e entram em contato com a sinóvia. Tendo em vista a presença desses fragmentos, células sinoviais liberam mediadores inflamatórios que ativam condrócitos presentes na camada superficial da cartilagem, levando à síntese de metaloproteinases e, eventualmente, destruição da cartilagem. Os mediadores inflamatórios também podem induzir angiogênese sinovial e aumentar a síntese de citocinas inflamatórias. Dessa forma, a sinovite da osteoartrite perpetua a degradação cartilaginosa (BERENBAUM, 2013).

A cartilagem articular (Figura 1) é avascular, aneural e alinfática e, geralmente, caracterizada por baixa celularidade (BORA & MILLER, 1987). O transporte de nutrientes e oxigênio para a cartilagem é realizado por meio do sistema de difusão dupla, em que as substâncias cruzam a barreira sinovial em direção ao líquido sinovial e, posteriormente, se difundem na matriz cartilaginosa e, assim, atingem condrócitos em diferentes profundidades do tecido (ZHENG et al., 2021). As mitocôndrias desempenham um papel importante na manutenção da homeostase dos condrócitos. Na osteoartrite, fatores degenerativos causam alterações na estrutura mitocondrial dos condrócitos, resultando em produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, levando a danos oxidativos, aumento de resposta inflamatória e superexpressão de metaloproteinases. É bem relatado que a regulação da expressão de citocinas inflamatórias associadas à osteoartrite, como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-6, pode estar ligada a níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio e desempenha um papel importante na patogênese da doença (ZHENG et al., 2021; RIEDER et al., 2018).

Uma vez que o ambiente da cartilagem articular é conhecido por ser avascular, o metabolismo dos condrócitos é, geralmente, considerado restrito por conter baixas taxas de glicólise anaeróbica devido à taxa limitada de difusão de oxigênio e nutrientes do líquido sinovial (BLANCO et al., 2011; JOHNSON et al., 2004). A importação da glicose é a primeira etapa do controle de fluxo na via glicolítica. A perda genética do transportador de glicose (GLUT1) leva à displasia da cartilagem, enquanto a expressão elevada e contínua de GLUT1 pode degradar a cartilagem. A expressão de GLUT1 em condrócitos é significativamente aumentada sob condições de hipóxia e por citocinas inflamatórias (HUANG et al., 2020; TANNER et al., 2018; PEANSUKMANEE et al., 2009).



**Figura 1:** Representações esquemáticas de uma articulação normal (A) e de uma articulação com sinovite e alteração erosiva (B). 1 = periósteo; 2 = cápsula articular; 3 = revestimento sinovial; 4 = cavidade articular/líquido sinovial; 5 = cartilagem articular; 6 = osso. Adaptado de ZHENG et al., 2021.

O estresse oxidativo pode induzir a montagem de multiproteínas, complexos inflamatórios chamados inflamassomas. Sinais inflamatórios ativam respostas dependentes de inflamassoma (NLRP3) e caspases, predominantemente caspase-1, estimulando, assim, a maturação e secreção das citocinas inflamatórias (MOBASHERI et al., 2015; SALMINEN et al., 2012).

Os processos fisiopatológicos que ocorrem na articulação acometida por osteoartrite são amplamente mediados por citocinas inflamatórias e outros mediadores que intensificam os efeitos catabólicos. A participação do sistema imunológico no desenvolvimento e progressão do osteoartrite é um dos os elementos-chave na patogênese da doença (GOLDRING & OTERO, 2011). O grupo mais importante parece ser as citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-15, IL-17, IL-18 e quimiocinas, que têm papel importante na iniciação e manutenção da inflamação na membrana sinovial. O segundo grupo, com efeito antagônico, é formado por citocinas conhecidas como



antiinflamatórias, como IL-4, IL-10 e IL-13, que podem modular uma resposta inflamatória e agir de forma protetora no tecido articular (MORRIS et al., 2019; CUCCHIARINI et al., 2016; LIEBERTHAL et al., 2015; WOJDASIEWICZ et al., 2014).

Durante a progressão da osteoartrite, a produção e a ação de várias citocinas podem variar dependendo da duração e gravidade da doença. O mais importante efeito induzido pelas citocinas é a perturbação do catabolismo e processos de anabolismo, particularmente importantes em tecidos que, muitas vezes, estão sujeitos a altas cargas mecânicas, como as articulações (MUELLER & TUAN, 2011; VANGSNESS et al., 2011). Como resultado da ruptura desse equilíbrio, há uma degeneração progressiva da cartilagem articular, impactando a biomecânica da articulação e outros componentes da mesma. Essas alterações levam ao desenvolvimento de um processo de difícil interrupção, que envolve processos inflamatórios de degradação e produção, que, juntos, levam à perda gradual da função articular e dor (WOJDASIEWICZ et al., 2014).

IL-1 $\beta$  é considerada uma das principais citocinas envolvidas na patogênese da osteoartrite. Essa citocina induz reações inflamatórias e catabólicas e, juntamente com outros mediadores, afeta a cartilagem articular. Pacientes com osteoartrite possuem concentração elevada de IL-1 $\beta$  no fluido sinovial, cartilagem e osso subcondral (MELCHIORRI et al., 1998; FARAHAT et al., 1993). IL-1 $\beta$  é sintetizada sob a forma de uma proteína citosólica inativa (Pro-IL-1 $\beta$ ) até ser metabolizada pela enzima caspase-1, formando um produto ativo que, em seguida, é liberado para o espaço extracelular. Nas articulações, é sintetizada por condrócitos, osteoblastos e células mononucleares que estão presentes nas articulações ou que migraram para essas estruturas durante a resposta inflamatória (NEES et al., 2019; LIEBERTHAL et al., 2015; PICCIOLI et al., 2013).

A ativação biológica das células por IL-1 $\beta$  é mediada pela interação com receptores de membrana como IL-1R1 e IL-1R2. Vale ressaltar que a expressão do receptor IL-1R1 é aumentada em pacientes portadores de osteoartrite na superfície dos condrócitos e sinoviócitos (WOJDASIEWICZ et al., 2014;

SADOUK et al., 1995). Quando IL-1 $\beta$  se liga ao receptor IL-1R1 ocorre uma cascata de sinalização intracelular que leva a fosforilação do complexo I $\kappa$ B, ativando assim o fator de transcrição NF- $\kappa$ B. A ativação desses fatores de transcrição resulta na expressão de centenas de genes cujos produtos incluem outras citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, enzimas e outros mediadores inflamatórios (KAWAI & AKIRA, 2007; ROMAN-BLAS & JIMENEZ, 2006). Durante o curso da doença, IL-1 $\beta$  também estimula a produção de espécies reativas de oxigênio, que levam à formação de, por exemplo, peróxidos e radicais hidroxilados, que danificam diretamente a articulação (AFONSO et al., 2007).

TNF- $\alpha$  é secretada pelas mesmas células nas articulações que sintetizam IL-1 $\beta$  e o aumento de sua concentração também é observada nos mesmos elementos, como líquido sinovial, membrana sinovial, cartilagem e osso subcondral, onde concentrações aumentadas de IL-1 $\beta$  também são detectadas (KAPOOR et al., 2011). TNF- $\alpha$  interage com dois isotipos de receptores de membrana localizados nas superfícies de quase todas as células nucleares: TNF-R1 e TNF-R2. Entretanto, o TNF-R1 parece ter mais impacto sobre na perda de matriz cartilaginosa do que TNF-R2, o que não altera o fato de que ambos os receptores estão envolvidos na transdução de sinais após serem ativados pelo TNF- $\alpha$  (WESTACOTT et al., 2000). O TNF-R1 está envolvido principalmente na ativação de vias cujos produtos finais estimulam a resposta inflamatória, principalmente produção e excreção de outras citocinas, enquanto o TNF-R2 está envolvido na transdução de sinais que levam à desintegração celular (HAAS et al., 2009). De modo geral, a interação do TNF- $\alpha$  com seus receptores resultará em reações de sinalização baseada na ligação e interação mútua de proteínas que levará à ativação de proteína quinase reguladora extracelular (ERK) e NF- $\kappa$ B (RODRÍGUEZ et al., 2011; ZHOU et al., 2007), entre outros alvos.

Há um sinergismo marcante entre TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Isso é resultado da ativação do mesmo grupo de vias de sinalização intracelular, que, por sua vez, desencadeia efeitos semelhantes caracterizado pelo aumento da inflamação (MARCU et al., 2010). Além disso, efeitos sobre o catabolismo em tecidos articulares também são relatados para essas citocinas. Ambas reduzem a

eficiência da cadeia respiratória e potencial de membrana mitocondrial em condrócitos (LÓPEZ-ARMADA et al., 2006).

A produção de IL-6 nos tecidos articulares geralmente é afetada em resposta a TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em condrócitos, osteoblastos, células do sistema imune e adipócitos. O aumento da concentração de IL-6 no líquido sinovial e soro está correlacionado com a intensidade das lesões articulares (WOJDASIEWICZ et al., 2014; GUERNE et al., 1990). O efeito induzido pela IL-6 sobre a cartilagem articular não difere daquele induzido por outras citocinas. Em sinergismo com essas, leva à diminuição da produção de colágeno tipo II e aumenta a produção de metaloproteinases, responsáveis pela degradação da matriz cartilaginosa. A produção excessiva de IL-6 na região sinovial leva à transmigração de leucócitos para a região, favorecendo o agravamento da inflamação local pela amplificação do infiltrado de células inflamatórias. Além disso, a IL-6 aumenta a proliferação de sinoviócitos e promove a osteoclastogênese, o que contribui para a degradação da cartilagem (LARSSON et al., 2015; LIEBERTHAL et al., 2015; WOJDASIEWICZ et al., 2014).

## **1.2 ARTRITE GOTOSA**

A artrite gotosa, também conhecida como gota, é uma doença inflamatória crônica causada pela deposição de cristais de urato monossódico (UMS) nas articulações, o que gera episódios súbitos e graves de dor, sensibilidade, rubor, calor e edema nas articulações e forte impacto sobre a qualidade de vida. Essa doença é caracterizada por podagra, rigidez e sensibilidade na articulação metatarsofalângica (PUNZI et al., 2020; WILSON & SASEEN, 2016). A primeira apresentação típica da gota é uma inflamação aguda dolorosa, afetando uma articulação do membro inferior. Na ausência de tratamento, o episódio é tipicamente autolimitado ao longo de um período de 7-14 dias. Após a resolução, há um período assintomático sem dor, conhecido como gota intercrítica, até que outro episódio ocorra (DALBETH et al., 2021).

A artrite gotosa possui prevalência de 3,9% entre todos os adultos e 9,7% em indivíduos com mais de 80 anos de idade, variando em função de sexo e

etnia (KELLER & MANDELL, 2021). A prevalência da artrite gotosa aumentou de forma constante no século XX, provavelmente devido a crescentes taxas de síndromes metabólicas e doenças associadas. A hiperuricemia é definida como a concentração de UMS no soro superior a 7,0 mg/dL. Concentração elevada de UMS representa o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da artrite gotosa. O UMS é o produto final da degradação de nucleotídeos de purina. Alimentos ricos em purinas, como carnes vermelhas e frutos do mar, e o álcool aumentam as concentrações de UMS sérico. Além disso, doenças como psoríase e distúrbios mieloproliferativos também levam ao aumento sérico das concentrações de UMS. A excreção do UMS é regulada pelos rins e intestinos, portanto, uma falha no funcionamento desses órgãos pode levar a uma subexcreção e aumento da concentração sérica. Vale ressaltar que comorbidades como obesidade, síndrome metabólica, diabetes mellitus tipo II, doença renal crônica e uso de diuréticos, entre outros, são fatores de risco para o desenvolvimento da doença (DALBETH et al., 2021).

No processo inflamatório da artrite gotosa, diferentes mediadores estão envolvidos com efeitos distintos na iniciação, atenuação e extinção das crises agudas. Os cristais de UMS são os primeiros ativadores endógenos do inflamassoma de NLRP3, um grande complexo multiprotéico relacionado ao processamento de precursores de IL-1 $\beta$  e IL-18 em suas formas ativas. O inflamassoma NLRP3 é dependente de sinais de dois sistemas de iniciação. O primeiro resulta em estimulação de NF- $\kappa$ B via receptores Toll-like (TLR4 e TLR2) e síntese de pró-IL-1 $\beta$  e componentes do inflamassoma (GALOZZI et al., 2021).

Os cristais de UMS levam à oligomerização do inflamassoma e ativação de caspase-1, que leva à conversão de pró-IL-1 $\beta$  em IL-1 $\beta$ . Essa citocina, então, interage com seu receptor para desencadear uma cascata de sinalização envolvendo outras citocinas inflamatórias e quimiocinas, resultando no recrutamento de neutrófilos. Esses são recrutados para os tecidos inflamados por quimiocinas, como MCP-1 e CXCL-8, e citocinas são produzidas e liberadas, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , bem como outros mediadores, como metaloproteinases de matriz, prostaglandinas, leucotrienos, espécies reativas de

oxigênio e diversas enzimas lisossomais (GALOZZI et al., 2021; SZEKANECZ et al., 2019).

Sem dúvida, a IL-1 $\beta$  desempenha um papel fundamental na patogênese da artrite gotosa. Entretanto, evidências crescentes sugerem que outros membros da família IL-1 podem estar envolvidos. IL-1 $\alpha$  pode estar relacionada à indução e amplificação da artrite gotosa. Além disso, a IL-37 regula o metabolismo do ácido úrico ao afetar o nível de proteína de PDZK1, um controlador do transporte desse ácido (KLÜCK et al., 2020; WAN et al., 2020). Diversos processos contribuem para uma inflamação contínua, tais com desgranulação celular decorrente da fagocitose dos cristais de UMS, lise de membranas lisossomais e celulares, recrutamento adicional de leucócitos e liberação de mediadores inflamatórios (DALBETH et al., 2021; GALOZZI et al., 2021).

### **1.3 DOR INFLAMATÓRIA ARTICULAR**

A dor é o sintoma predominante da osteoartrite sendo o principal sintoma que leva à procura por atendimento médico. A dor geralmente é agravada pelo uso das articulações e aliviada pelo repouso das mesmas (O'NEILL & FELSON, 2018). Rigidez matinal, amplitude de movimento reduzida, crepitação, instabilidade articular, inchaço, fraqueza muscular, fadiga e sofrimento psicológico relacionado à dor também são vistos com frequência em pacientes com inflamações articulares (HUNTER & ZEINSTRA, 2019). Nos estágios iniciais da doença, os sintomas de dores são frequentemente intermitentes, tornando-se mais frequentes e graves à medida que a doença progride (O'NEILL & FELSON, 2018).

Apesar da cartilagem articular não ser inervada, a cápsula, ligamentos, menisco, periósteo e osso subcondral são amplamente inervados por uma densa rede de fibras mielínicas e amielínicas. Nas articulações existem quatro tipos de órgãos sensoriais. As fibras tipo I e tipo II, localizadas na cápsula, ligamentos e meniscos, são mielínicas e sensíveis à pressão e tração. As fibras do tipo III (A $\delta$ ),

localizadas na superfície ligamentar, atuam como mecanorreceptores de alto limiar, respondendo a estímulos mecânicos intensos e, em menor grau, a estímulos térmicos. Por último, destacam-se as fibras C, amielínicas e consideradas o tipo mais importante de fibra em todas as estruturas da articulação, exceto na cartilagem. As fibras C são chamadas de polimoidais, uma vez que são ativadas por estímulos mecânicos, térmicos e químicos em condições patológicas como a inflamação. As fibras do tipo III e C estão envolvidas na dor induzida por lesões articulares. Além disso, são sensibilizadas pelo aumento da pressão intra-articular e por alterações químicas locais do ambiente (PERROT, 2015).

Existem mecanismos periféricos, envolvidos no estágio inicial, e mecanismos centrais, envolvidos nos estágios tardio e crônico da inflamação articular. As interações entre os mecanismos centrais e periféricos sugerem uma plasticidade geral do sistema nociceptivo da inflamação articular (IMAMURA et al., 2008).

Nociceptores na articulação acometida pela osteoartrite podem ser estimulados por uma variedade de estímulos nocivos, incluindo estímulos mecânicos ou químicos e mediadores inflamatórios, como citocinas e prostaglandinas. Após lesão, inflamação ou estímulos nocivos, o limiar para excitação dos nervos locais pode ser reduzido e levar ao aumento da responsividade dos nociceptores periféricos, um fenômeno denominado "sensibilização periférica" levando à hiperalgesia (dor em resposta a estímulo nocivo) ou alodínia (dor em resposta a um estímulo não nocivo). O potencial de ação gerado pela estimulação de nociceptores nos terminais nervosos periféricos é transmitido através das fibras nervosas C amielínicas e fibras A $\delta$  mielinizadas. Essas fibras aferentes conduzem a informação à medula espinhal ou ao tronco cerebral, onde ocorre o processamento sináptico. Em seguida, a informação é conduzida por meio de vias ascendentes ao tálamo e centros superiores no córtex somatossensorial onde ocorre o processamento final e a interpretação da dor (O'NEILL & FELSON, 2018).

Durante um processo de inflamação aguda ou crônica, mediadores inflamatórios sensibilizam nociceptores por meio da interação com receptores acoplados à proteína G na membrana neuronal. Essa interação leva ao desencadeamento de respostas intracelulares e ativação de proteínas quinases e adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que alteram o limiar de ativação de canais para cálcio, sódio e potássio, presentes na membrana do neurônio, induzindo, assim, alterações nos potenciais de repouso e redução do limiar de ativação de membrana (HUNTER & ZEINSTRAS, 2019; BASBAUM et al., 2009; FERREIRA & NAKAMURA, 1979).

#### **1.4 FARMACOTERAPIA DAS INFLAMAÇÕES ARTICULARES**

A farmacoterapia de pacientes com inflamações articulares como a osteoartrite e artrite gotosa consiste na utilização de fármacos de diversas classes. Esses têm por objetivo reduzir os sinais e sintomas da doença, bem como modificar o seu curso natural, desacelerando ou interrompendo processos biológicos subjacentes ao tecido danificado. Todavia, as intervenções farmacoterapêuticas atualmente recomendadas por diretrizes internacionais geralmente são limitadas, pois predominantemente promovem alívio de sintomas, muitas vezes em pequena magnitude, e não têm um perfil de segurança adequado (KOLASINSKI et al., 2020; BANNURU et al., 2019).

O paracetamol é o analgésico não-opioide mais utilizado para manejo da dor em pacientes com inflamações articulares, especialmente do quadril e/ou joelho. Entretanto, esse fármaco apresenta eficácia analgésica reduzida. Vale ressaltar, também, que seu uso constante se torna preocupante uma vez que há risco de insuficiência hepática e redução da função renal. O mesmo pode ser dito sobre os analgésicos opioides, como, por exemplo, o tramadol. Fármacos dessa classe podem apresentar eficácia limitada e induzir reações adversas graves como sedação, retenção urinária, constipação e depressão respiratória quando utilizados em doses mais altas, além de dependência e tolerância (LEOPOLDINO et al., 2019; PIZZI et al., 2012).

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) são uma classe de fármacos utilizada para o tratamento de pacientes com inflamações articulares visando o alívio de dores leves a moderadas e redução da inflamação. Por inibirem as enzimas ciclooxigenase-1 (COX-1) e COX-2, ocorre a redução da síntese de prostaglandinas, atenuando o processo inflamatório e aliviando a dor. Entretanto, o uso de fármacos dessa classe, como diclofenaco, meloxicano, nimesulida e ibuprofeno, entre outros, pode causar lesões da mucosa gástrica e alterar a agregação plaquetária, entre outras reações adversas (WALTERS & WOESSNER, 2016; ARACHCHILLAGE & MAKRIS, 2015). Tendo em vista essas o risco de ocorrência dessas reações adversas, AINEs devem ser usados por curtos períodos e nas menores dose efetivas (HUNTER & ZEINSTRAS, 2019).

Os anti-inflamatórios esteroides (AIEs) também podem ser usados no tratamento de pacientes com doenças inflamatórias articulares. O exemplo mais comum a ser citado é a prednisolona. De modo geral, os AIEs interagem com fatores de transcrição, como o fator nuclear kB, e reduzem a síntese de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-6. Entretanto, o uso crônico desses fármacos pode causar hiperglicemia, hipertensão arterial sistêmica, osteoporose e cataratas, entre outras reações adversas (KANAZAWA et al., 2016; ORAY et al., 2016). Existem formulações contendo AIEs para injeção intra-articular, recomendadas para casos de inflamação articular grave. Os AIEs intra-articulares reduzem a inflamação por meio de uma ação mais localizada, com menor risco de reações adversas sistêmicas. Entretanto, tais injeções aliviam a dor e reduzem o edema articular por curto período, o que indica a necessidade de intervenções farmacoterapêuticas mais eficazes (LATOURETE et al., 2020).

No que diz respeito ao manejo de crises agudas de artrite gotosa, quase todas as diretrizes recomendam como tratamento de primeira linha os AINEs, AIEs (oral ou intra-articular), além alopurinol ou colchicina. Em relação à colchicina, recomenda-se cautela, devido ao risco maior de ocorrência de reações adversas e toxicidade, e redução das doses em pacientes com doença renal crônica e em hemodiálise. A colchicina é metabolizada pela CYP3A4 e glicoproteína P e inúmeras interações medicamentosas podem ocorrer (KELLER & MANDELL, 2021; SLOBODNICK et al., 2015).



Em pacientes que não toleraram o tratamento de primeira linha ou não respondem ao tratamento, há a opção de adotar o tratamento de segunda linha com inibidores de IL-1, tais como canakinumabe e anakinra. A terapia com esses fármacos biológicos é bem tolerada, entretanto os medicamentos têm custo elevado, o que dificulta adesão dos pacientes (LIEW & GARDNER, 2019; BALASUBRAMANIAM et al., 2017; FISHER et al., 1994).

Embora vários fármacos para o tratamento de pacientes com inflamações articulares estejam disponíveis, a eficácia reduzida e o perfil de segurança inadequado são aspectos que limitam o uso. Assim, a busca por novas alternativas farmacoterapêuticas se faz necessária.

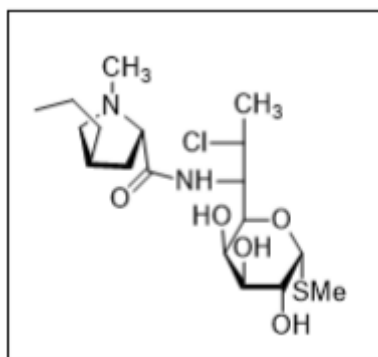
### **1.5 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS: CLINDAMICINA COMO AGENTE ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO**

O reposicionamento de fármacos, isto é, a investigação de novas funções para fármacos utilizados na terapêutica, cujas informações sobre segurança e farmacocinética são conhecidas, tem sido adotado pelas indústrias farmacêuticas e pela área acadêmica pelo fato de reduzir o tempo e os custos necessários para identificação de novas abordagens farmacoterapêuticas (CHONG & SULLIVAN, 2007; BASTOS & COELHO, 2014).

Há estudos de que a atenuação da inflamação e da dor durante o uso de antimicrobianos está adicionalmente associada a algumas atividades não antimicrobianas dessa classe de fármacos (FEDERICI, 2011; LABRO, 2002). Diversas classes de antimicrobianos, incluindo beta-lactâmicos (HU et al. 2010; RAMOS et al., 2010), tetraciclina (NIKODEMOVA et al., 2007; BASTOS et al., 2008) e rifamicinas (WANG et al., 2013), exibem atividades imunomoduladoras, contribuindo para efeitos adicionais sobre a inflamação e a dor. O *American College of Rheumatology* indica a minociclina, um antimicrobiano pertencente a classe das tetraciclina, como um fármaco útil no tratamento de pacientes com artrite reumatoide e a classifica como um fármaco modificador do curso da doença. Em estudos pré-clínicos, foi demonstrado que este antimicrobiano eleva

o limiar nociceptivo de roedores e reduz a produção de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (BASTOS & COELHO, 2014; AMIN et al., 2012).

A clindamicina (Figura 2) é um antimicrobiano que pertence ao grupo das lincosamidas. A atividade bacteriostática da clindamicina está relacionada com a ligação à subunidade 50-S dos ribossomos bacterianos e consequente inibição da síntese proteica (BOOKSTAVER et al., 2015; MURPHY & MCKAY, 2015). A presença do anel de açúcar de seis átomos e de suas hidroxilas é essencial para a atividade antimicrobiana da clindamicina (KULCZYCKA et al., 2012; SCHLÜNZEN et al., 2001).



**Figura 2:** Estrutura molecular da clindamicina.

A clindamicina é bem absorvida quando administrada pela via oral, podendo atingir até 90% de biodisponibilidade, e se distribui para a maioria dos tecidos corporais, principalmente tecido ósseo. Além disso, há uma elevada taxa (92 a 94%) de ligação do fármaco a proteínas plasmáticas. A meia-vida de eliminação é de 2-3 h. No fígado, o principal órgão responsável pela metabolização da clindamicina, enzimas do sistema citocromo P450 (CYP2A4 e CYP3A5) levam à formação de dois metabólitos: N-desmetilclindamicina e sulfóxido de clindamicina. Esses, por sua vez, são pouco quantificáveis no plasma, porém quantificáveis na bile e urina. Cerca de 10% de clindamicina é excretada na urina e 3,6% nas fezes (BOOKSTAVER et al., 2015; MURPHY & MCKAY, 2015; GONZALEZ et al., 2014; CARRASCO-PORTUGAL et al., 2008; WYNALDA et al., 2003).

A clindamicina é utilizada para o tratamento de pacientes acometidos por infecções causadas por microrganismos Gram-negativos anaeróbios e Gram-positivos aeróbios e anaeróbios. Bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus*

*aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* (Grupos A, C e G) e organismos anaeróbios, incluindo *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium* e *Clostridium perfringens* apresentam sensibilidade à clindamicina. Entretanto, é relatada resistência adquirida a esse fármaco pela espécie *Clostridium difficile*, o que inviabiliza o uso da clindamicina para o tratamento de pacientes com infecções causadas por esse microrganismo (LÓPEZ-UREÑA et al., 2016; MURPHY & MCKAY, 2015; PINEDA & WATT, 2015).

As ações da clindamicina no sistema nervoso central (SNC) têm sido relatadas. Esse fármaco induz efeito neuroprotetor em decorrência da diminuição da liberação de aminoácidos excitatórios e interfere em mecanismos pré- e pós-sinápticos da neurotransmissão (BÖTTCHER et al., 2004; AL AHDAL & BEVAN, 1995; KONOPKA & PARSONS, 1988). Recentemente, demonstramos a atividade da clindamicina em modelos de dores nociceptiva e inflamatória, bem como em modelos de inflamação em camundongos. Os resultados indicaram que as atividades da clindamicina envolvem a ativação de mecanismos serotoninérgicos e opioidérgicos. Adicionalmente, foi observado que a administração intraperitoneal da clindamicina reduziu a concentração de TNF- $\alpha$  na pata dos animais estimulados com adjuvante completo de Freund (RODRIGUES et al., 2020). Outros grupos de pesquisa demonstraram que a clindamicina reduz a produção de outras citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL12 e interferon- $\gamma$  (NGUYEN & EICHENFIELD, 2015; HIRATA et al., 2001).

Em uma perspectiva de reposicionamento, uma característica da clindamicina deve ser destacada. Esse fármaco apresenta boa distribuição em tecidos ósseos e no líquido sinovial (THABIT et al., 2019), indicando possibilidade de redução de inflamações articulares e suas complicações. A combinação de clindamicina, por via intravenosa, e tetraciclina, por via oral, vem sendo utilizada no tratamento de pacientes com artrite reumatoide, embora não haja evidências da eficácia deste regime farmacoterapêutico (SMITH et al., 2011; GOMPELS et al., 2006).

Embora a possibilidade de reposicionamento de antimicrobianos no manejo de doenças não infecciosas venha sendo investigada nos últimos anos, deve-se levar em consideração que um risco associada a essa intervenção é a ocorrência de resistência microbiana. A resistência aos antimicrobianos é um

problema de saúde pública grave e alarmante que pode resultar em infecções intratáveis (FRIEDMAN et al., 2016; GOULD et al., 2008) e em um impacto negativo e duradouro sobre o microbioma intestinal (JERNBERG et al., 2010; SJÖLUND et al., 2003).

Em relação às lincosamidas, bactérias Gram-positivas podem desenvolver resistência à clindamicina, provavelmente devido à metilação ribossomal por enzimas codificadas por *erm* (MACDOUGALL & CHAMBERS, 2011), o que leva a uma cautela na prescrição desse fármaco no tratamento de pneumonia e infecções de tecidos moles e músculo-esqueléticas causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (LEWIS & JORGENSEN, 2005; LECLERQ, 2002). Assim, mesmo após demonstrar que a clindamicina exibe atividades em modelos de dor e inflamação em roedores (RODRIGUES et al. 2020), deve-se ter cautela antes de sugerir o reposicionamento dessa lincosamida no manejo de doenças não infecciosas.

Alguns estudos têm demonstrado que modificações das estruturas de alguns antimicrobianos do grupo das tetraciclinas, levando à redução ou eliminação da atividade antimicrobiana, podem resultar em moléculas que ainda apresentam atividade em modelos experimentais de dor e inflamação (BASTOS et al., 2008; SANDLER et al. 2005; D'AGOSTINO et al. 2001; PATEL et al. 1999). Há expectativa de que as modificações moleculares da clindamicina também possam resultar em moléculas com esse perfil. Assim, propusemos investigar os efeitos induzidos pela clindamicina e de um análogo acetilado desse antimicrobiano em modelos experimentais de inflamação articular, bem como os possíveis mecanismos de ação. Esses estudos podem proporcionar resultados que contribuam para ampliar as alternativas farmacoterapêuticas no manejo de doenças inflamatórias articulares.

## 2.0. JUSTIFICATIVA

A osteoartrite e artrite gotosa são doenças de elevada prevalência na população, sendo mais comuns em idosos. A inflamação articular característica dessas doenças resulta em dor leve a intensa e erosão da matriz cartilaginosa, o que dificulta a locomoção e reduz de forma marcante a qualidade de vida dos pacientes. O tratamento de pacientes com doenças inflamatórias articulares é realizado com os anti-inflamatórios, analgésicos e outros fármacos que podem modificar o curso da doença, a fim de preservar a função articular. Entretanto, além de apresentar falhas no alívio dos episódios de dor, esses fármacos podem induzir reações adversas que limitam ou impedem o seu uso. Tendo em vista essas considerações, faz-se necessário o desenvolvimento de novas alternativas farmacoterapêuticas que tenham melhores perfis de eficácia e segurança. Nesse contexto, a clindamicina representa um objeto de pesquisa, uma vez que estudos recentes têm demonstrado suas atividades em modelos experimentais de dor e inflamação aguda e crônica. Entretanto, deve ser ressaltado que o uso de fármacos com atividade antimicrobiana no manejo de pacientes com doenças inflamatórias crônicas pode causar complicações decorrentes do impacto sobre o microbioma do paciente. Assim, a modificação da estrutura química da clindamicina, de forma a obter uma molécula que mantenha a atividade anti-inflamatória e não apresente a atividade antimicrobiana, é um objetivo importante visando o desenvolvimento de um candidato a fármaco potencialmente mais seguro.

### **3.0 OBJETIVO**

Avaliar as atividades da clindamicina e de um derivado acetilado da clindamicina em modelos experimentais de inflamação articular induzida por zimosano ou UMS, bem como investigar os possíveis mecanismos que medeiam essas atividades.

## 4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss (25 - 30 g). Os animais experimentais foram fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Ração e água foram fornecidas ad libitum. A temperatura da sala de experimentação foi mantida em  $27 \pm 1$  °C, correspondente à zona de termoneutralidade de roedores (GORDON, 1990). Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 h e ambientados na sala de experimento por pelo menos três dias antes da realização de todos os protocolos. Durante os experimentos, os animais foram manipulados cuidadosamente, de forma a resultar no menor estresse comportamental possível. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações para experimentação em animais (ZIMMERMANN, 1983). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG – 124/2018).

### 4.2 Drogas, fármacos e reagentes diversos

- Acetato de etila: reagente usado na síntese do derivado acetilado de clindamicina;
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA; Sigma-Aldrich, EUA): reagente usado no preparo da solução de extração de citocinas;
- Ácido úrico (Sigma-Aldrich, EUA): composto usado na produção de cristais de urato;
- Albumina sérica bovina (BSA; Sigma-Aldrich, EUA): reagente usado no ensaio de ELISA;
- AM251 (Tocris, EUA): antagonista de receptores canabinoidérgicos CB1.
- Anidrido acético: reagente usado na síntese do derivado acetilado de clindamicina;
- Aprotinina (Sigma-Aldrich, EUA): inibidor de protease usado no preparo da solução de extração de citocinas;

- Carboximetilcelulose (CMC) (Sigma-Aldrich, EUA): veículo usado no preparo das suspensões destinadas à administração *per os*;
- Cloreto de benzalcônio (Sigma-Aldrich, EUA): reagente usado no preparo da solução de extração de citocinas;
- Cloreto de sódio (NaCl) 0,9% p/v injetável (Equiplax, Brasil): veículo usado no preparo das soluções;
- Cloridrato de cetamina (Syntec, Brasil): anestésico;
- Cloridrato de xilazina (König, Brasil): anestésico;
- Fenobarbital (Sanofi Aventis, Brasil): fármaco depressor do SNC;
- Fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF; Sigma-Aldrich, EUA): reagente usado no preparo da solução de extração de citocinas;
- Fosfato de clindamicina (Nova Farma, Brasil): antimicrobiano pertencente à classe das lincosamidas;
- Fosfato de dexametasona (Sigma-Aldrich, EUA): anti-inflamatório esteroide;
- Glibenclamida (Sigma-Aldrich, EUA): bloqueador de canais para potássio ATP-dependentes;
- Iodo molecular: reagente usado na síntese do derivado acetilado de clindamicina;
- Kits comerciais de ELISA (R&D Systems, EUA) usados na quantificação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e CXCL-1 de camundongos;
- Naltrexona (Sigma, EUA): antagonista de receptores opioides;
- Ortofenileodiamina (OPD; Sigma, EUA): reagente usado no ensaio de ELISA;
- Peróxido de hidrogênio (Synth, Brasil): reagente usado no ensaio de ELISA;
- DAC: derivado acetilado de clindamicina (sintetizado pela Profa. Renata Barbosa de Oliveira, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, UFMG);
- Tween 20 (Sigma, EUA): reagente usado no ensaio de ELISA;
- Zimosano (Sigma, EUA): indutor de inflamação articular.



### **4.3 Preparo das soluções, suspensões e emulsões, vias de administração e doses usadas**

#### **➤ Clindamicina**

A solução de clindamicina foi preparada em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v estéril, imediatamente antes da administração intraperitoneal (i.p.). As doses de clindamicina usadas nos protocolos experimentais foram de 100, 200 e 400 mg/kg. A solução de clindamicina foi administrada em um volume de 4 mL/kg.

#### **➤ Derivado acetilado de clindamicina (DAC)**

A solução de DAC foi preparada em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v estéril, imediatamente antes do experimento. As doses de DAC usadas nos protocolos experimentais (109, 218 e 436 mg/kg) foram equimolares às doses de 100, 200 e 400 mg/kg de clindamicina, respectivamente, e administradas pela via i.p. em um volume de 4 mL/kg.

#### **➤ Naltrexona e AM251**

A solução de naltrexona foi preparada imediatamente antes da administração em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v. A emulsão de AM251 foi preparada em cremofor 5% e álcool etílico 5% acrescentados em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v. As doses de naltrexona foram 5 e 10 mg/kg e as doses de AM251 foram 4 e 8 mg/kg. Ambos foram administrados por via i.p. em volume de 4 mL/kg.

#### **➤ Glibenclamida**

A suspensão foi preparada imediatamente antes de cada administração em suspensão de CMC 0,5% p/v em cloreto de sódio 0,9% p/v. As doses de

glibenclamida foram de 20 e 40 mg/kg. A suspensão foi administrada *per os* (p.o.) em volume de 10 mL/kg.

#### ➤ **Dexametasona**

A solução foi preparada imediatamente antes de cada administração em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v. A dose de dexametasona foi de 10 mg/kg. As soluções foram administradas por via i.p. em volume de 4 mL/kg.

#### ➤ **Solução tampão fosfato (PBS)**

Reagentes: 12 g de NaCl; 0,302 g de KCl; 1,725 g de fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); 0,306 g de fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Os reagentes foram dissolvidos em 1500 mL de água destilada e o pH foi ajustado para 7,4.

#### ➤ **Solução tampão de lavagem**

Reagentes: Tween 20 0,1% em tampão fosfato salino (PBS).

#### ➤ **Solução tampão de bloqueio (BSA 1%)**

Reagentes: 200 mg de BSA dissolvidos em 20 mL de PBS.

#### ➤ **Solução diluente das amostras (BSA 0,1%)**

Reagentes: 40 mg de BSA dissolvidos em 40 mL de PBS.

#### ➤ **Solução tampão citrato**

Reagentes: 13,41g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 5,19 g de ácido cítrico. Os reagentes foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada e o pH foi ajustado para 5,0.

➤ **Solução do substrato OPD**

Reagentes: 4 mg de OPD e 2 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Os reagentes foram dissolvidos em 10 mL de solução tampão citrato.

➤ **Solução STOP**

Reagente: ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 M).

➤ **Solução diluente para a extração de citocinas**

Regentes: 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 2,89 g de fosfato de sódio bibásico dodecahidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O). Os reagentes foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada.

➤ **Solução para extração de citocinas:**

Reagentes: 2,34 g de NaCl, 50 µL de Tween 20, 500 mg de BSA, 4,48 mg de cloreto de benzalcônio, 37,2 mg de EDTA, 2 µL de aprotinina, 1,7 mg de PMSF (dissolvidos em 100 µL de DMSO). Os reagentes foram dissolvidos em 100 mL da solução diluente.

➤ **Estímulos inflamatório**

• Zimosano

A solução de zimosano (50 µg em 10 µL de solução salina estéril) foi preparada em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v, imediatamente antes de cada experimento. Foram injetados 10 µL dessa solução por via intra-articular (i.a.) no joelho esquerdo dos camundongos.

• UMS

Os cristais de UMS foram previamente preparados conforme descrito na literatura (AMARAL et al., 2016). Resumidamente, foram dissolvidos 5 mg de

ácido úrico em 1 mL de solução de NaOH 0,01 M (pH da solução final= 7,1). A solução saturada de ácido úrico foi filtrada (0,45 µm) e mantida em temperatura ambiente por 48 h. Em seguida, os cristais de UMS foram lavados com etanol (100%) e sonicados para redução do tamanho das partículas. As condições de preparo são livres de pirogênio (método validado apresenta, para o volume de UMS injetado, quantidade de endotoxina inferior a 5 pg). Foram injetados 10 µL dessa solução por via intrarticular no joelho esquerdo dos camundongos.

#### 4.4 Síntese do derivado acetilado de clindamicina (DAC)

A uma mistura contendo 0,500 g (1,08 mmol) de cloridrato de clindamicina e 1 mL de anidrido acético, foram adicionados 0,025 g (0,10 mmol) de iodo molecular. A mistura reacional foi mantida sob refluxo durante 2 h. A conclusão da reação foi monitorada por cromatografia em camada fina usando acetato de etila como eluente e vapor de iodo como agente revelador. A mistura reacional foi resfriada e, em seguida, foi adicionada solução de tiosulfato de sódio a 20% gota a gota até o desaparecimento da coloração amarela. Realizou-se extração com acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio, secada sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada sob pressão reduzida para fornecer 0,575 g de um sólido branco, 96% de rendimento. O produto foi caracterizado por espectro de RMN, espectro no infravermelho e faixa de fusão.

#### 4.5 Avaliação microbiológica

##### 4.5.1 Cepas bacterianas

Os procedimentos microbiológicos foram realizados empregando cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC®):

*Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™)

*Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™)

*Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213™)

*Salmonella typhimurium* (ATCC® 1331™)

O armazenamento das cepas de referência ATCC® e de rotina foi feito por meio da manutenção das mesmas como suspensões em solução contendo leite desnatado a 10% (p/v) acrescido de glicerol a 10% (v/v) (solução LDG). Para cada cepa, foi preparada uma suspensão densa (obtida a partir de crescimento de 24 h) diretamente em 1,0 mL de solução LDG previamente distribuída em tubos plásticos com tampa de rosca próprios para congelamento (Inlab). A seguir, esses tubos foram armazenados em uma temperatura de cerca de -20 °C até a realização dos ensaios biológicos.

#### **4.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

O procedimento de microdiluição em caldo Müller-Hinton (CMH) descrito pelo CLSI foi realizado para determinação da menor concentração da solução-teste da amostra necessária para inibir o crescimento bacteriano visível (CIM) (CLSI, 2012). Diluições seriadas das amostras e dos antimicrobianos (ampicilina e cloranfenicol) foram preparadas diretamente em microplacas de 96 poços, obtendo-se concentrações de 500 a 4 µg/mL. O mesmo foi realizado para clindamicina e DAC, obtendo-se concentrações de 500 a 0,49 µg/mL. A visualização dos resultados foi facilitada pela adição de solução de cloreto de trifeniltetrazólio (CTT). Após incubação por 30 min, os poços que apresentaram coloração avermelhada indicaram crescimento bacteriano e os que mantiverem a cor original, ausência de crescimento. Cada ensaio foi realizado em quadruplicata, sendo que no quarto poço não foi acrescido indicador biológico para que o conteúdo do mesmo pudesse ser utilizado para determinação da Concentração Bactericida Mínima.

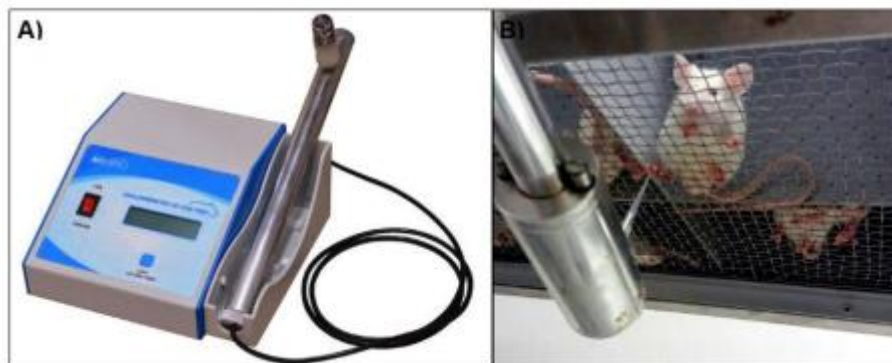
#### **4.5.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

A determinação da CBM foi realizada de acordo com o método descrito por Andrews (2001), com pequenas adaptações. A partir das colunas das microplacas do ensaio de determinação da CIM que não receberam solução de CTT, foram retiradas alíquotas de 10 µL dos poços correspondentes àqueles onde não foi observado crescimento bacteriano (CIM e duas ordens acima).

Essas alíquotas foram então, estriadas em placas de Petri contendo Ágar Müeller-Hinton (AMH) previamente identificadas com os poços de origem da microplaca. Após incubação por 16 a 20 h, em aerobiose, a  $35 \pm 2$  °C, foi observada a presença ou ausência de crescimento de colônias. Assim, as concentrações das amostras que permitiram o desenvolvimento bacteriano no AMH foram definidas como as que não permitiram o crescimento.

#### **4.6 Avaliação da alodínia mecânica induzida por zimosano ou UMS**

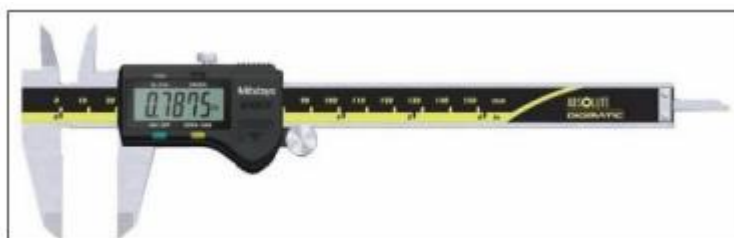
Para avaliação da alodínia mecânica, os camundongos foram colocados em compartimentos de acrílico (22 x 18 x 14 cm) dispostos sobre um suporte que possui como base uma tela metálica. Os animais foram ambientados no aparato em uma sessão diária de 60 min cada, durante dois dias antes da realização do experimento e em uma sessão de 10 min, imediatamente antes do experimento. A alodínia mecânica foi avaliada por meio do uso de um analgesímetro digital (Insight Ltda., Ribeirão Preto, Brasil) (Figura 3A), o qual permite determinar o limiar para a retirada da pata, que é expresso em gramas (g). Uma ponteira de polietileno, acoplada a um braço transdutor de força (faixa: 0,1 a 1000 g, ou aproximadamente 0,1 a 10 N), foi pressionada sobre o centro da superfície plantar da pata posterior direita de cada animal (Figura 3B) e um aumento gradual de pressão foi feito até que o animal retirasse a pata. O valor indicando a pressão que fez com que o animal removesse a pata foi registrado automaticamente. Para cada animal, foram feitas cinco avaliações em intervalos de 20 s, descartando-se o maior e o menor valor e calculando-se o limiar nociceptivo como a média das três medidas restantes. O limiar basal para retirada de pata de cada animal foi determinado no dia anterior ao teste e a divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as massas corporais e os limiares basais médios dos diferentes grupos fossem semelhantes.



**Figura 3:** Analgesímetro digital utilizado para avaliação da alodínia mecânica (A); aparato e forma da avaliação da alodínia em camundongos (B).

#### 4.7 Avaliação do diâmetro articular

Para avaliação do diâmetro articular nos protocolos de inflamação articular induzida zimosano ou UMS, foi utilizado um paquímetro digital (Mitutoyo, modelo 200 mm, resolução 0,01 mm, escala Absolute). A aferição foi realizada com o animal imobilizado e o diâmetro foi medido com leve extensão do joelho esquerdo, o qual recebeu a injeção i.a. do estímulo inflamatório ou controle (Figura 4).



**Figura 4:** Paquímetro digital utilizado para medida do diâmetro articular.

#### 4.8 Padronização do modelo de inflamação articular induzida por zimosano

A indução de inflamação articular em camundongos seguiu o método descrito por Guerrero et al. (2006), que consiste na injeção i.a. no joelho esquerdo de salina estéril (10  $\mu$ L) ou zimosano (50  $\mu$ g em 10  $\mu$ L de solução salina estéril). A injeção foi realizada em animais anestesiados com solução contendo

cetamina (80 mg/Kg) e xilazina (8 mg/Kg), por via i.p. O protocolo de padronização teve duração de 96 h, ocorrendo avaliações do limiar de retirada da pata ao estímulo mecânico e diâmetro articular imediatamente antes e 3, 5, 7, 24, 48, 72 e 96 h após a indução da inflamação.

#### **4.9 Efeito induzido pelo pré- ou pós-tratamento com clindamicina sobre a alodínia mecânica e o edema articular induzidos por zimosano**

Os animais foram tratados com três diferentes doses de clindamicina (100, 200 e 400 mg/kg; i.p.), 1 h antes ou 1 h após a injeção de zimosano por via i.a. Os animais do grupo controle receberam dexametasona (10 mg/kg; i.p.). As avaliações do limiar de retirada da pata ao estímulo mecânico e diâmetro articular foram realizadas 3, 5, 7, 24 e 48 h após a indução da inflamação. Para cada grupo experimental foram utilizados seis animais.

#### **4.10 Efeitos induzidos por naltrexona, glibenclamida e AM251 sobre a atividade antialodínica da clindamicina**

Com o objetivo de avaliar os possíveis mecanismos envolvidos na atividade antialodínica da clindamicina, foram utilizados um antagonista opioidérgico (naltrexona, 5 e 10 mg/kg), um bloqueador de canais para potássio ATP-dependentes (glibenclamida, 20 e 40 mg/kg) e um antagonista canabinoidérgico (AM251, 4 e 8 mg/kg). Naltrexona e AM251 (- 30 min) foram administrados por via i.p., enquanto glibenclamida (- 30 min) foi administrada *p.o.*, previamente à administração i.p. de clindamicina. Os animais receberam injeções i.a. de zimosano no joelho esquerdo, 1 h antes a administração de clindamicina, e a alodínia mecânica foi avaliada 3, 5, 7 h após a indução da inflamação.



#### **4.11 Efeito induzido pelo pré-tratamento com DAC sobre a alodínia mecânica e o edema articular induzidos por zimosano**

Os animais foram pré-tratados com três diferentes doses de DAC (109, 218 e 436 mg/kg; i.p.), equimolares às doses de 100, 200 e 400 mg/kg de clindamicina, respectivamente, 1 h antes da injeção i.a. de zimosano. Os animais do grupo controle receberam clindamicina (400 mg/kg; i.p.). As avaliações do limiar de retirada de pata e diâmetro articular foram realizadas 3, 5, 7 e 24 h após a indução da inflamação. Para cada grupo experimental, foram utilizados seis animais.

#### **4.12 Contagem total e diferencial dos leucócitos no lavado articular**

Para a determinação do número total de leucócitos, uma alíquota de 20 µL do lavado articular foi diluída duas vezes em solução de lise de hemácias Turk e a contagem foi realizada com auxílio da câmara de Neubauer. A partir da alíquota remanescente (80 µL) do lavado articular, foram acrescentados 50 µL de mBSA 3% e citocentrifugação para confeccionar as lâminas da contagem diferencial. As lâminas foram coradas com corante panótico e a contagem diferencial de células (mononucleares e neutrófilos) foi feita em microscópio óptico em aumento de 100 vezes. Foram contadas 100 células. A porcentagem dos tipos celulares investigados foi baseada na contagem total por meio de uma regra de três simples. O número de células foi determinado considerando o valor obtido multiplicado pela diluição e pelo fator de correção da câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos ou mononucleares  $\times 10^4$ /cavidade articular. O tempo de coleta do lavado foi estabelecido em 24 h com base no perfil temporal da resposta no modelo experimental de inflamação articular induzida por zimosano, tanto para os animais tratados com clindamicina ou com DAC.

#### 4.13 Coleta e preparo das amostras

Para determinar as concentrações das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e CXCL-1, foi coletado o tecido periarticular do joelho esquerdo dos camundongos. Os materiais coletados foram estocados a -70 °C até o dia da análise. O tecido periarticular foi devidamente homogeneizado (Ultrastirrer, modelo ULTRA 80-II) em solução de extração de citocinas, seguido de centrifugação para utilização do sobrenadante (3000 rpm, 10 min a 4° C). O sedimento do homogeneizado foi usado para a determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

#### 4.14 Quantificação de citocinas *in vivo*

As concentrações das citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e CXCL-1) foram determinadas de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems). O ensaio foi realizado em placa de microtitulação de 96 poços. O anticorpo de captura foi diluído em PBS e foram adicionados 50  $\mu$ L desse anticorpo em cada poço. A placa foi mantida na geladeira (4 °C) durante 12 h. Posteriormente, a placa foi lavada com tampão de lavagem e bloqueada com tampão de bloqueio (BSA 1%). Após o tempo de 1 h, a placa foi novamente lavada e adicionados 50  $\mu$ L do TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e CXCL-1 (duplicata), em diluição seriada, correspondentes à curva-padrão, nas duas primeiras colunas da placa. Nos outros poços, foram adicionados 50  $\mu$ L dos sobrenadantes diluídos (1:3) em BSA 0,1% e nos últimos dois poços, foram adicionados 50  $\mu$ L de PBS (branco). A placa foi devidamente vedada e armazenada na geladeira (4 °C) durante 12 h. Em seguida, a placa foi lavada e foram adicionados 50  $\mu$ L do anticorpo de detecção em cada poço e, durante 2 h, a placa foi mantida no agitador para microplaca de ELISA. Após esse período, a placa foi lavada e foram adicionados 50  $\mu$ L do revelador estreptavidina em cada poço e, durante 20 min, a placa foi mantida novamente no agitador. Finalmente, foram adicionados 50  $\mu$ L da solução do substrato (OPD) em cada poço. A reação foi monitorada de acordo com o aparecimento de coloração amarelada (5 a 15 min) e foi interrompida com a adição de 25  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A leitura foi feita no leitor de ELISA, usando

comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em quantidade da respectiva citocina presente no tecido (pg/100 mg de tecido).

#### **4.15 Quantificação de TNF- $\alpha$ *in vitro***

Macrófagos murinos (RAW264.7) foram obtidos da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA). As culturas de células foram mantidas em meio DMEM (Cultilab) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>. Depois de atingir 70-80% de confluência, as células foram privadas de soro durante a noite e a viabilidade foi determinada usando um ensaio de exclusão de corante azul de tripano. As células foram pré-tratadas com clindamicina (10  $\mu$ M) ou DAC (10  $\mu$ M) e, após 1 h, estimuladas com zimosano (300  $\mu$ g/mL). Após incubação por 5 h, a solução sobrenadante foi coletada para determinar a concentração de TNF- $\alpha$  usando ELISA, de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, EUA). As densidades ópticas foram determinadas em um comprimento de onda de 450 nm e a concentração de TNF- $\alpha$  foi expressa em pg/mL. Duas repetições técnicas foram realizadas e todo o experimento foi repetido pelo menos três vezes.

#### **4.16 Efeito da clindamicina ou DAC sobre a fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$ induzida por zimosano**

Após o processamento do tecido periarticular, o sobrenadante foi coletado e utilizado para avaliar a fosforilação do I $\kappa$ B $\alpha$ . O kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, EUA) baseado no método de Bradford foi usado para determinar a concentração de proteínas totais. O teste foi realizado em microplaca de 96 poços (NUNC™) e consistiu na adição de 2  $\mu$ L de cada amostra a 200  $\mu$ L do corante diluído cinco vezes em água destilada, em duplicatas. Após 5 min de incubação, a leitura foi feita em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices, EUA) em um comprimento de onda de 595 nm. Em seguida, 50  $\mu$ g de proteínas totais foram desnaturadas em tampão Laemmli, mantidos a 100 °C por 5 min e fracionados em gel de poliacrilamida/SDS a 10%. No final da corrida, eles foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Hybond™ ECL™, GE Healthcare, EUA).

As membranas foram bloqueadas com PBS-Tween 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado por 1 h. Em seguida, foram lavados com PBS-Tween e incubados com o anticorpo de interesse a 4 °C, durante o período da noite. Após lavagem novamente com PBS/Tween e incubação por 1 h em temperatura ambiente com o respectivo anticorpo secundário ligado à peroxidase, as membranas foram incubadas em uma solução reveladora ECL™ (GE Healthcare, EUA) e expostas contra filme de raios-X (Hyperfilm ECL™, GE Healthcare, EUA). O filme foi revelado em revelador e fixador (Kodak), conforme indicação do fabricante. Os anticorpos usados e suas concentrações foram: anti-P-IkBα (# 9246) e anti-GAPDH (# 3668) a 1: 1.000 (CellSignaling Technology, EUA) e anticorpos secundários conjugados com peroxidase-anti-coelho e anti-camundongo em 1:3000 (Santa Cruz Biotechnology, EUA). Os valores de P-IkBα foram quantificados usando um software de análise densitométrica (Image J, National Institute of Health, EUA). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA) e normalizados para os valores de GAPDH na mesma amostra.

#### **4.17 Atividade da MPO**

Com o sedimento resultante, foram adicionados 750 µL de solução de NaCl 0,2% gelado para cada 50 mg de tecido, 30 s. Em seguida, foi adicionado NaCl 1,6% com glicose 5% gelado (750 µL para cada 50 mg de tecido). Uma nova homogeneização foi realizada e o homogenato foi armazenado a -70 °C até a realização do ensaio. Os homogenatos foram inicialmente descongelados em temperatura ambiente e novamente congelados em nitrogênio líquido, por três vezes. Adicionalmente, foram descongelados em água corrente. Os congelamentos e descongelamentos foram repetidos por três vezes. Após esses ciclos, os homogenatos foram centrifugados por 15 min a 10.000 rpm a 4 °C e os sobrenadantes obtidos foram coletados para a realização do ensaio enzimático. O ensaio foi realizado em placa de microtitulação de 96 poços. Nos primeiros dois poços, foram adicionados 25 µL de tampão PBS (branco). Nos outros poços, foram adicionados, em duplicata, 25 µL dos sobrenadantes diluídos (1:3). Após o preenchimento da placa com todas as amostras, foram adicionados 25 µL da solução de 3,3',5,5',-tetrametilbenzidina (TMB; 3,8 mg/mL

em DMSO) em cada poço e a placa foi incubada a 37 °C por 5 min. Após esse intervalo, foram adicionados 100 µL da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em cada poço e a placa foi incubada novamente a 37 °C por 5 min. Para finalizar, foram adicionados 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em cada poço. A atividade da MPO foi calculada de acordo com a alteração da densidade óptica (D.O.), avaliada em leitor de ELISA, utilizando comprimento de onda de 450 nm.

#### **4.18 Padronização do modelo de inflamação articular induzida por UMS**

A indução de inflamação articular em camundongos, baseada em método descrito por Amaral et al. (2016), Vieira et al. (2015) e Torres et al. (2009), consistiu na administração i.a. de UMS (100 µg em 10 µL de solução salina estéril) no joelho esquerdo. A injeção foi feita em animais anestesiados com a mistura de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg). O protocolo de padronização teve duração de 48 h, ocorrendo avaliações do limiar de retirada da pata ao estímulo mecânico e diâmetro articular imediatamente antes e 3, 5, 7, 24 e 48 h após a indução da inflamação.

#### **4.19 Efeito induzido por clindamicina sobre a alodínia mecânica e o edema articular induzidos por UMS**

Os animais foram pré-tratados com três diferentes doses de clindamicina (100, 200 e 400 mg/kg; i.p.), 1 h antes a injeção de UMS por via i.a. no joelho esquerdo dos animais. Os animais do grupo controle receberam dexametasona (10 mg/kg; i.p.). As avaliações de alodínia mecânica e diâmetro articular foram realizadas 3, 5, 7 e 24 h após a indução da inflamação. Para cada grupo experimental foram utilizados seis animais.

#### **4.20 Análise estatística**

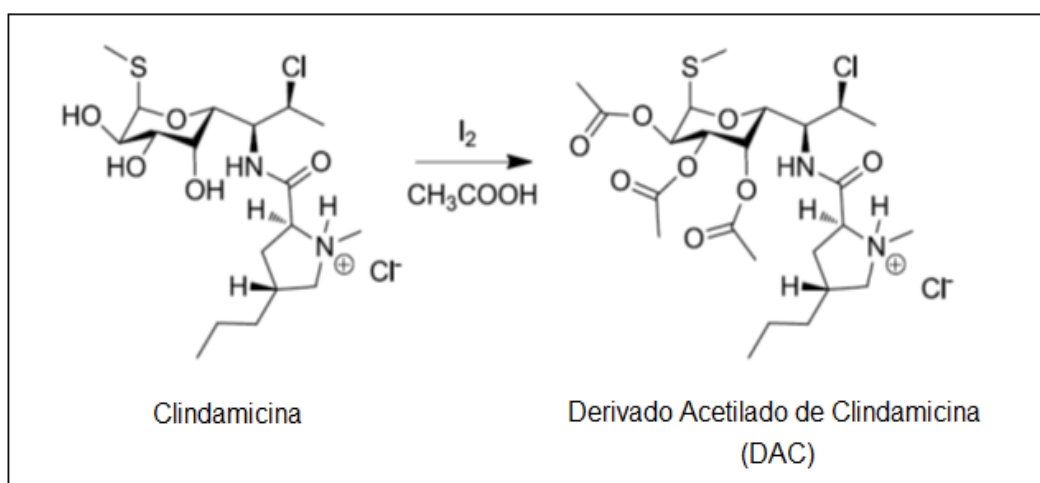
Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism® 5.0 (San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média e analisados por meio da análise de variância simples de uma via, seguido

pelo teste de Newman-Keuls ou por meio de análise de variância de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni. Adotou-se um nível de significância de 5%.

## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 Síntese do derivado acetilado da clindamicina (DAC)

O DAC foi obtido a partir de uma reação de acetilação catalisada por iodo com alto rendimento (96%) (Figura 5). O DAC foi isolado como uma base livre após lavagem com solução aquosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  durante o processamento da reação e usado nessa forma nos experimentos. A estrutura do DAC (Figura 5) foi confirmada pela análise de seus espectros de infravermelho, faixa de fusão e ressonância magnética nuclear (RMN).



**Figura 5:** Síntese do derivado acetilado da clindamicina (DAC).

### 5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

A CIM e CBM da clindamicina e DAC para três cepas de *S. aureus* e uma de *S. Typhimurium* são apresentadas na Tabela 1. Em relação à CIM, a clindamicina foi ativa contra as três cepas de *S. aureus* (CIM <9,0  $\mu\text{M}$ ) e *S. Typhimurium* (CIM = 135  $\mu\text{M}$ ). Por outro lado, o DAC inibiu o crescimento bacteriano de *S. aureus* e *S. Typhimurium* em concentrações muito mais altas (CIM > 900  $\mu\text{M}$  para todas

as cepas). Em relação à CBM, a clindamicina também foi ativa contra as três cepas de *S. aureus* (CIM  $\leq$  34,7  $\mu$ M), enquanto o DAC não inibiu efetivamente seu crescimento (CIM > 900  $\mu$ M). Não foi possível determinar a CBM para clindamicina e DAC contra *S. Typhimurium*, pois estavam acima do gradiente testado. Clindamicina e DAC foram classificados como bacteriostáticos.

**Tabela 1** - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da clindamicina (CLI), derivado acetilado de clindamicina (DAC) e ampicilina (AMP)

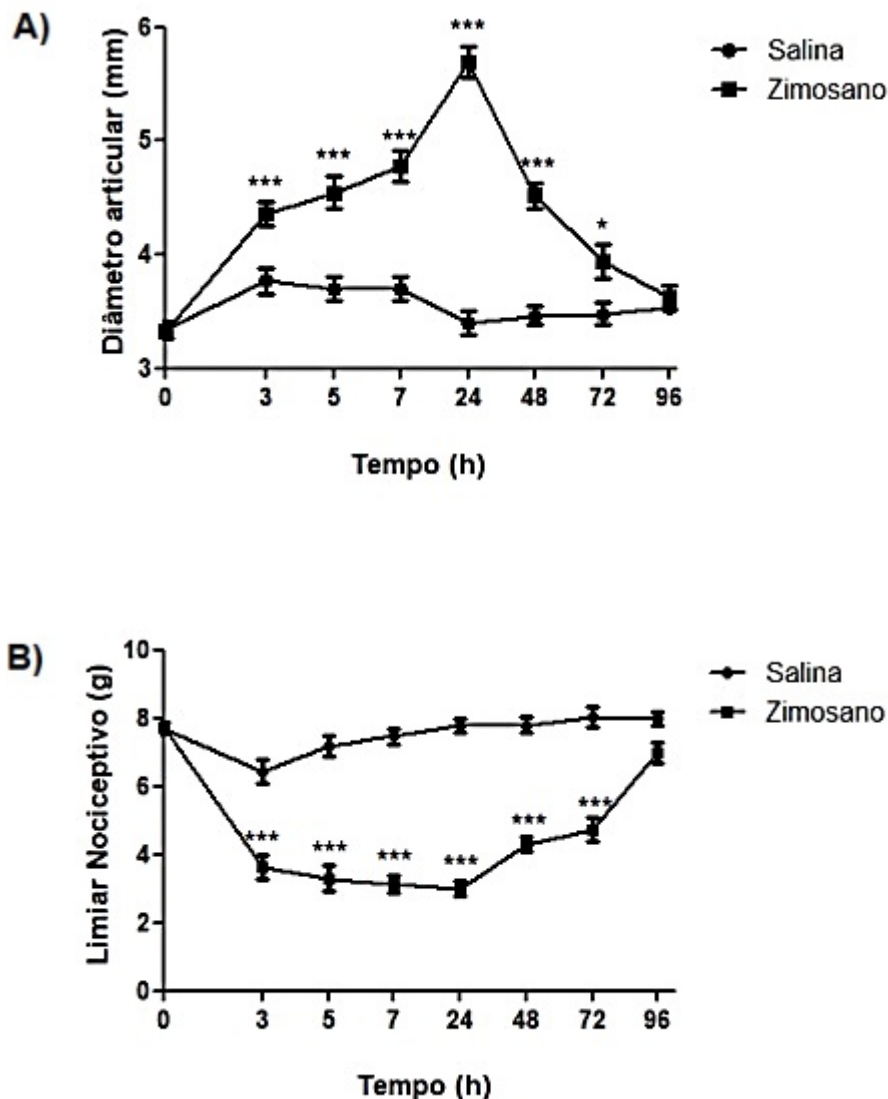
Cepa bacteriana	CIM						CBM					
	$(\mu\text{g/mL})$			$(\mu\text{M})$			$(\mu\text{g/mL})$			$(\mu\text{M})$		
	CLI	DAC	AMP	CLI	DAC	AMP	CLI	DAC	AMP	CLI	DAC	AMP
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC <sup>®</sup> 6538 <sup>™</sup> )	< 4	500	< 4 <sup>a</sup>	< 9.0	> 900	< 11.4	8	> 500	-	17.3	> 900	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC <sup>®</sup> 25923 <sup>™</sup> )	< 4	> 500	< 4 <sup>a</sup>	< 9.0	> 900	< 11.4	16	> 500	-	34.7	> 900	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC <sup>®</sup> 29213 <sup>™</sup> )	< 4	> 500	< 4 <sup>a</sup>	< 9.0	> 900	< 11.4	< 4	> 500	-	< 9.0	> 900	-
<i>Salmonella Typhimurium</i> (ATCC <sup>®</sup> 13311 <sup>™</sup> )	62.5	> 500	< 4 <sup>b</sup>	135	> 900	< 11.4	> 500	> 500	-	> 1000*	> 900*	-

Os valores de CIM para ampicilina estão dentro dos intervalos descritos pelo CLSI. Os valores de CIM para ampicilina (a)  $\leq$  0,12 e  $\geq$  0,25  $\mu\text{g/mL}$  indicam a bactéria como sensível e resistente, respectivamente; (b) Valores de CIM para ampicilina  $\leq$  8, 16 e  $\geq$  32  $\mu\text{g/mL}$  indicam a bactéria como sensível, intermediária e resistente, respectivamente. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas para clindamicina e DAC e em triplicata para ampicilina.

\* Não foi possível determinar a CBM das amostras, pois estavam abaixo ou acima do gradiente testado.

### 5.3 Padronização do modelo de inflamação articular induzida por zimosano

A injeção i.a. de zimosano induziu edema articular (Figura 6A) e alodínia mecânica (Figura 6B). Conforme observado, essas respostas se mantiveram por até 72 h. O grupo controle, que recebeu injeção i.a. de salina estéril, não apresentou alterações significativas nos parâmetros avaliados.



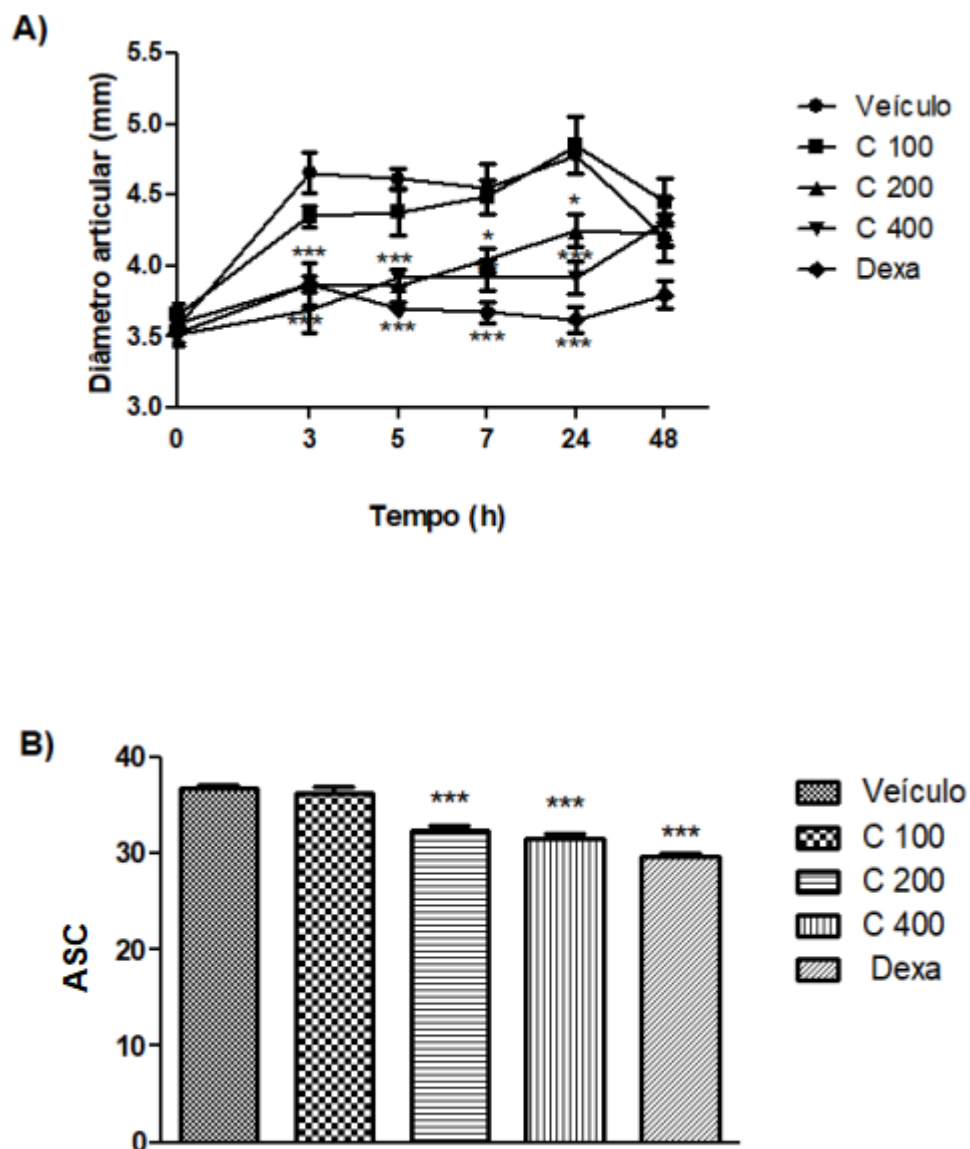
**Figura 6:** Diâmetro articular (A) e limiar nociceptivo (B) após administração i.a. de salina estéril (10  $\mu$ L) ou zimosano (50  $\mu$ g/10  $\mu$ L). \* e \*\*\* indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n = 6$ .

#### 5.4 Efeito induzido pelo pré-tratamento com clindamicina sobre o edema articular e a alodínia mecânica induzidos por zimosano

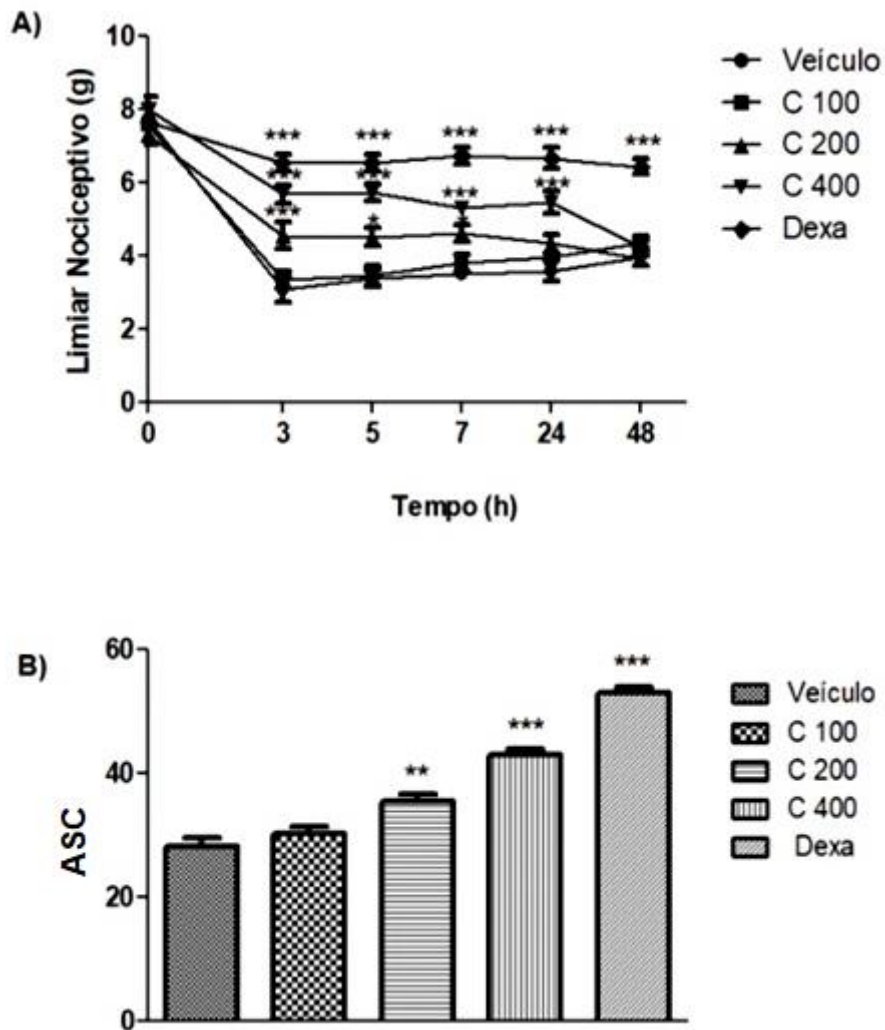
A clindamicina foi administrada 1 h antes da injeção do estímulo inflamatório. A injeção i.a. de zimosano induziu edema articular que se manteve durante todo o período de avaliação (3, 5, 7, 24 e 48 h). As doses de 200 e 400 mg/kg, mas não de 100 mg/kg, de clindamicina reduziram o edema articular por um período de até 24 h (Figura 7). O pré-tratamento com dexametasona (10 mg/kg) atenuou o edema articular



induzido por zimosano. O pré-tratamento com clindamicina, 200 e 400 mg/kg, atenuou a alodínia mecânica por até 7 ou 24 h, respectivamente. A dose de 100 mg/kg não alterou a alodínia mecânica induzida por zimosano. A alodínia mecânica foi atenuada pelo pré-tratamento com dexametasona (Figura 8).



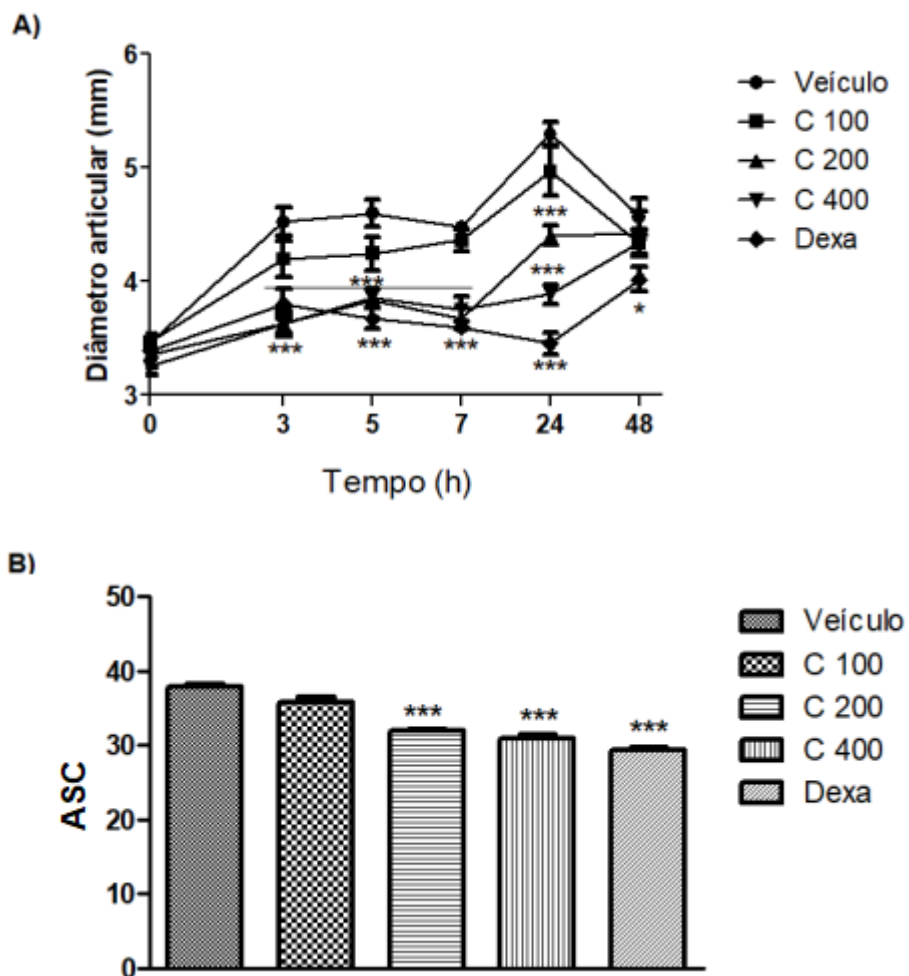
**Figura 7:** Efeito induzido por clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., - 1 h), dexametasona (Dexa; 10 mg/kg, i.p., -1 h) ou veículo sobre o edema articular induzido por zimosano. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \* e \*\*\* indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n=6$ .



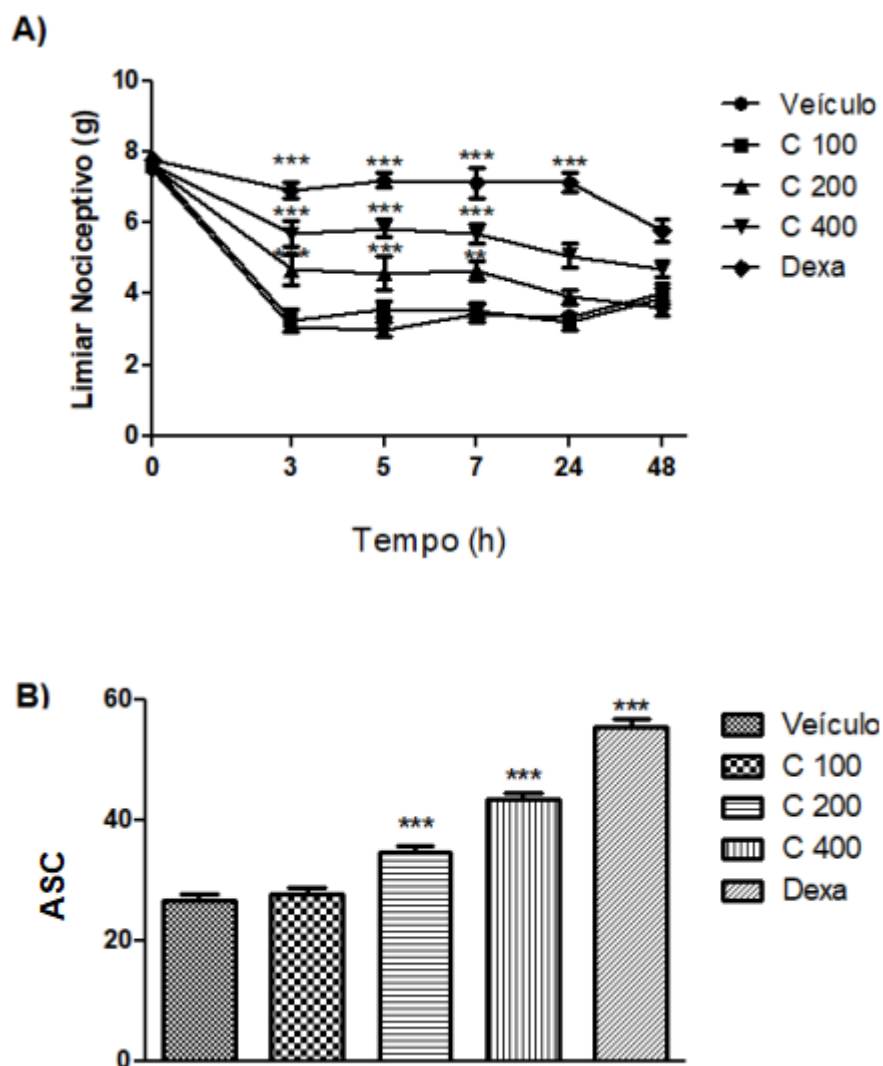
**Figura 8:** Efeito induzido por clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., - 1 h), dexametasona (Dexa; 10 mg/kg, i.p., -1 h) ou veículo sobre a alodínia mecânica induzida por zimosano. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \*, \*\* e \*\*\* indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n=6$ .

### **5.5 Efeito induzido pelo pós-tratamento com clindamicina sobre o edema articular e a alodínia mecânica induzidos por zimosano**

No protocolo de pós-tratamento, a clindamicina (100, 200 e 400 mg/kg) foi administrada 1 h após a injeção i.a. de zimosano. Conforme observado, o edema articular permaneceu de forma marcante por até 48 h. A administração de clindamicina, nas doses de 200 e 400 mg/kg, mas não de 100 mg/kg, atenuou de forma marcante o edema articular por até 24 h. O pós-tratamento com o dexametasona (10 mg/kg) reduziu o edema articular por 48 h (Figura 9). A administração de clindamicina, nas doses de 200 e 400 mg/kg, mas não de 100 mg/kg, também atenuou a alodínia mecânica induzida por zimosano. O pós-tratamento com o dexametasona (10 mg/kg) reduziu a alodínia mecânica por 24 h (Figura 10).



**Figura 9:** Efeito induzido por clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., + 1 h), dexametasona (Dexa; 10 mg/kg, i.p., +1 h) ou veículo sobre o edema articular induzido por zimosano. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \* e \*\*\* indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n = 6$ .

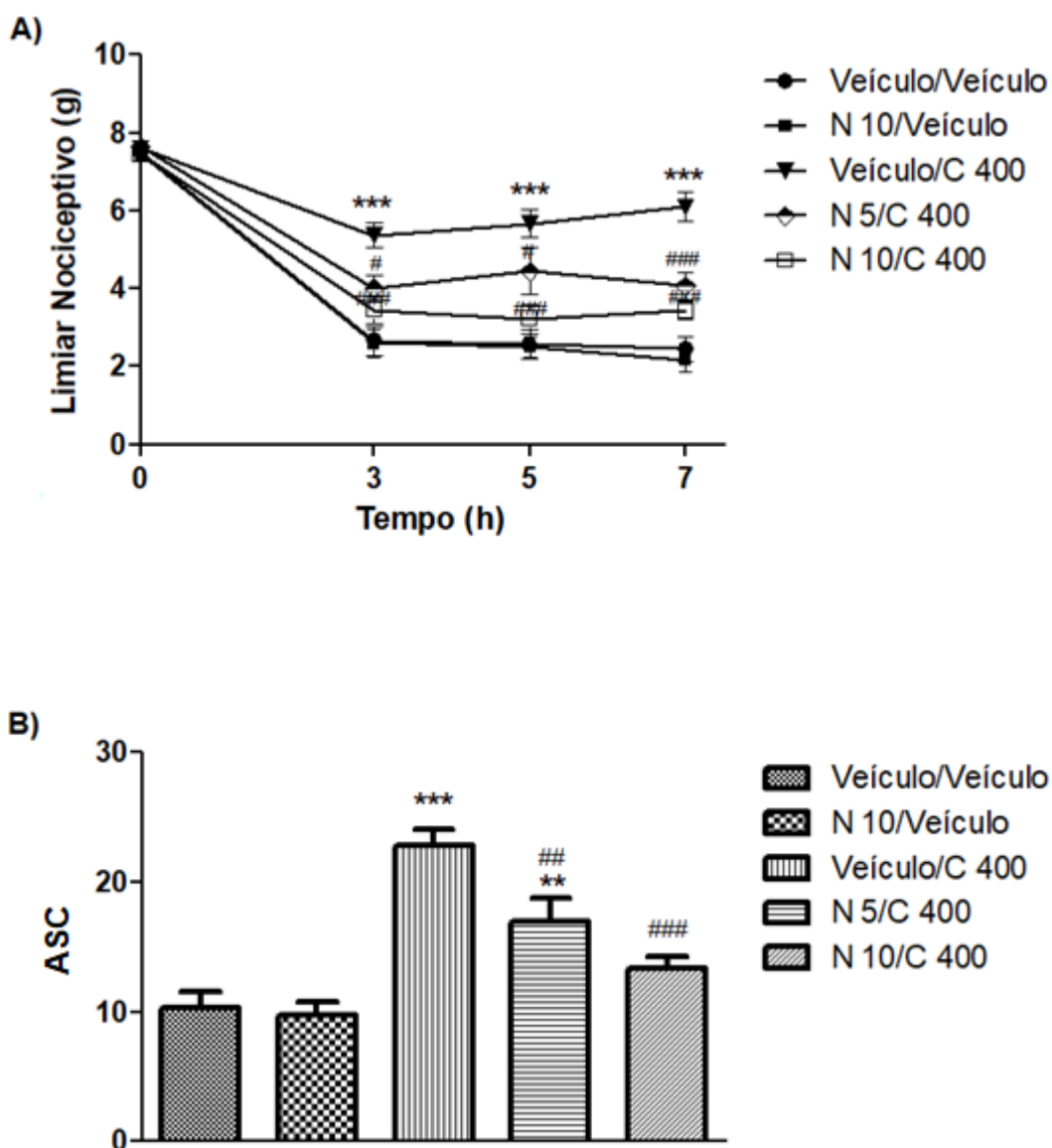


**Figura 10:** Efeito induzido por clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., + 1 h), dexametasona (Dexa; 10 mg/kg, i.p., +1 h) ou veículo sobre a alodínia mecânica induzida por zimosano. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \*\* e \*\*\* indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n=6$ .

## **5.6 Efeitos induzidos por naltrexona, glibenclamida, AM251 sobre a atividade antialodínica da clindamicina**

Em experimento anterior, verificamos que o pré-tratamento com clindamicina, nas doses de 200 e 400 mg/kg, atenuou a alodínia mecânica induzida por zimosano, sendo a melhor resposta observada para a dose de 400 mg/kg. Dessa forma, nos experimentos subsequentes, utilizando a dose de 400 mg/kg de clindamicina, foram investigados os possíveis mecanismos que estariam envolvidos na atividade antialodínica da clindamicina. Assim, investigamos os efeitos induzidos por naltrexona (antagonista de receptores opioidérgicos), glibenclamida (bloqueador de canais para potássio ATP-dependentes) e AM251 (antagonista do receptor canabinoide CB1) sobre essa atividade.

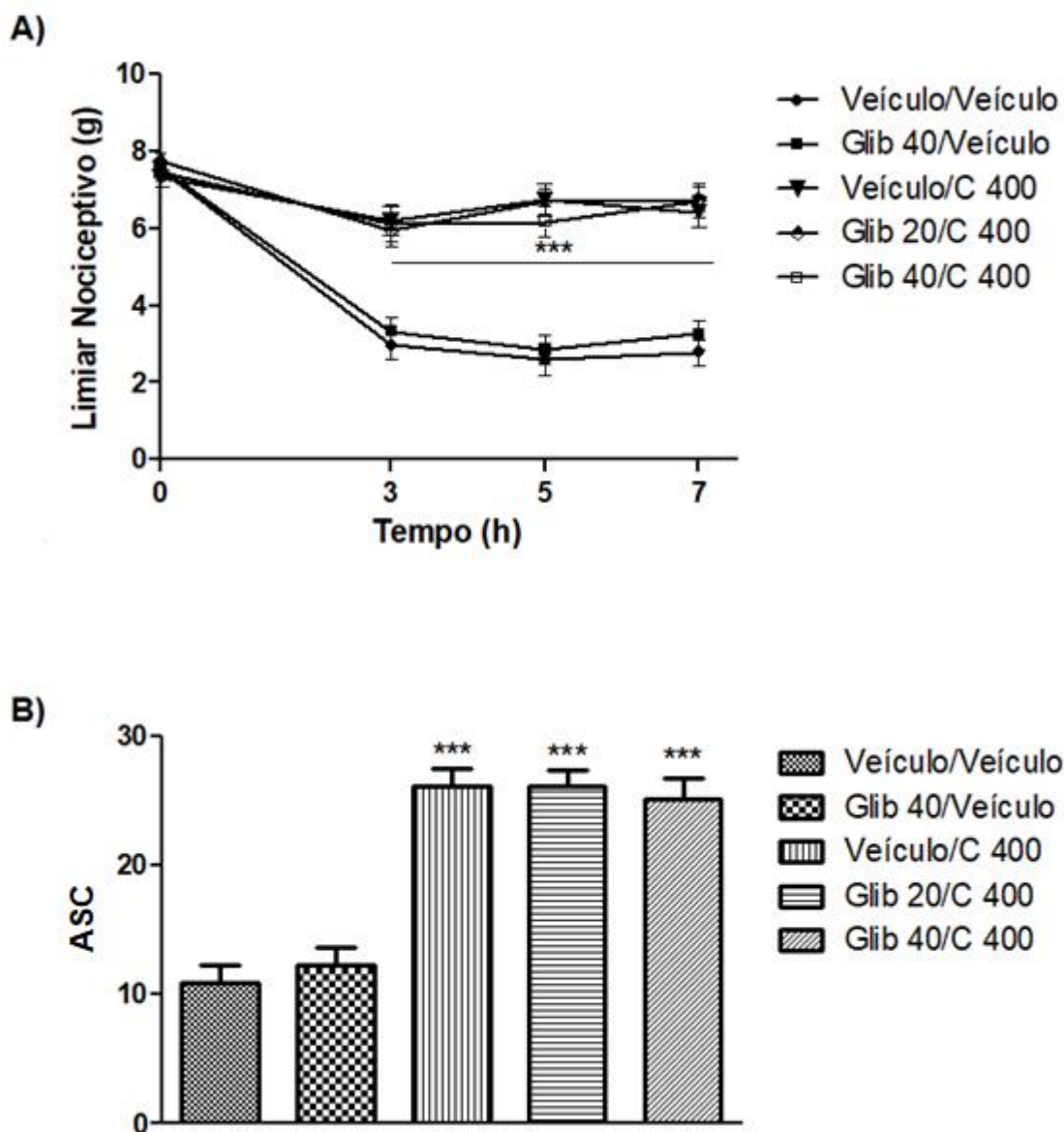
No primeiro protocolo, o tratamento com clindamicina (400 mg/kg) atenuou a alodínia mecânica induzida por zimosano. Naltrexona, nas doses de 5 e 10 mg/kg, atenuou significativamente a atividade antialodínica da clindamicina (Figura 11). Naltrexona (10 mg/kg), por si, não alterou a alodínia mecânica induzida por zimosano.



**Figura 11:** Efeito induzido pela naltrexona (N; 5 ou 10 mg/kg, i.p.; -30 min) sobre a atividade da clindamicina (C; 400 mg/kg, i. p.) no modelo de alodínia mecânica. A naltrexona foi administrada 30 min antes da clindamicina e esta foi administrada 60 min antes da avaliação do limiar nociceptivo. \*\* e \*\*\* indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente). #, ## e ### indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com clindamicina ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n=6$ .

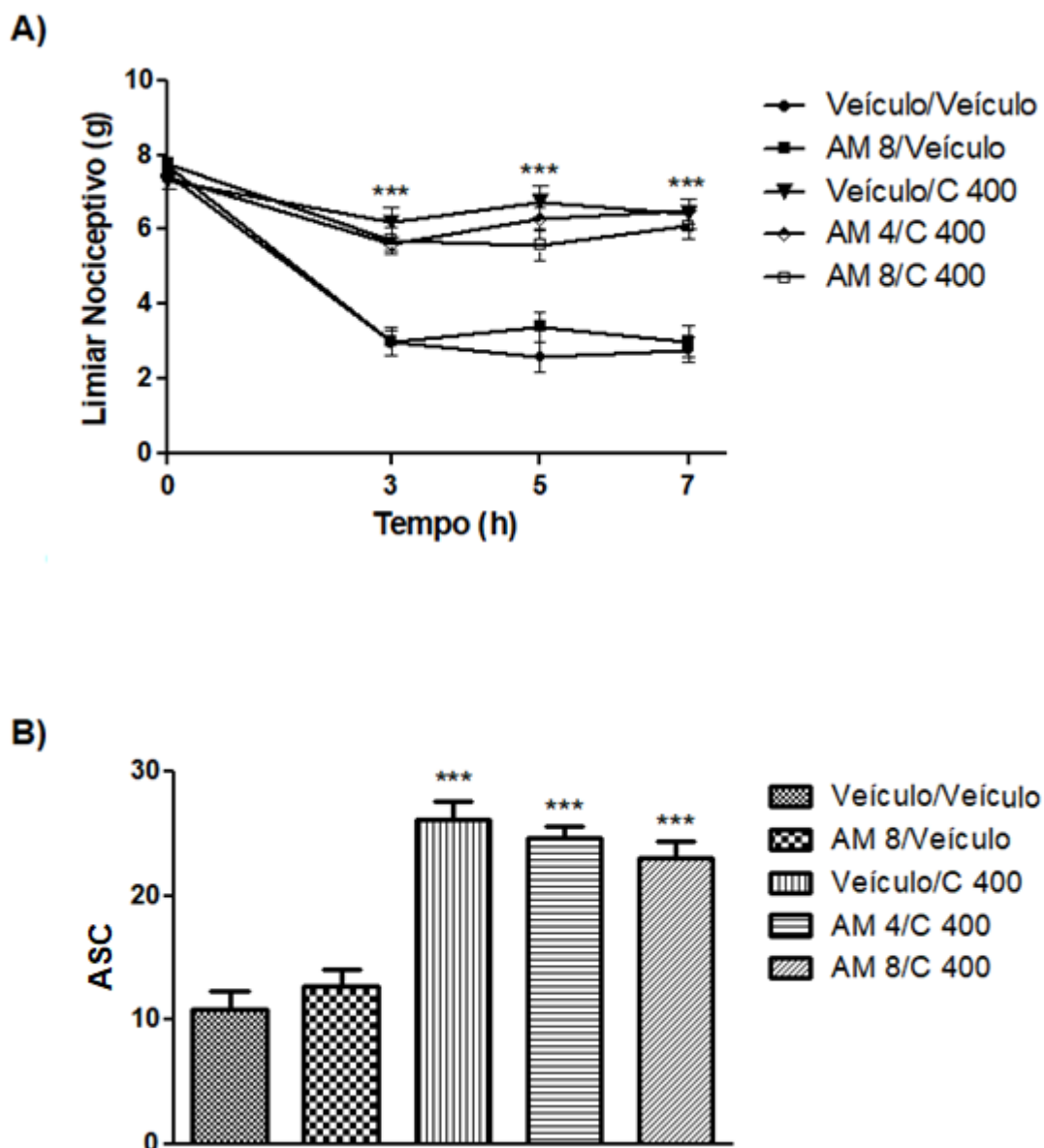


No segundo protocolo, os animais que foram tratados com clindamicina apresentaram o limiar nociceptivo em aproximadamente 6,7 g, enquanto os animais tratados apenas com veículo apresentaram um limiar em torno de 2,6 g. A glibenclamida, administrada isoladamente na dose de 40 mg/kg, não elevou o limiar nociceptivo dos animais. O tratamento prévio com glibenclamida, nas doses de 20 mg/kg ou 40 mg/kg, não alterou a atividade antialodínica da clindamicina (Figura 12).



**Figura 12:** Efeito induzido pela glibenclamida (Glib; 20 ou 40 mg/kg, *p.o.*; - 30 min) sobre a atividade antialodínica da clindamicina (C; 400 mg/kg, *i.p.*) em modelo de alodínia mecânica. A glibenclamida foi administrada 30 min antes da clindamicina e esta foi administrada 60 min antes da avaliação na alodínia mecânica. \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).  $n = 6$ .

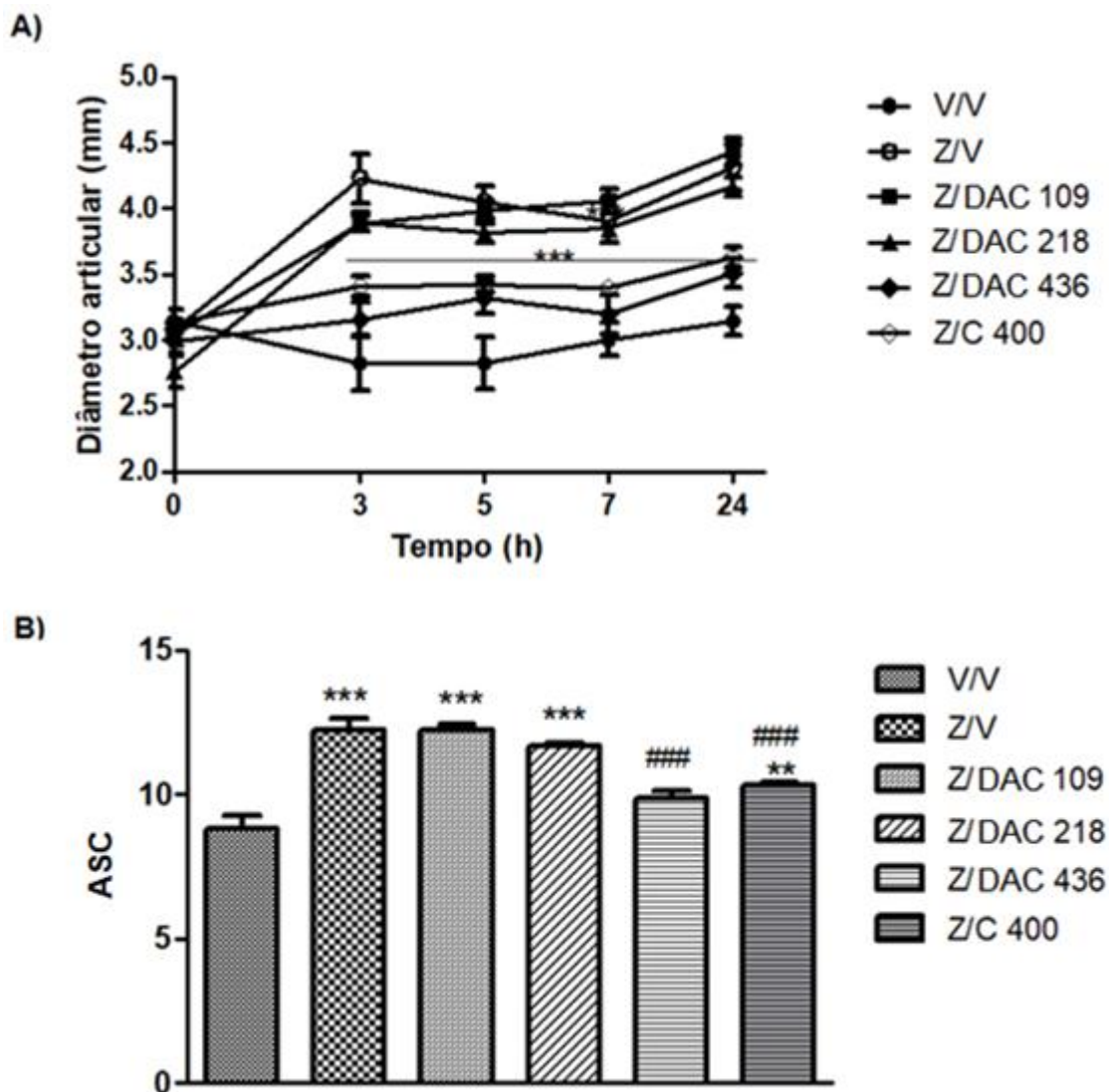
No terceiro protocolo, o limiar nociceptivo do grupo controle foi de, aproximadamente, 2,5 g. A clindamicina, na dose de 400 mg/kg, elevou o limiar nociceptivo para aproximadamente 6,7 g. O AM251, administrado isoladamente na dose de 8 mg/kg, não elevou o limiar, sendo, este, de aproximadamente 3,2 g. O tratamento prévio com AM251, nas doses de 4 mg/kg ou 8 mg/kg, não alterou a atividade antialodínica da clindamicina (Figura 13).



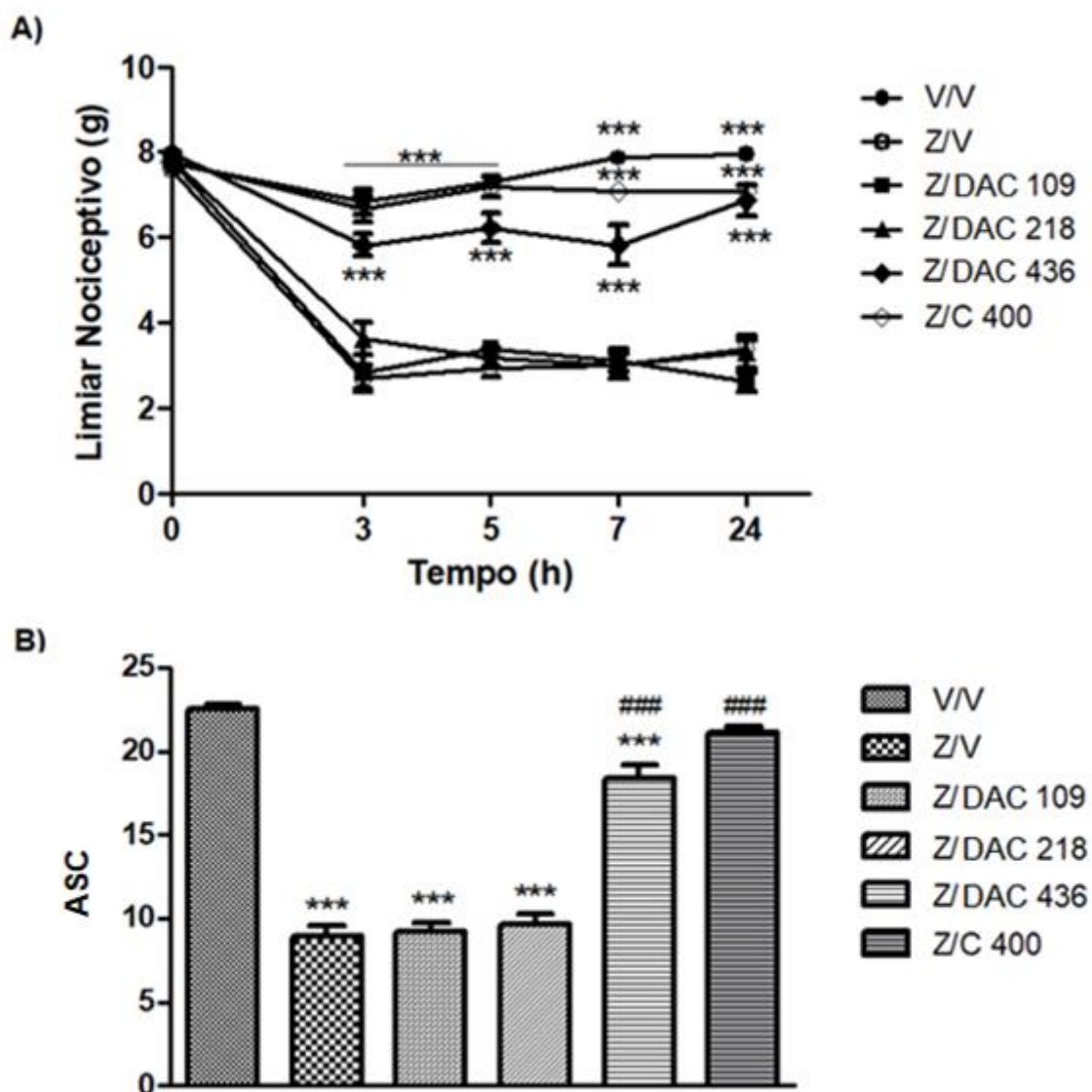
**Figura 13:** Efeito induzido pelo AM251 (AM; 4 ou 8 mg/kg, i.p.; - 30 min) sobre a atividade antialodínica da clindamicina (C; 400 mg/kg, i.p.) em modelo de alodínia mecânica. O AM251 foi administrado 30 min antes da clindamicina e esta foi administrada 60 min antes da avaliação na placa quente. \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).  $n=6$ .

### **5.7 Efeito induzido pelo DAC sobre o edema articular e a alodínia mecânica induzidos por zimosano**

As atividades do DAC foram avaliadas no modelo de inflamação articular induzida por zimosano. A administração prévia (1 h) da maior dose de DAC (436 mg/kg, i.p.), mas não das menores doses (109 e 218 mg/kg, i.p.), inibiu o edema articular (Figura 14) e a alodínia mecânica (Figura 15). Essas respostas também foram inibidas pela administração prévia (1 h) de clindamicina (400 mg/kg; i.p.), usada como controle positivo (Figuras 14 e 15).



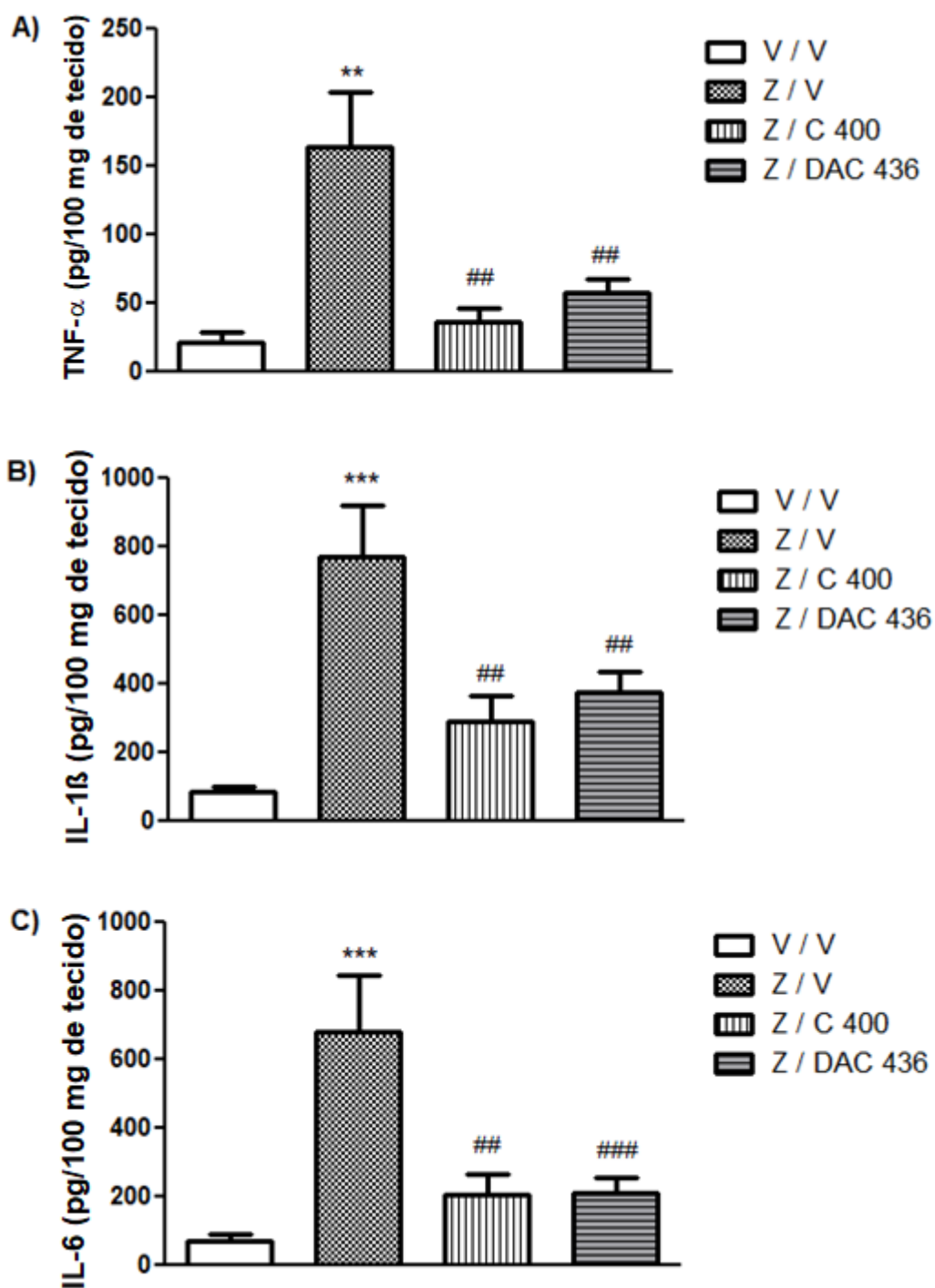
**Figura 14:** Efeito induzido pelo derivado acetilado da clindamicina (DAC; 109, 218 e 436 mg/kg, i.p., - 1 h), clindamicina (C; 400 mg/kg, i.p., -1 h) ou veículo (V) sobre o diâmetro articular induzido por zimosano (Z; 10  $\mu$ L, i.a). (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \*\* e \*\*\* indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente). ### indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Z/V ( $p < 0,001$ )  $n=6$ .



**Figura 15:** Efeito induzido pelo derivado acetilado da clindamicina (DAC; 109, 218 e 436 mg/kg, i.p., - 1 h), clindamicina (C; 400 mg/kg, i.p., -1 h) ou veículo (V) sobre o limiar nociceptivo induzido por zimosano (Z; 10  $\mu$ L, i.a). (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). ### indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Z/V ( $p < 0,001$ )  $n=6$ .

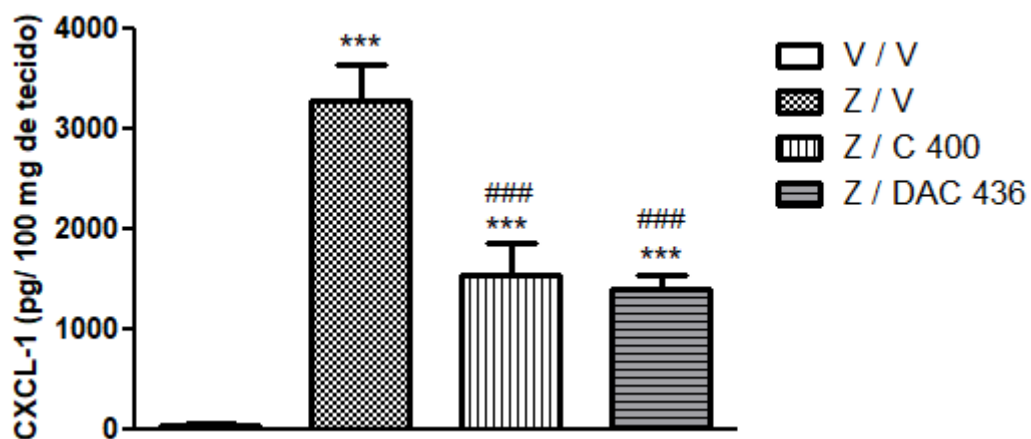
### **5.8 Efeito induzido pela clindamicina ou DAC sobre a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e CXCL-1 induzida por zimosano *in vivo***

De modo a compreender mecanismos envolvidos nas atividades anti-inflamatória da clindamicina nos modelos experimentais estudados, procedeu-se a quantificação de citocinas. Após 24 h da administração intrarticular de 10  $\mu$ L de zimosano, pode-se observar aumento da concentração de TNF- $\alpha$  (Figura 16A), IL-1 $\beta$  (Figura 16B) e IL-6 (Figura 16C) e CXCL-1 (Figura 17). Conforme observado, a administração de clindamicina (400 mg/kg, i.p.) ou de DAC (436 mg/kg, i.p.) atenuou significativamente as concentrações de todas as citocinas avaliadas.



**Figura 16:** Efeito induzido pela clindamicina (C; 400 mg/kg, i.p., -1 h) ou derivado acetilado da clindamicina (DAC; 436 mg/kg, i.p., -1 h) sobre a concentração de TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C) no tecido periarticular coletado 24 h após a injeção i.a. de 10  $\mu$ L de zimosano (Z). Veículo (V). \*\* e \*\*\* indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ; respectivamente). ## e ### indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Z/V ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ; respectivamente).  $n = 6$ .

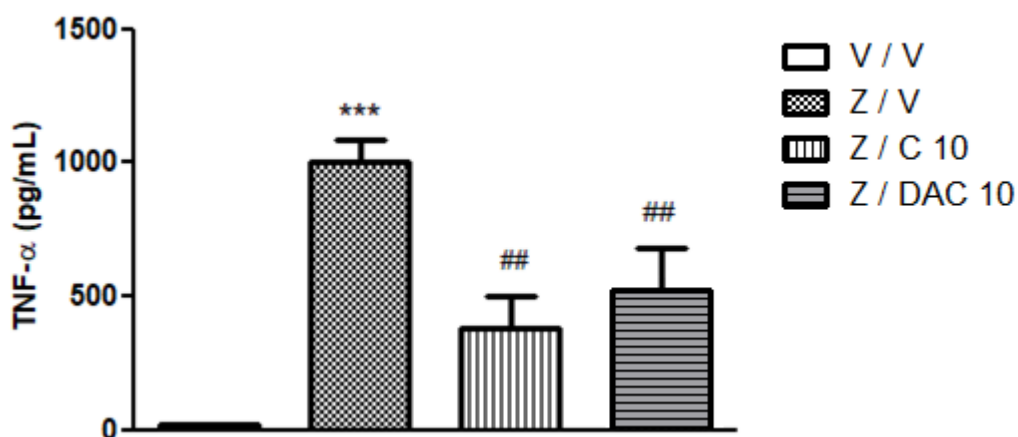




**Figura 17:** Efeito induzido pela clindamicina (C; 400 mg/kg, i.p., -1 h) ou derivado acetilado da clindamicina (DAC; 436 mg/kg, i.p., - 1 h) sobre a concentração de CXCL-1 no tecido periarticular coletado 24 h após a injeção i.a. de 10  $\mu$ L de zimosano (Z). Veículo (V). \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). ### indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Z/V ( $p < 0,001$ ). n=6.

### 5.9 Efeito induzido pela clindamicina ou DAC sobre a produção de TNF- $\alpha$ induzida por zimosano *in vitro*

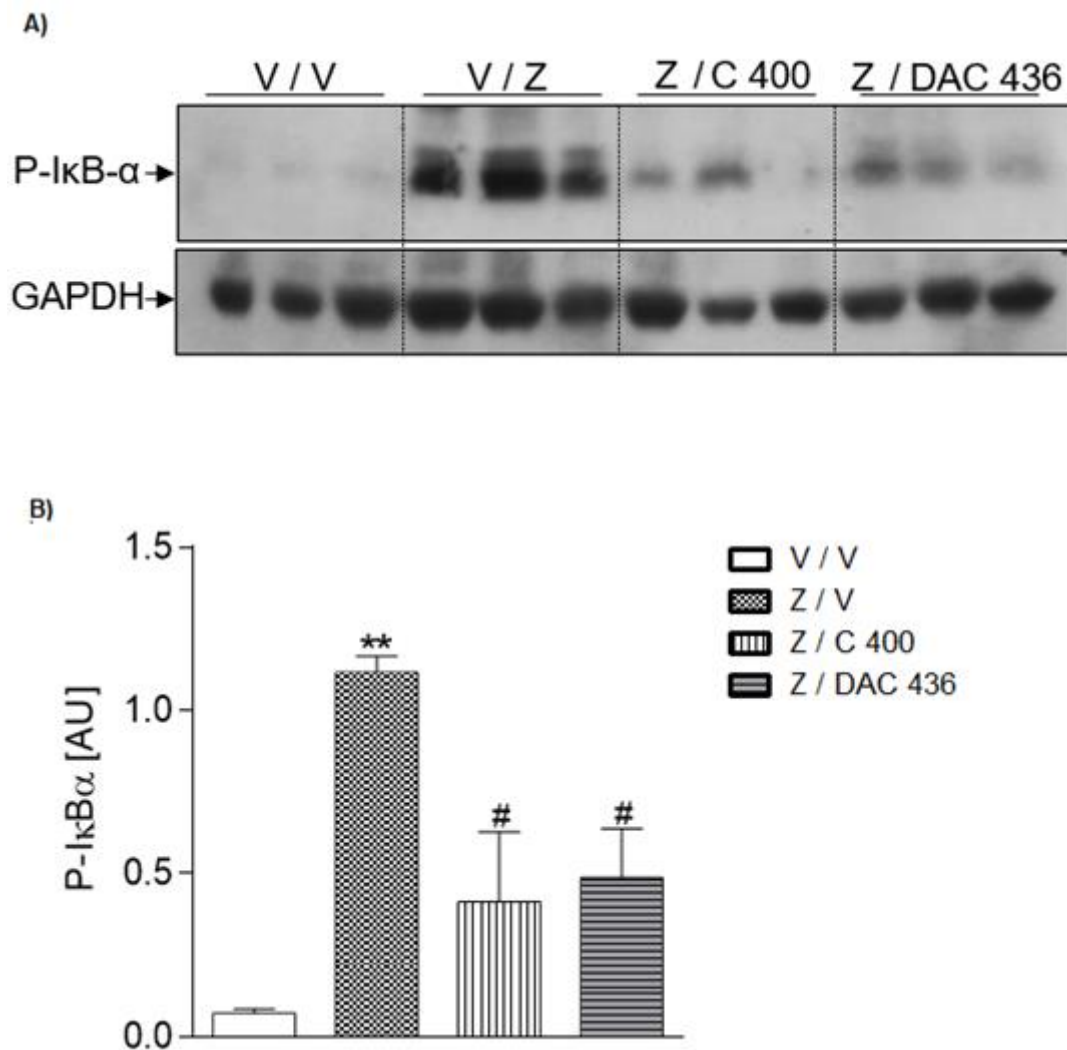
Observamos aumento da concentração de TNF- $\alpha$  5 h após a sensibilização das células RAW264.7 com zimosano (300  $\mu$ g/mL). O pré-tratamento com clindamicina (10  $\mu$ M) ou DAC (10  $\mu$ M) reduziu a produção de TNF- $\alpha$  pelas células RAW264.7 (Figura 18).



**Figura 18:** Efeitos induzidos pela clindamicina (C; 10  $\mu$ M., -1 h), derivado acetilado de clindamicina (DAC; 10  $\mu$ M., -1 h) ou solução salina (NaCl 0,9% p/v., -1 h) sobre a produção de TNF- $\alpha$  em cultura de células RAW264.7. As concentrações de citocinas na cultura de células RAW264.7 foram avaliadas 5 h após a administração de C, DAC ou solução salina. \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). ## indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Z/V ( $p < 0,01$ ).  $n = 6$ .

### 5. 10 Efeito induzido pela clindamicina ou DAC sobre a fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$ induzida por zimosano

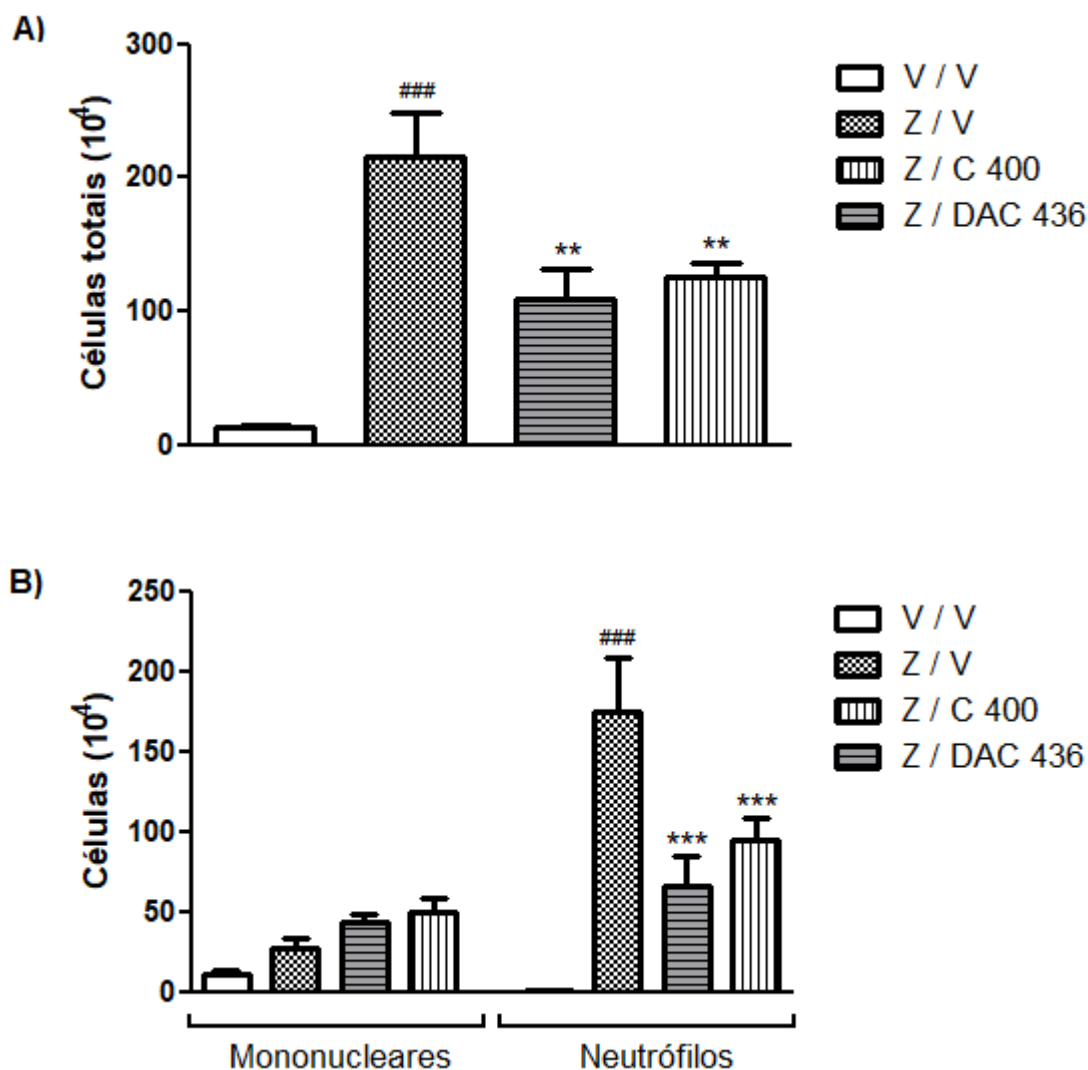
O aumento da fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$  foi observado no tecido periarticular 24 h após a injeção i.a. de zimosano (50  $\mu$ g). O pré-tratamento dos animais com clindamicina (400 mg/kg) ou DAC (436 mg/kg) diminuiu a fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$  induzida por zimosano (Figura 19).



**Figura 19:** Efeito da clindamicina (C; 400 mg/kg, ip, -1 h), derivado acetilado da clindamicina (DAC; 436 mg/kg, ip, -1 h) ou solução salina (4 mL/kg; ip, -1 h) sobre a fosforilação de IkB $\alpha$  induzida por zimosano (50  $\mu$ g). (A) Imunoblots para IkB $\alpha$  e GAPDH. (B) Análise densitométrica dos níveis de proteína vistos nos autorradiogramas. Os dados são expressos em unidades de matriz (AU). O tecido periarticular foi avaliado 24 h após a administração de C, DAC ou solução salina. \*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ). # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Z/V ( $p < 0,05$ ).  $n = 6$ .

### 5.11 Efeito induzido pela clindamicina ou DAC sobre a contagem total e diferencial de leucócitos no lavado articular

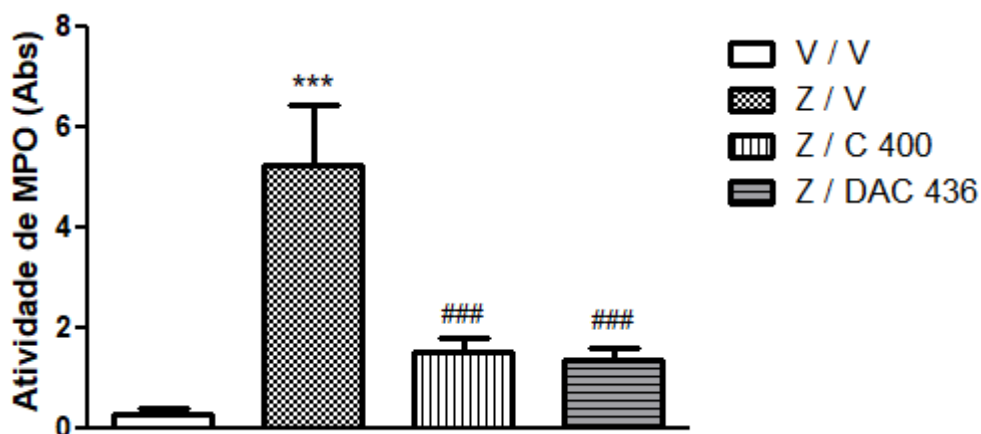
No modelo de inflamação articular induzida por zimosano, a administração prévia de clindamicina (400 mg/kg, i.p.) ou DAC (436 mg/kg, i.p.) reduziu o número total de células (Figura 20A) e de neutrófilos (Figura 20B) na cavidade articular.



**Figura 20:** Efeito induzido pela clindamicina (C; 400 mg/kg, i.p., -1 h) ou derivado acetilado da clindamicina (DAC; 436 mg/kg, i.p., -1 h) sobre o número total de células (A), neutrófilos e mononucleares (B) no lavado obtido da cavidade articular 24 h após a injeção i.a. de zimosano. \*\* e \*\*\* indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente). ### indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Z/V ( $p < 0,0001$ ). n=6.

### 5.12 Efeito induzido pela clindamicina ou DAC sobre a atividade da MPO

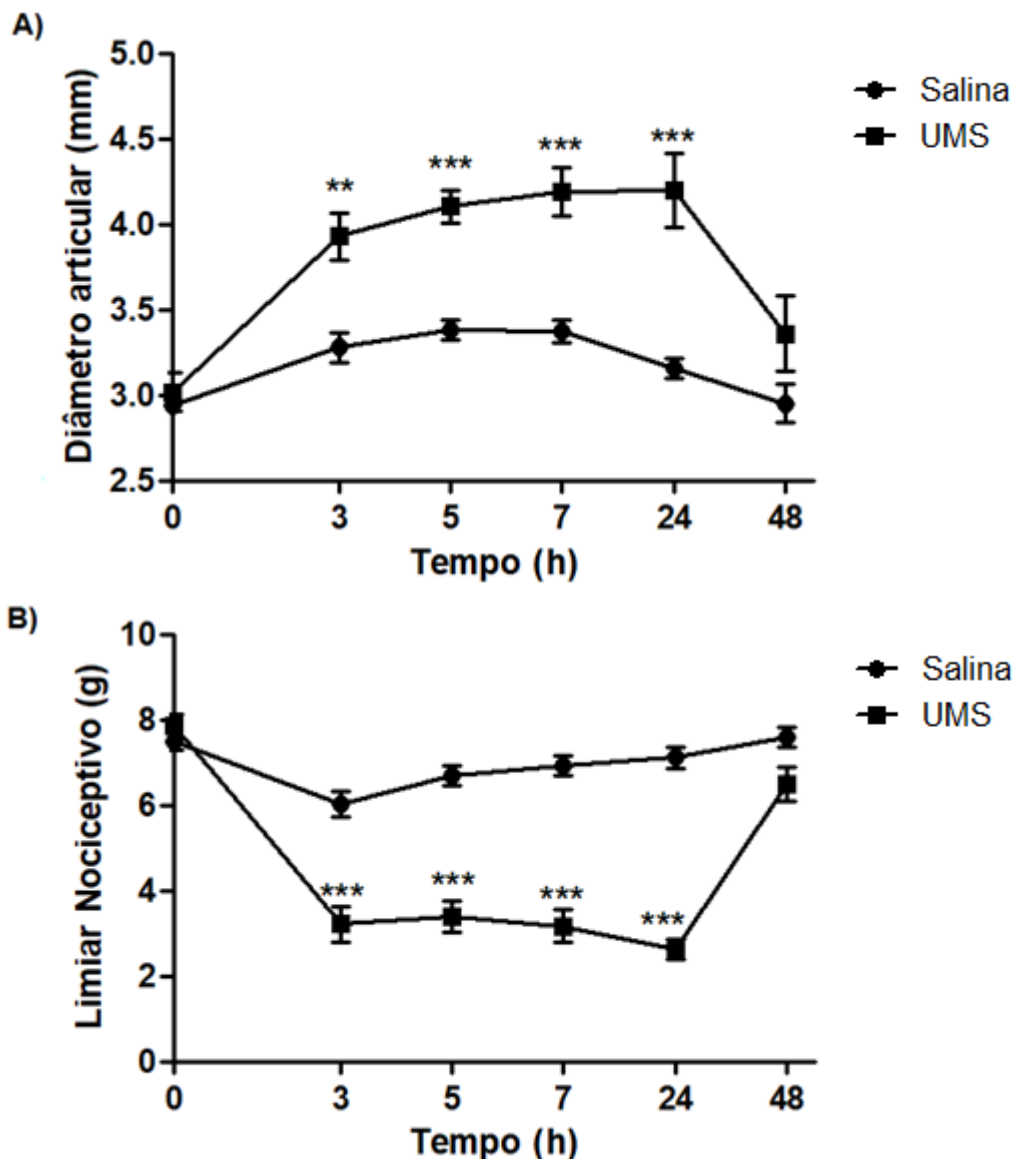
No modelo experimental de inflamação articular induzida pelo zimosano, a administração prévia de clindamicina (400 mg/kg, i.p.) ou DAC (436 mg/kg, i.p.) reduziu a atividade da MPO no tecido periarticular (Figura 21).



**Figura 21:** Efeito induzido por clindamicina (C; 400 mg/kg; i.p.; -1 h) ou derivado acetilado da clindamicina (DAC; 436 mg/kg, i.p.; -1 h) sobre a atividade de MPO no tecido periarticular, após 24 h da injeção i.a. de zimosano. \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). ### indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Z/V ( $p < 0,001$ ).  $n=6$ .

### 5.13 Padronização do modelo de inflamação articular induzida por UMS

A injeção i.a. de UMS induziu edema articular (Figura 22A) e alodínia mecânica (Figura 22B) por até 24 h. O grupo controle, que recebeu injeção i.a. de solução salina estéril, não apresentou alterações significativas do diâmetro articular e do limiar nociceptivo.



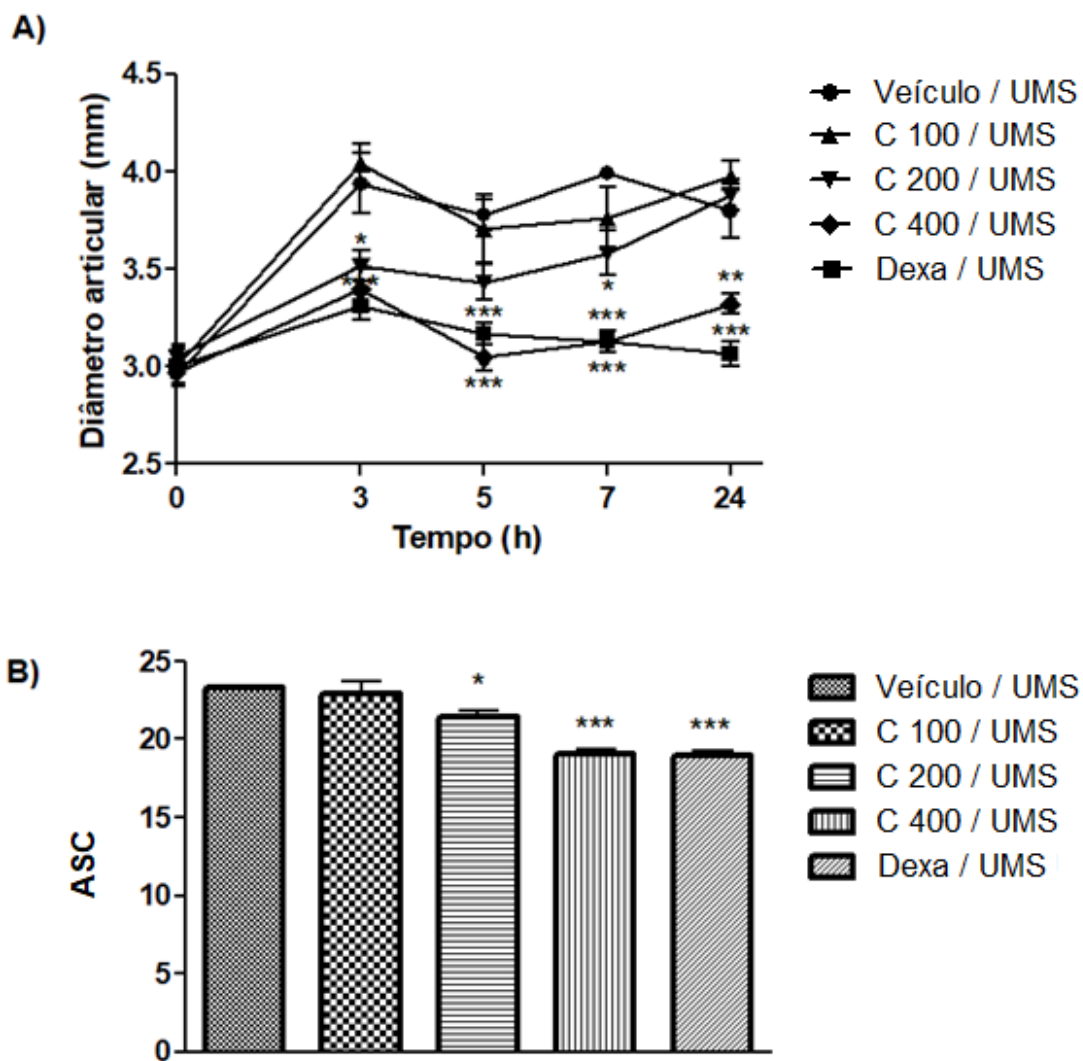
**Figura 22:** Efeitos induzidos pela administração i.a. de salina estéril (10  $\mu$ L) ou UMS (100  $\mu$ g/10  $\mu$ L) sobre o diâmetro articular (A) e limiar nociceptivo (B). \*\* e \*\*\* indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente). n=6.

#### 5.14 Efeito induzido pelo pré-tratamento com clindamicina sobre o diâmetro articular e limiar nociceptivo induzidos por UMS

A injeção i.a. de UMS induziu edema articular por até 24 h. A administração prévia (1h) de clindamicina (400 mg/kg; i.p.) reduziu o edema articular durante todo período. A dose intermediária de clindamicina (200 mg/kg;

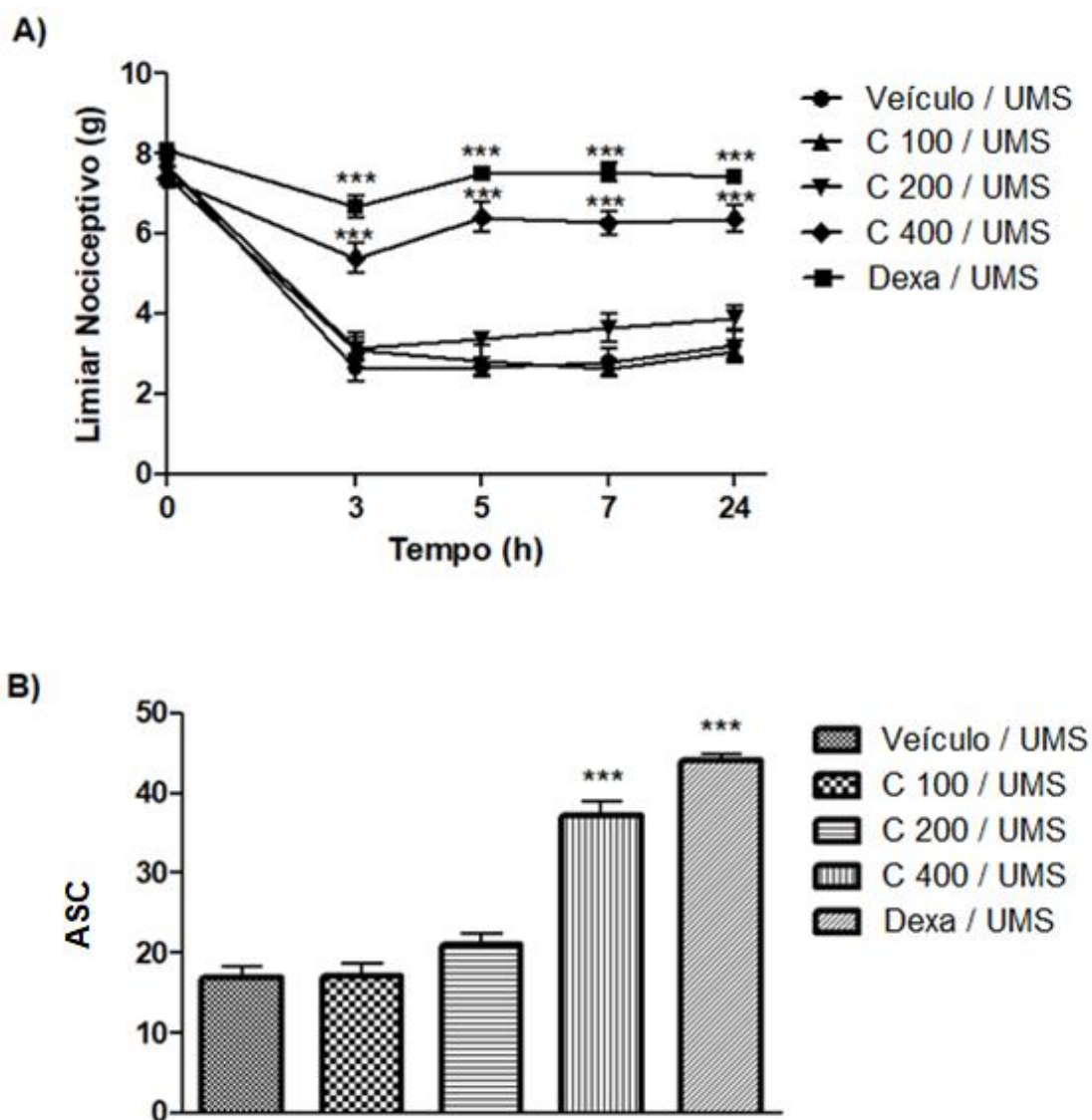
i.p.) reduziu o edema apenas na 3ª hora. Por outro lado, a menor dose de clindamicina (100 mg/kg) não alterou o edema articular induzido por UMS. A administração prévia de dexametasona (10 mg/kg) reduziu o edema articular induzido por UMS durante todo período (Figura 23).

A injeção i.a. de UMS induziu alodínia mecânica por até 24 h. A administração prévia (1h) de clindamicina na dose de 400 mg/kg, mas não nas doses de 100 ou 200 mg/kg, inibiu a alodínia mecânica. A administração prévia de dexametasona (10 mg/kg) inibiu a alodínia mecânica induzida por UMS durante todo período (Figura 24).



**Figura 23:** Efeito induzido pela clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., -1 h), dexametasona (Dexa; 10 mg/kg, i.p., -1 h) ou veículo (V) sobre o edema articular induzido por UMS. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \*, \*\* e \*\*\* indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n=6$ .





**Figura 24:** Efeito induzido pela clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., - 1 h), dexametasona (Dexa; 10 mg/kg, i.p., - 1 h) ou veículo (V) sobre a alodínia mecânica induzida por UMS. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).  $n = 6$ .

## 6.0 DISCUSSÃO

As inflamações articulares podem impactar negativamente o bem estar físico e emocional dos pacientes e, conseqüentemente, afetar a qualidade de vida. Pacientes com essas condições apresentam um quadro clínico de inflamação progressiva que pode levar a dor intensa e, de forma geral, deformações das articulações. A farmacoterapia, focada na redução da inflamação e da dor e prevenção do dano articular, não é totalmente eficaz (MORRIS et al., 2019; TALJANOVIC et al., 2015; LESKO et al., 2010). Assim, a busca por novas alternativas terapêuticas que promovam analgesia, previnam o dano articular e apresentem bom perfil de segurança é justificada.

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que a clindamicina, um antimicrobiano pertencente ao grupo das lincosamidas, induz vários efeitos como redução da produção de citocinas inflamatórias e da atividade de neutrófilos, bem como inibição da resposta nociceptiva em modelos agudos e crônicos (RODRIGUES et al., 2020; NGUYEN & EICHENFIELD, 2015). Embora a clindamicina apresente atividades imunomoduladoras (RODRIGUES et al. 2020), a proposta de seu reposicionamento no manejo de doenças não infecciosas certamente enfrentará preocupações quanto ao desenvolvimento de microorganismos resistentes ao antimicrobiano e um impacto negativo e duradouro na microbioma intestinal. Considerando esse contexto, no presente estudo comparamos os efeitos induzidos pela clindamicina e um derivado acetilado em modelos experimentais de dor e inflamação articular, bem como suas atividades antimicrobianas.

Inicialmente foi sintetizado e caracterizado um derivado da clindamicina, DAC, com acetilação das hidroxilas da porção carboidrato. A estrutura química básica das lincosamidas, que inclui a clindamicina, consiste em uma porção de açúcar ( $\alpha$ -metiltiolincosamina) e uma porção de aminoácido (ácido propil-hídrico). Foi demonstrado que o segmento  $\alpha$ -metiltiolincosamina é essencial para a interação da clindamicina com a grande subunidade ribossômica bacteriana 50S (MATZOV et al. 2017; KULCZYCKA et al., 2012). Estudos com análogos de antimicrobianos foram realizados recentemente. A minociclina é um antimicrobiano que apresenta atividades anti-inflamatória e antialodínica

(BASTOS et al., 2013; BASTOS et al., 2008). Um análogo da minociclina, 12S-hidroxi-1,12-pirazolinominciclina, apresentou atividades anti-inflamatória e antinociceptiva em diferentes modelos experimentais e foi desprovido de atividade antimicrobiana (BASTOS et al., 2013; BASTOS et al., 2008).

Quando a atividade antimicrobiana foi avaliada, a clindamicina, em uma concentração inferior a 9,0  $\mu\text{M}$ , inibiu o crescimento de três cepas de *Staphylococcus aureus*, como esperado (DHAWAN & THADEPALLI, 1982; PHILIPS et al. 1970), enquanto concentrações bem mais elevadas de DAC foram necessárias para induzir efeito semelhante (CIM>900  $\mu\text{M}$ ). Vale ressaltar que *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™) e *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213™) são sensíveis à meticilina e, de acordo com MacDougall e Chambers (2011), essas cepas geralmente são suscetíveis também à clindamicina. Diversos estudos foram realizados para avaliar a CIM e CBM de várias substâncias frente às mesmas cepas de *Staphylococcus aureus* usadas no presente estudo (DA SILVA et al., 2018; WALTRICH et al., 2015; SILVA et al., 2012).

Em relação à atividade contra *Salmonella typhimurium*, uma alta concentração de clindamicina (CIM=135  $\mu\text{M}$ ) e concentração ainda maior de DAC (MIC>900  $\mu\text{M}$ ) foram necessárias para inibir o crescimento bacteriano. Na realidade, é bem conhecido que a clindamicina é incapaz de inibir o crescimento de bacilos Gram-negativos aeróbios e facultativamente anaeróbios, como *Salmonella typhimurium* (KURIYAMA et al. 2014), o que explica os altos valores de CIM da clindamicina e DAC. Mais estudos são necessários para estabelecer se o DAC apresenta atividade reduzida contra outras cepas bacterianas. No entanto, esta observação reforça os resultados que indicam que os grupos hidroxila da fração de açúcar desempenham um papel essencial na ligação da clindamicina ao RNA ribossômico na cavidade da peptidil transferase (SCHLÜNZEN et al. 2001), um mecanismo que fundamenta sua atividade bacteriostática.

Posteriormente, investigamos a capacidade do zimosano de induzir alodínia mecânica e edema após a administração i.a. Esse modelo é amplamente usado em pesquisa de candidatos a fármacos e para obter melhor

compreensão da patogênese de inflamações articulares. A inflamação articular induzida pela injeção i.a. de zimosano foi descrita pela primeira vez por Keystone et al. (1977). O zimosano é uma substância derivada da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FITZPATRICK & DICARLOS, 1964). A injeção i.a. de zimosano induziu edema articular e alodínia mecânica por um longo período. Em outro estudo, Guerreiro et al. (2013) também demonstraram que a injeção i.a. de zimosano em camundongos induziu um processo inflamatório e nociceptivo de longa duração.

O zimosano ativa a ERK (ENDO et al. 2016) e o fator nuclear- $\kappa$ B em leucócitos, de modo a promover a transcrição de citocinas inflamatórias, como IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , levando ao edema articular e nocicepção (FAN et al., 2017; VOLMAN et al., 2005; TAKEUCHI & AKIRA, 2001). A hipernocicepção articular induzida por zimosano depende da ativação de receptor do tipo Toll-like receptor-2 (TLR-2), o qual ativa uma cascata de sinalizações intracelulares, resultando na produção de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CXCL1). Essas citocinas estimulam a produção de eicosanoides e aminas simpáticas que sensibilizam nociceptores (GUERREIRO et al., 2012). O edema articular é o resultado da vasodilatação e do aumento da permeabilidade vascular, com exsudação de proteínas plasmáticas e líquido, bem como, com da amplificação dos mecanismos inflamatórios na membrana sinovial (MORRIS et al., 2019; CUCCHIARINI et al., 2016; CIRINO, 1999).

Em seguida, avaliamos os efeitos induzidos pelo pré- ou pós-tratamento com três diferentes doses de clindamicina. O pré-tratamento dos animais com clindamicina, nas doses de 200 e 400 mg/kg, reduziu o edema articular e a alodínia mecânica induzidos por zimosano. O pós-tratamento dos animais com clindamicina, apenas na dose de 400 mg/kg, reduziu o edema articular e a alodínia mecânica. As atividades antinociceptiva e antiedematogênica da clindamicina, nessas mesmas doses e via de administração, já foram estudadas com diferentes estímulos. A administração i.p. de clindamicina (200 e 400 mg/kg) reduziu o edema de pata e a alodínia mecânica induzidos por carragenina. Em modelo experimental de inflamação crônica induzida por adjuvante completo de Freund (CFA), clindamicina, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, reduziu de

maneira dose-dependente a alodínia mecânica e o edema de pata (RODRIGUES et al., 2020). Em relação à atividade antialodínica da clindamicina, há resultados de outros estudos indicando que as lincosamidas podem interferir em mecanismos pré- e pós-sinápticos da neurotransmissão. Além disso, em altas concentrações, as lincosamidas podem exercer ações anestésicas locais (AL AHDAL & BEVAN, 1995; KONOPKA & PARSONS, 1988). Entretanto, a hipótese de que esse fármaco possa induzir incoordenação motora ou relaxamento muscular pode ser descartada, uma vez que a clindamicina (100, 200 e 400 mg/kg) não alterou o tempo de permanência dos animais na haste girante (RODRIGUES et al., 2020).

Na busca pela compreensão dos mecanismos envolvidos na atividade antialodínica da clindamicina, foi investigado o papel de receptores opioidérgicos, canabinoidérgicos e canais para potássio ATP-dependentes por meio da utilização de antagonistas desses receptores ou bloqueadores desses canais. A naltrexona é um antagonista não seletivo de receptores opioidérgicos que foi selecionado para investigar se a via opioidérgica poderia mediar a atividade antialodínica da clindamicina (BOSTICK et al., 2019; YADLAPALLI et al., 2016). A administração de naltrexona inibiu a atividade antialodínica da clindamicina, indicando que essa atividade parece depender da ativação de vias opioidérgicas. Entretanto, por se tratar de um antagonista não-seletivo de receptores opioides, não é possível inferir qual ou quais receptores ( $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ ) medeiam a atividade antialodínica da clindamicina. Em estudo anterior, também observamos que a administração prévia de naltrexona atenuou a atividade antinociceptiva da clindamicina em um modelo experimental de dor nociceptiva, indicando a possível participação da via opioidérgica (RODRIGUES et al., 2020).

AM251 e glibenclamida foram utilizados na investigação de uma possível participação nas vias canabinoidérgicas e de canais para potássio ATP-dependentes, respectivamente, na atividade antialodínica da clindamicina. AM251 e glibenclamida são muito usados na investigação do envolvimento das vias acima indicadas na atividade antinociceptiva de várias drogas ou fármacos (MORAIS et al., 2018; SCHREIBER et al., 2012; KHANNA et al., 2011). No presente estudo, a administração prévia do AM251 ou glibenclamida não

atenuou o efeito antialodínico da clindamicina, indicando que canais para potássio ATP-dependentes e receptores canabinoidérgicos do tipo CB1 parecem não ser revelantes para a expressão da atividade antialodínica da clindamicina. Em modelo experimental de dor nociceptiva, a administração de glibenclamida e AM251 também não atenuou a atividade antinociceptiva da clindamicina (RODRIGUES et al., 2020).

Investigamos o efeito induzido por doses equimolares de DAC na hipersensibilidade tátil e edema articular induzidos por zimosano. Apesar da tripla acetilação da molécula do açúcar, a maior dose de DAC também atenuou ambas as respostas. Em seguida, com o objetivo em avaliar quais mecanismos contribuem para as atividades da clindamicina ou DAC no modelo de inflamação articular induzida pelo zimosano, investigamos os efeitos induzidos por ambos sobre o recrutamento celular e a produção de citocinas. A injeção i.a. de zimosano induziu recrutamento celular marcante, avaliado de forma direta no lavado articular. O recrutamento celular foi majoritariamente de neutrófilos, assim como demonstrado em outro estudo (GUERRERO et al., 2006), embora também tenha ocorrido recrutamento de células mononucleares. A atividade da MPO no tecido periarticular também foi aumentada após a injeção i.a. de zimosano. O tratamento com clindamicina ou DAC reduziu de forma marcante o recrutamento celular no lavado articular, principalmente de neutrófilos. Observamos, também, que a atividade da MPO no tecido periarticular foi reduzida pelo tratamento com clindamicina ou DAC. Os resultados indicam que a clindamicina e o DAC induzem efeito marcante sobre o recrutamento celular para a articulação onde ocorre a inflamação, resultando em menor acúmulo de neutrófilos no líquido sinovial e tecido periarticular, o que pode representar um importante mecanismo que contribui para as atividades anti-inflamatória e antialodínica.

A injeção i.a. de zimosano induziu aumento marcante das concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e CXCL-1 no tecido periarticular. O tratamento com clindamicina ou DAC reduziu as concentrações das citocinas TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL-6 e da quimiocina CXCL-1 no tecido periarticular. O TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CXCL-1 têm importante papel nas inflamações induzida por zimosano (GUERRERO et al., 2012). Em conjunto, as citocinas inflamatórias aumentam a expressão de outros

mediadores inflamatórios, induzem hiperalgesia e alodínia e promovem migração celular, edema e destruição tecidual (SCANZELLO, 2017). Observamos, também, que a injeção i.a. de zimosano aumenta a fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$ , um marcador de ativação de NF- $\kappa$ B, um mecanismo molecular que contribui para o aumento da produção de citocinas (YOUNG et al., 2001). Nossos resultados demonstraram que a administração de clindamicina ou DAC reduziu a ativação do NF- $\kappa$ B, podendo esse ser um importante mecanismo molecular mediando esses efeitos da clindamicina e DAC. Desse modo, podemos observar em conjunto que o DAC reduziu o edema articular, hipernocicepção, produção de mediadores inflamatórios, fator de transcrição e o recrutamento celular induzidos por zimosano.

Como não foi determinado a concentração de clindamicina no sangue e tecido periarticular após a administração do DAC, pode-se argumentar que os efeitos induzidos pelo DAC podem ser decorrentes de sua desacetilação para gerar clindamicina *in vivo*. A desacetilação é a remoção de um grupo acetil mediada por enzimas amplamente distribuídas nos tecidos e coletivamente chamadas de desacetilases (BURGER e CHORY, 2018). Além de remover grupos acetil de proteínas e carboidratos, essas enzimas também podem remover grupos acetil de muitas moléculas pequenas, como cefalosporina-C (Sakai et al. 1998) e diacetilmorfina (Nakamura et al. 1975). No entanto, os efeitos semelhantes induzidos por clindamicina e DAC na produção de TNF- $\alpha$  induzida por zimosano em células RAW264.7, indicam que a desacetilação é uma etapa improvável.

O modelo experimental de artrite gotosa aguda em roedores é realizado pela injeção de cristais de UMS por via subcutânea, na superfície plantar, ou intra-articular no tornozelo ou joelho na região tíbio-femoral. Após algumas horas, o UMS induz edema local que geralmente é autolimitado e cessa dentro de 48-72 h após a indução (PUNZI et al., 2020; RAUCCI et al., 2019). Em nosso modelo experimental de artrite gotosa, a injeção i.a. de UMS induziu edema articular e alodínia mecânica por até 24 h. O pré-tratamento dos animais com clindamicina reduziu o edema articular e alodínia mecânica. Esses efeitos podem estar relacionados com a redução da síntese e/ou liberação de mediadores

inflamatórios e do infiltrado celular na membrana sinovial. Amaral et al. (2016), utilizando animais deficientes para o receptor TNF- $\alpha$ , demonstraram que houve diminuição significativa do infiltrado de neutrófilos, da produção de CXCL-1 e IL1- $\beta$  e da alodínia mecânica. Outros estudos avaliaram a redução do edema articular e alodínia mecânica em modelos de inflamação articular induzidos por UMS e atribuíram tais efeitos à redução de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, quimiocinas, redução da atividade de MPO e, conseqüentemente, infiltração de neutrófilos (GOO et al., 2021; HE et al., 2021).



## 7.0 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho indicam que a clindamicina e o derivado acetilado de clindamicina inibem o recrutamento celular para a articulação onde ocorre o processo inflamatório, o que reduz o acúmulo de neutrófilos no líquido sinovial, a produção de citocinas inflamatórias e a ativação do NF- $\kappa$ B, o que pode contribuir para as atividades anti-inflamatória e antialodínica de ambos. Deve ser destacado que esses achados são promissores, uma vez que, o derivado de clindamicina apresentou atividade antimicrobiana reduzida, mas manteve as atividades anti-inflamatória e antialodínica, o que sugere que as hidroxilas da porção carboidrato da molécula de clindamicina não parecem ser relevantes para essas duas últimas atividades. Esse derivado representa, assim, um candidato a ser investigado visando ao desenvolvimento de novas alternativas farmacoterapêuticas para o manejo de doenças inflamatórias articulares e outras condições inflamatórias.

## 8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, V.; CHAMPY, R.; MITROVIC, D.; COLLIN, P.; LOMRI, A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. **Joint Bone Spine**, v. 74, p. 324-329, 2007.

AL AHDAL, O.; BEVAN, D. R. Clindamycin-induced neuromuscular blockade. **Canadian Journal of Anesthesia**, v. 42, p. 614-617, 1995.

AMARAL, F. A.; BASTOS, L. F.; OLIVEIRA, T. H.; DIAS, A. C.; OLIVEIRA, V. L.; TAVARES, L. D.; COSTA, V. V.; GALVÃO, I.; SORIANI, F. M.; SZYMKOWSKI, D. E.; RYFFEL, B.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. Transmembrane TNF- $\alpha$  is sufficient for articular inflammation and hypernociception in a mouse model of gout. **European Journal of Immunology**, v. 46, p. 204-211, 2016.

AMIN, B.; HAJHASHEMI, V.; HOSSEINZADEH, H.; ABNOUS, K. H. Antinociceptive evaluation of ceftriaxone and minocycline alone and in combination in a neuropathic pain model in rat. **Neuroscience**, v. 08, p. 15-25, 2012.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5-16, 2001.

ARACHCHILLAGE, D. R.; MAKRIS, M. Choosing and using non-steroidal antiinflammatory drugs in haemophilia. **Haemophilia**, v. 22, p. 179-187, 2015.

BAI, Y., GONG, X., DOU, C., CAO, Z., DONG, S. Redox control of chondrocyte differentiation and chondrogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 132, p. 83-89, 2019.

BALASUBRAMANIAM, G.; PARKER, T.; TURNER, D.; PARKER, M.; SCALES, J.; HARNETT, P.; HARRISON, M.; AHMED, K.; BHAGAT, S.; MARIANAYAGAM, T.; PITZALIS, C.; MALLEEN, C.; RODDY, E.; ALMOND, M.; DASGUPTA, B. Feasibility randomised multicentre, double-blind, double-dummy controlled trial

of anakinra, an interleukin-1 receptor antagonist versus intramuscular methylprednisolone for acute gout attacks in patients with chronic kidney disease (ASGARD): protocol study. **BMJ Open**, v. 07, p. e017121, 2017.

BANNURU, R. R.; OSANI, M. C.; VAYSBROT, E. E.; ARDEN, N. K.; BENNELL, K.; BIERMA-ZEINSTRAS, S. M. A.; KRAUS, V. B.; LOHMANDER, L. S.; ABBOTT, J. H.; BHANDARI, M.; BLANCO, F. J.; ESPINOSA, R.; HAUGEN, I. K.; LIN, J.; MANDL, L. A.; MOILANEN, E.; NAKAMURA, N.; SNYDER-MACKLER, L.; TROJAN, T.; UNDERWOOD, M.; MCALINDON, T. E. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 27, p. 1578-1589, 2019.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, p. 267-284, 2009.

BASTOS, L. F. S.; ANGUSTI, A.; VILAÇA, M. C.; MERLO, L. A.; NASCIMENTO JR, E. B.; ROCHA, L. T. S.; GODIN, A. M.; SOLANO, A. G. R.; JARUSSOPHON, S.; NUNAN, E. A.; KONISHI, Y.; COELHO, M. M. A novel non-antibacterial, non-chelating hydroxypyrazoline derivative of minocycline inhibits nociception and oedema in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, p. 714-721, 2008.

BASTOS, L. F. S.; PRAZERES, J. D. M. ; GODIN, A. M. ; MENEZES, R. R. ; SOARES, D. G. ; FERREIRA, W. C. ; DUTRA, M. B. ; MACHADO, R. R. ; Coelho, M. M. . Sex-independent suppression of experimental inflammatory pain by minocycline in two mouse strains. **Neuroscience Letters**, v. 553, p. 110-114, 2013.

BASTOS, L. F. S.; COELHO, M. M. Drug repositioning: playing dirty to kill pain. **CNS Drugs**, v. 28, p. 45-61, 2014.

BERENBAUM, F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, p. 16-21, 2013.

BLANCO, F. J.; REGO, I.; RUIZ-ROMERO, C. The role of mitochondria in osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 07, p. 161-169, 2011.

BOOKSTAVER, P. B.; BLAND, C. M.; GRIFFIN, B.; STOVER, K. R.; EILAND, L. S.; MCLAUGHLIN, M. A review of antibiotic use in pregnancy. **Pharmacotherapy**, v. 35, p. 1052- 1162, 2015.

BORA JR., F. W., MILLER, G. Joint physiology, cartilage metabolism, and the etiology of osteoarthritis. **Hand Clinics**, v. 03, p. 325-336, 1987.

BOSTICK, K. M.; MCCARTER, A. G.; NYKAMP, D. The Use of Low-Dose Naltrexone for Chronic Pain. **Senior Care Pharmacy**, v. 34, p. 43-46, 2019.

BÖTTCHER, T.; REN, H.; GOINY, M.; GERBER, J.; LYKKESFELDT, J.; KUHN, U.; LOTZ, M.; BUNKOWSKI, S.; WERNER, C.; SCHAU, I.; SPREER, A.; CHRISTEN, S.; NAU, R. Clindamycin is neuroprotective in experimental Streptococcus pneumoniae meningitis compared with ceftriaxone. **Journal of Neurochemistry**, v. 91, p. 1450-1460, 2004.

CARRASCO-PORTUGAL, C. M.; LUJÁN, M.; FLORES-MURRIETA, F. J. Evaluation of gender in the oral pharmacokinetics of clindamycin in humans. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 29, p. 227-230, 2008.

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

CIRINO, G. Multiple controls in inflammation: extracellular and intracellular phospholipase A2 inducible and constitutive cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 105-111, 1999.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition. **CLSI document M07-A9**. Wayne, PA, 2012.

CUCCHIARINI, M.; DE GIROLAMO, L.; FILARDO, G.; OLIVEIRA, J. M.; ORTH, P.; PAPE, D.; PASCAL, R. Basic science of osteoarthritis. **Journal of Experimental Orthopaedics**, v. 03, p. 01-18, 2016.

DA SILVA, J. B.; DE BESSA, M. E.; SANTOS MAYORGA, O. A.; ANDRADE, V. T.; DA COSTA, Y. F. G.; DE FREITAS, M, R.; FERREIRA, P. A. L.; SCIO, E.; ALVES, M. S. A promising antibiotic, synergistic and antibiofilm effects of *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae) on *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, p. 385-392, 2018.

D'AGOSTINO, P. D.; FERLAZZO, V.; MILANO, S.; LA ROSA, M., DI BELLA, G.; CARUSO, R.; BARBERA, C.; GRIMAUDDO, S.; TOLOMEO, M.; FEO, S.; CILLARI, E. Anti-inflammatory effects of chemically modified tetracyclines by the inhibition of nitric oxide and interleukin-12 synthesis in J774 cell line. **International Immunopharmacology**, v. 01, p. 1765-1776, 2001.

DALBETH, N.; GOSLING, A. L.; GAFFO, A.; ABHISHEK, A. Gout. **Lancet**, v. 15, p. 1843-1855, 2021.

DHAWAN, V. K.; THADEPALLI, H. Clindamycin: a review of fifteen years of experience. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 04, p. 1133-1153, 1982.

ENDO, D.; SAITO, T.; UMEKI, Y.; SUZUKI, K.; ARATANI, Y. Myeloperoxidase negatively regulates the expression of proinflammatory cytokines and chemokines by zymosan-induced mouse neutrophils. **Inflammation Research**, v. 65, p. 151-159, 2016.

FAN, X.; ZHU, J. Y.; SUN, Y.; LUO, L.; YAN, J.; YANG, X.; YU, J.; TANG, W. Q.; MA, W.; LIANG, H. P. Evodiamine Inhibits Zymosan-Induced Inflammation In Vitro and In Vivo: Inactivation of NF- $\kappa$ B by Inhibiting I $\kappa$ B $\alpha$  Phosphorylation. **Inflammation**, v. 03, p. 1012-1027, 2017.

FARAHAT, M. N.; YANNI, G.; POSTON, R.; PANAYI, G. S. Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 52, p. 870-875, 1993.

FEDERICI, T. J. The non-antibiotic properties of tetracyclines: clinical potential in ophthalmic disease. **Pharmacological Research**, v. 64, p. 614-623, 2011.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M. I. Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca<sup>2+</sup> dependent process. **Prostaglandins**, v. 18, p. 179-910, 1979.

FISHER, C. J.; DHAINAUT, J. F.; OPAL, S. M.; PRIBBLE, J. P.; BALK, R. A.; SLOTMAN, G. J.; IBERTI, T. J.; RACKOW, E. C.; SHAPIRO, M. J.; GREENMAN, R. L. Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. **Journal of the American Medical Association**, v. 271, p. 1836-1843, 1994.

FITZPATRICK, F. W.; DICARLO, F. J. Zymosan. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 118, p. 235-261, 1964.

FRIEDMAN, N. D.; TEMKIN, E.; CARMELI, Y. The negative impact of antibiotic resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, p. 416-422, 2016.

GALOZZI, P.; BINDOLI, S.; DORIA, A.; OLIVEIRO, F.; SFRISO, P. Autoinflammatory Features in Gouty Arthritis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, p. 1880, 2021.

GOLDRING, M. B.; OTERO, M. Inflammation in osteoarthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 23, p. 471-478, 2011.

GOMPELS, L.L.; SMITH, A.; CHARLES, P. J.; ROGERS, W.; SOONSHIONG, J.; MITCHELL, A.; DORÉ, C.; TAYLOR, P. W.; MACKWORTHYOUNG, C. G. Single blind randomized trial of combination antibiotic therapy in rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 33, p. 224- 227, 2006.

GONZALEZ, D.; MELLONI, C.; YOGEV, R.; POINDEXTER, B. B.; MENDLEY, S. R.; DELMORE, P.; SULLIVAN, J. E.; AUTMIZGUINE, J.; LEWANDOWSKI, A.;

HARPER, B.; WATT, K. M.; LEWIS, K. C.; CAPPARELLI, E. V.; BENJAMIN JR., D. K.; COHEN-WOLKOWIEZ, M. Use of opportunistic clinical data and a population pharmacokinetic model to support dosing of clindamycin for premature infants to adolescents. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 94, p. 429-437, 2014.

GOO, B.; LEE, J.; PARK, C.; YUNE, T.; PARK, Y. Bee Venom Alleviated Edema and Pain in Monosodium Urate Crystals-Induced Gouty Arthritis in Rat by Inhibiting Inflammation. **Toxins (Basel)**, v. 13, p. 661, 2021.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology & Behavior**, v. 47, p. 963- 991, 1990.

GOULD, I. M. The epidemiology of antibiotic resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. S2-S9, 2008.

GUERNE, P. A.; CARSON, D. A.; LOTZ, M. IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. **Journal of Immunology**, v.144, p. 499-505, 1990.

GUERRERO, A. T.; CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; GAZZINELLI, R. T.; TEIXEIRA, M. M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Toll like receptor 2/MyD88 signaling mediates zymosaninduced joint hypernociception in mice: participation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CXCL1/KC. **European Journal of Pharmacology**, v. 674, p. 51-57, 2012.

GUERRERO, A. T.; VERRI, W. A. Jr.; CUNHA T. M.; SILVA T. A.; ROCHA, F. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA F. Q.; PARADA, C. A. Hypernociception elicited by t bio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**, v. 84, p. 244-251, 2006.

GUERREIRO, A. T.; ZAPERLON, A. C.; VIEIRA, S. M.; PINTO, L. G.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; VERRI, W. A.; CUNHA, T. M. The role of PAF/PAFR signaling in zymosan-induced articular inflammatory hyperalgesia. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 386, p. 51-59, 2013.

HAAS, T. L.; EMMERICH, C. H.; GERLACH, B.; SCHMUKLER, A. C.; CORDIER, S. M.; FELTHAM, R.; VINCE, J.; WARNKEN, U.; WENGER, T.; KOSCHNY, R.; KOMANDER, D.; SILKE, J.; WALCZAK, H. Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. **Molecular Cell**, v. 36, p. 831-844, 2009.

HE, M.; HU, C.; CHEN, M.; GAO, Q.; LI, L.; TIAN, W. Effects of Gentiopicroside on activation of NLRP3 inflammasome in acute gouty arthritis mice induced by MSU. **Journal of Natural Medicines**, doi: 10.1007/s11418-021-01571-5, 2021.

HIRATA, N.; HIRAMATSU, K.; KISHI, K.; YAMASAKI, T.; ICHIMIYA, T.; NASU, M. Pretreatment of mice with clindamycin improves survival of endotoxic shock by modulating the release of inflammatory cytokines. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2638–2642, 2001.

HU, Y.; LI, W.; LU, L.; CAI, J.; XIAN, X.; ZHANG, M.; LI, Q.; LI, L. An antinociceptive role for ceftriaxone in chronic neuropathic pain in rats. **Pain**, v. 148, p. 284-301, 2010.

HUNTER, D. J.; ZEINSTRA, S. B. Osteoarthritis. **Lancet**, v. 27, p. 1745-1759, 2019.

HUANG, L. W.; HUANG, T. C.; HU, Y. C.; HSIEH, B. S.; CHIU, P. R.; CHENG, H. L.; CHANG, K. L. Zinc protects chondrocytes from monosodium iodoacetate-induced damage by enhancing ATP and mitophagy.



**Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 521, 50-56, 2020

IMAMURA, M.; IMAMURA, S. T.; KAZIYAMA, H. H.; TARGINO, R. A.; HSING, W. T.; SOUZA, L. P. M.; CUTAIT, M. M.; FREGNI, F.; CAMANHO, G. L. Impact of nervous system hyperalgesia on pain, disability, and quality of life in patients with knee osteoarthritis: a controlled analysis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 59, p. 1424-1431, 2008.

JERNBERG, C.; LÖFMARK, S.; EDLUND, C.; JANSSON, J. K. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. **Microbiology**, v. 156, p. 3216-3223, 2010.

JOHNSON, K.; SVENSSON, C. I.; ETTEN, D. V.; GHOSH, S. S.; MURPHY, A. N.; POWELL, H. C.; TERKELTAUB, R. Mediation of spontaneous knee osteoarthritis by progressive chondrocyte ATP depletion in Hartley guinea pigs. **Arthritis Rheumatology** v. 50, p. 1216-1225, 2004.

KANAZAWA, T.; ENDO, T.; ARIMA, N.; IBARAKI, H.; TAKASHIMA, Y.; SETA, Y. Systemic delivery of small interfering RNA targeting nuclear factor κB in mice with collagen-induced arthritis using arginine-histidine-cysteine based oligopeptidemodified polymer nanomicelles. **The International Journal of Pharmaceutics**, v. 515, p. 315-323, 2016.

KAPOOR, M.; MARTEL-PELLETIER, J. LAJEUNESSE, D.; PELLETIER, J. P., FAHMI, H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 07, p. 33-42, 2011.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Seminars in Immunology**, v. 19, p. 24-32, 2007.

KELLER, A. F.; MANDELL, B. Management and Cure of Gouty Arthritis. **Medical Clinics of North America**, v. 105, p. 297-310, 2021.

KHANNA, N.; MALHOTRA, R. S.; MEHTRA, A. K.; GARG, G. R.; HALDER, S.; SHARMA K. K. Interaction of morphine and potassium channel openers on experimental models of pain in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, p. 479-484, 2011.

KLÜCK, V.; LIU, R.; JOOSTEN, L. A. B. The role of interleukin-1 family members in hyperuricemia and gout. **Joint Bone Spine**, v. 88, p. 105092, 2020.

KOLASINSKI, S. L. et al. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation guideline for the management of osteoarthritis of the hand, hip, and knee. **Arthritis Rheumatology**, v. 72, p. 220–233, 2020.

KONOPKA, L. M.; PARSONS, R. L. Clindamycin induced alteration of ganglionic function. I. Direct effects on ganglion cell properties. **Brain Research**, v. 458, p. 269-277, 1988.

KEYSTONE, E. C.; SCHORLEMMER, H.U.S.; POPE, C.; ALLISON, A. C. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis Rheumatology**, v. 20, p. 1396-1401, 1977.

KULCZYCKA, M. K.; TRYLSKA, J.; SADLE, J. Quantum mechanical studies of lincosamides. **Journal of Molecular Modeling**, v. 18, p. 2727-2740, 2012.

KURIYAMA, T.; KARASAWA, T.; WILLIAMS, D. W. Antimicrobial Chemotherapy: Significance to Healthcare. In: PERCIVAL, S. L.; WILLIAMS, D. W.; COOPER, T. (ed) **Biofilms in infection, prevention and control - A healthcare handbook**, 1<sup>st</sup> edn. Academic Press, Amsterdam, p. 224, 2014.

LABRO, M. T. Antibiotics as anti-inflammatory agents. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 03, p. 61-68, 2002.

LATOURTE, A.; KLOPPENBURG, M.; RICHETTE, P. Emerging pharmaceutical therapies for osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 16, p. 673-688, 2020.

LARSSON, S.; ENGLUND, M.; STRUGLICS, A.; LOHMANDER, L. S. Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in synovial fluid are associated with progression of radiographic knee osteoarthritis in subjects with previous meniscectomy. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 23, p. 1906- 1914, 2015.

LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p. 482-292, 2002.

LEOPOLDINO, A. O.; MACHADO, G. C.; FERREIRA, P. H.; PINHEIRO, M. B.; DAY, R.; MCLACHLAN, A. J.; HUNTER D. J.; FERREIRA, M. L. Paracetamol versus placebo for knee and hip osteoarthritis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 02, p. CD013273, 2019.

LESKO, M.; YOUNG, M.; HIGHAM, R. Managing inflammatory arthritides: Role of the nurse practitioner and physician assistant. **Journal of the American Association of Nurse Practitioners**, v. 07, p. 382-392, 2010.

LEWIS 2ND, J. S.; JORGENSEN, J. H. Inducible clindamycin resistance in Staphylococci: should clinicians and microbiologists be concerned? **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 280-285, 2005.

LIEBERTHAL, J.; SAMBAMURTHY, N.; SCANZELLO, C. R. Inflammation in Joint Injury and Post-Traumatic Osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 23, p. 1825-1834, 2015.

LIEW, J. W.; GARDNER, G. C. Use of anakinra in hospitalized patients with crystal-associated arthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 46, p. 1345-1349, 2019.

LÓPEZ-ARMADA, M. J.; CARAMÉS, B.; MARTÍN, M. A.; CILLERO-PASTOR, B.; LIRES-DEAN, M.; FLUENTES-BOQUETE, I.; ARENAS, J.; BLANCO, F. J. Mitochondrial activity is modulated by TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in normal human chondrocyte cells. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, p. 1011-1022, 2006.

LÓPEZ-UREÑA, D.; QUESADA-GÓMEZ, C.; MONTOYA-RAMÍREZ, M.; DEL MAR, G. C. M.; SOMOGYI, T.; RODRÍGUEZ, C.; RODRÍGUEZ-CAVALLINI, E. Predominance and high antibiotic resistance of the emerging *Clostridium difficile* genotypes NAPCR1 and NAP9 in a Costa Rican hospital over a 2-year period without outbreaks. **Emerging Microbes & Infections**, v. 11, p. 01-05, 2016.

MACDOUGALL, C.; CHAMBERS, H. F. Protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents - Chemotherapy of microbial diseases. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A. KNOLLMANN, B. C. (ed) **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 12th edn. McGrawHill, New York, p. 1534, 2011.

MARCU, K. B.; OTERO, M.; OLIVOTTO, E.; BORZI, R. M.; GOLDRING, M. B. NF- $\kappa$ B signaling: multiple angles to target OA. **Current Drug Targets**, v. 11, p. 599-613, 2010.

MATZOV, D.; EYAL, Z.; BENHAMOU, R. I.; SHALEV-BENAMI, M.; HALFON, Y.; KRUPKIN, M.; ZIMMERMAN, E.; ROZENBERG, H.; BASHAN, A.; FRIDMAN, M.; YONATH, A. Structural insights of lincosamides targeting the ribosome of *Staphylococcus aureus*. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. 10284-10292, 2017.

MELCHIORRI, C.; MELICONI, R.; FRIZZIERO, L.; SILVESTRI, T.; PULSATELLI, L.; MAZZETTI, I.; BORZÌ, R. M.; UGUCCIONI, M.; FACCHINI, A. Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory

cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 41, p. 2165-2174, 1998.

MOBASHERI, A.; MATTA, C.; ZAKANY, R.; MUSUMECI, G. Chondrosenescence: definition, hallmarks and potential role in the pathogenesis of osteoarthritis. **Maturitas**, v. 80, p. 237-244, 2015.

MOBASHERI, A., RAYMAN, M.P., GUALILLO, O., SELLAM, J., VAN DER KRAAN, P., FEARON, U. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, 302-311, 2017.

MORAIS, M. I.; RODRIGUES, F. F.; COSTA, S. O. A. M.; GOULART, F. A.; COSTA, F. C.; MELO, I. S. F.; AUGUSTO, P. S. A.; FATIMA, A.; COELHO, M. M.; MACHADO, R. R. Nicorandil inhibits mechanical allodynia induced by paclitaxel by activating opioidergic and serotonergic mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v. 824, p. 108-114, 2018.

MORRIS, J. L.; LETSON, H. L.; GILLMAN, R.; HAZRATWALA, K.; WILKINSON, M.; MCEWEN, P.; DOBSON, G. P. The CNS theory of osteoarthritis: Opportunities beyond the joint. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, S0049-0172, p. 30012-30015, 2019.

MUELLER, M. B.; TUAN, R. S. Anabolic/Catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets. **PM&R**, v. 03, p. S3-S11, 2011.

MURPHY, C. S.; MCKAY, G. Clindamycin. **Practical diabetes**, v. 32, p. 222-223, 2015.

NGUYEN, A.; EICHENFIELD, L. F. Profile of clindamycin phosphate 1.2%/benzoyl peroxide 3.75% aqueous gel for the treatment of acne vulgaris. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 08, p. 549-554, 2015.

NIKODEMOVA, M.; WATTERS, J. J.; JACKSON, S. J.; YANG, S. K.; DUNCAN, I. D. Minocycline down-regulates MHC II expression in microglia and

macrophages through inhibition of IRF-1 and protein kinase C (PKC) $\alpha$ / $\beta$ . **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 15208-15216, 2007.

NEES, T. A.; ROSSHIRT, N.; REINER, T.; SCHILTENWOLF, M.; MORADI, B. Inflammation and osteoarthritis-related pain. **Schmerz**, v. 01, p. 04-12, 2019.

O'NEILL, T. W.; FELSON, D. T. Mechanisms of Osteoarthritis (OA) Pain. **Current Osteoporosis Reports**, v. 16, p. 611-616, 2018.

ORAY, M.; ABU SAMRA, K.; EBRAHIMIADIB, N.; MEESE, H.; FOSTER, C. S. Long-term side effects of glucocorticoids. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 15, p. 457-465, 2016.

PATEL, R. N.; ATTUR, M. G.; DAVE, M. N.; PATEL, I. V.; STUCHIN, S. A.; ABRAMSON, S. B.; AMIN, A. R. A novel mechanism of action of chemically modified tetracyclines: inhibition of COX-2-mediated prostaglandin E<sub>2</sub> production. **Journal of Immunology**, v. 163, p. 3459-3467, 1999.

PEANSUKMANEE, S.; VAUGHAN-THOMAS, A.; CARTER, S. D.; CLEGG, P. D.; TAYLOR, S.; REDMOND, C.; MOBASHERI, A. Effects of hypoxia on glucose transport in primary equine chondrocytes *in vitro* and evidence of reduced GLUT1 gene expression in pathologic cartilage *in vivo*. **Journal of Orthopaedic Research** v. 27, p. 529-535, 2009.

PHILLIPS, L.; FERNANDES, R.; WARREN, C. *In-vitro* comparison of erythromycin, lincomycin, and clindamycin. **British Medical Journal**, v. 02, p. 89-90, 1970.

PICCIOLI, P.; RUBARTELLI, A. The secretion of IL-1 $\beta$  and options for release. **Seminars in Immunology**, v. 25, p. 425-429, 2013.

PINEDA, L. C.; WATT, K. M. New antibiotic dosing in infants. **Clinics Perinatology**, v. 42, p. 167- 176, 2015.

PIZZI, L. T.; TONER, R.; FOLEY, K.; THOMSON, E.; CHOW, W.; KIM, M.; COUTO, J.; ROYO, M.; VISCUSI, E. Relationship between potential opioid-related adverse effects and hospital length of stay in patients receiving opioids after orthopedic surgery. **Pharmacotherapy**, v. 32, p. 502-514, 2012.

PUNZI, L.; SCANU, A.; GALOZZI, P.; LUISETTO, R.; SPINELLA, P.; SCIRE, C. A.; OLIVEIRO, F. One year in review 2020: gout. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 38, p. 807-821, 2020.

RAMOS, K. M.; LEWIS, M. T.; MORGAN, K. N.; CRYSDALE, N. Y.; KROLL, J. L.; TAYLOR, F. R.; HARRISON, J. A.; SOLANE, E. M.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Spinal upregulation of glutamate transporter GLT-1 by ceftriaxone: therapeutic efficacy in a range of experimental nervous system disorders. **Neuroscience**, v. 169, p. 1888-1900, 2010.

RAUCCI, F.; IQBAL, A. J.; SAVIANO, A.; CASILLO, G. M.; RUSSO, M.; LEZAMA, D.; MASCOLO, N.; MAIONE, F. In-depth immunophenotyping data relating to IL-17Ab modulation of circulating Treg/ Th17 cells and of in situ infiltrated inflammatory monocytes in the onset of gouty inflammation. **Data in Brief**, v. 25, p. 104381, 2019.

RODRIGUES, F. F.; MORAIS, M. I.; MELO, I. S. F.; AUGUSTO, P. S. A.; DUTRA, M. B. G. B.; COSTA, S. O. A. M.; COSTA, F. C.; GOULART, F. A.; BRAGA, A. V.; COELHO, M. M.; MACHADO, R. R. Clindamycin inhibits nociceptive response by reducing tumor necrosis factor- $\alpha$  and CXCL-1 production and activating opioidergic mechanisms. **Inflammopharmacology**, v. 28, p. 551-561, 2020.

RODRÍGUEZ, M.; CABAL-HIERRO, L.; CARCEDO, M. T.; IGLESIAS, J. M.; ARTIME, N.; DARNAY, B. G.; LAZO, P. S. NF- $\kappa$ B signal triggering and

termination by tumor necrosis factor receptor 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 22814-22824, 2011.

ROMAN-BLAS, J. A.; JIMENEZ, S. A. NF- $\kappa$ B as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, p. 839-848, 2006.

RIEDER, B.; WEIHS, A. M.; WEIDINGER, A.; SZWARC, D.; NÜRNBERGER, S.; REDL, H.; RÜNZLER, D.; HUBER-GRIES, C.; TEUSCHL, A. H. Hydrostatic pressure-generated reactive oxygen species induce osteoarthritic conditions in cartilage pellet cultures. **Scientific Reports**, v. 08, p. 17010-17010, 2018.

SADOUK, M. B.; PELLETIER, J. P.; TARDIF, G.; KIANSA, K.; CLOUTIER, J. M.; MARTEL- PELLETIER, J. Human synovial fibroblasts coexpress IL-1 receptor type I and type II mRNA: the increased level of the IL-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor. **Laboratory Investigation**, v. 73, p. 347-355, 1995.

SALMINEN, A.; KAARNIRANTA, K.; KAUPPINEN, A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. **Aging (Albany NY)**, v. 04, p. 166-175, 2012.

SANDLER, C.; EKOKOSKI, E.; LINDSTEDT, K. A.; VAINIO, P. J.; FINEL, M.; SORSA, T.; KOVANEN, P. T.; GOLUB, L. M.; EKLUND, K. K. Chemically modified tetracycline (CMT-3) inhibits histamine release and cytokine production in mast cells: possible involvement of protein kinase C. **Inflammation Research**, v. 54, p. 304-312, 2005.

SCANZELLO, C. R. Role of low-grade inflammation in osteoarthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 29, p. 79-85, 2017.

SCHLÜNZEN, F.; ZARIVACH, R.; HARMS, J. BASHAN, A.; TOCILJ, A.; ALBRECHT, R.; YONATH, A. FRANCESCHI, F. Structural basis for the interaction



of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. **Nature**, v. 25, p. 814-821, 2001.

SCHREIBER A. K.; NEUFELD, M.; JESUS, C. H.; CUNHA, J. M. Peripheral antinociceptive effect of anandamide and drugs that affect the endocannabinoid system on the formalin test in normal and streptozotocin-diabetic rats. **Neuropharmacology**, v. 63, p. 1286-1297, 2012.

SILVA, N. C. C.; BARBOSA, L.; SEITO, L.N.; FERNANDES JUNIOR, A. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. **Natural Product Research**, v. 26, p. 1510-1514, 2012.

SJÖLUND, M.; WREIBER, K.; ANDERSSON, D. I.; BLASÉR, M. J.; ENGSTRAND, L. Long-term persistence of resistant *Enterococcus* species after antibiotics to eradicate *Helicobacter pylori*. **Annals of Internal Medicine**., v. 139, p. 483-487, 2003.

SLOBODNICK, A.; SHAH, B.; PILLINGER, M. H.; KRASNOKUTSKY, S. Colchicine: old and new. **American Journal of Medicine**, v. 128, p. 461-470, 2015.

SMITH, A.; DORÉ, C.; CHARLES, P.; VALLANCE, A.; POTIER, T.; MACKWORTHYOUNG, C. Randomised double-blind trial of combination antibiotic therapy in rheumatoid arthritis. **International Journal of Rheumatology**, v. 2011, p. 01-06, 2011.

SOUZA, C. G.; SOUZA, M. C. S.; SILVA, H. J.; ASSIS, S. J. C.; DANTAS, D. S. Social determinants and other aspects associated with rheumatic diseases in the Brazilian population: a cross-sectional study based on the National Health Survey (PNS2013). **Arch Public Health**, v. 16, p. 118, 2020.

SZEKANECZ, Z.; SZAMOSI, S.; KOVÁCS, G. E.; KOCSIS, E.; BENKO, S. The NLRP3 inflammasome-Interleukin 1 pathway as a therapeutic target in gout. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 670, p. 82-93, 2019.

TANNER, L. B.; GOGLIA, A. G.; WEI, M. H.; SEHGAL, T.; PARSONS, L. R.; PARK, J. O.; WHITE, E.; TOETTCHER, J. E.; RABINOWITZ, J. D. Four key steps control glycolytic flux in mammalian cells. **Cell Syst.**, v. 07, p. 49-62, 2018.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. **International Immunopharmacology**, v.01, p. 625-635, 2001.

TALJANOVIC, M. S.; MELVILLE, D. M.; GIMBER, L. H.; SCALCIONE, L. R.; MILLER, M. D.; KWOH, C. K.; KLAUSER, A. S. High-Resolution US of Rheumatologic Diseases. **Radiographics**, v. 35, p. 2026-2048, 2015.

THABIT, A. K.; FATANI, D. F.; BAMAKHRAMA, M. S.; BARNAWI, O. A.; BASUDAN, L. O.; ALHEJAILI, S. F. Antibiotic penetration into bone and joints: An updated review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 81, p. 128-136, 2019.

TORRES, R.; MACDONALD, L.; CROLL, S. D.; REINHARDT, J.'DORE, A.; STEVENS, S.; HYLTON, D. M.; RUDGE, J. S.; LIU-BRYAN, R.; TERKELTAUB, R. A.; YANCOPOULOS, G. D.; MURPHY, A. J. Hyperalgesia, synovitis and multiple biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1 inhibition in a novel animal model of gouty arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 68, p. 1602-1608, 2009.

VANGSNESS JR., C. T.; BURKE, W. S.; NARVY, S. J.; MACPHEE, R. D.; FEDENKO, A. N. Human knee synovial fluid cytokines correlated with grade of knee osteoarthritis a pilot study. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**, v. 69, p. 122-127, 2011.

VIEIRA, A. T.; MACIA, L.; GALVÃO, I.; MARTINS, F. S.; CANESSO, M. C.; AMARAL, F. A.; GARCIA, C. C.; MASLOWSKI, K. M.; DE ELON, E.; SHIM, D.; NICOLI, J. R.; HARPER, J. L.; TEIXEIRA, M. M.; MACKAY, C. R. A role for gout micorbiota and the metabolite-sensing receptor GPR43 in a murine model of gout. **Arthritis Rheumatology**, v. 67, p. 1646-1656, 2015.

VOLMAN, T.J.; HENDRIKS, T.; GORIS, R. J. Zymosan-induced generalized inflammation: experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome. **Shock**, v. 23, p. 291-297, 2005.

WALTERS, K. M.; WOESSNER, K. M. An overview of nonsteroidal antiinflammatory drug reactions. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 36, p. 625-641, 2016.

WALTRICH, K. K.; HOSCHEID, J.; PROCHNAU I. S. Antimicrobial activity of crude extracts and fractions of Vernonia polyanthes Less (assa-peixe) flowers. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 909-914, 2015.

WAN, W.; SHI, Y.; JI, L.; LI, X.; XU, X.; ZHAO, D. Interleukin-37 contributes to the pathogenesis of gout by affecting PDZ domain containing 1 protein through the nuclear factor-kappa B pathway. **Journal of International Medical Research**, v. 48, p. 300060520948717, 2020.

WANG, X.; GRACE, P. M.; PHAM, M. N.; CHENG, K.; STRAND, K. A.; SMITH, C.; LI, J.; WATKINS, L. R.; YIN, H. Rifampin inhibits Toll-like receptor 4 signaling by targeting myeloid differentiation protein 2 and attenuates neuropathic pain. **FASEB J**, v. 27, p. 2713-2722, 2013.

WESTACOTT, C. I.; BARAKAT, A. F.; WOOD, L., PERRY, M. J.; NEISON, P.; BISBINAS, I.; ARMSTRONG, L.; MILLAR, A. B.; ELSON, C. J. Tumor necrosis factor alpha can contribute to focal loss of cartilage in osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 08, p. 213-221, 2000.

WILSON, L.; SASEEN, J. J. Gouty Arthritis: A Review of Acute Management and Prevention. **Pharmacotherapy**, v. 36, p. 906-922, 2016.

WOJDASIEWICZ, P.; PONIATOWSKI, K. A.; SZUKIEWICZ, D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. **Mediators Inflammation**, v. 2014, p. 561459, 2014.

WYNALDA, M. A.; HUTZLER, J. M.; KOETS, M. D.; PODOLL, T.; WIENKERS, L. C. In vitro metabolism of clindamycin in human liver and intestinal microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, p. 878-887, 2003.

YADLAPALLI, J. S.; FORD, B. M.; KETKAR, A.; WAN, A.; PENTHALA, N. R.; EOFF, R. L.; PRATHER, P. L.; DOBRETSOV, M.; CROOKS, P. A. Antinociceptive effects of the 6-O-sulfate ester of morphine in normal and diabetic rats: Comparative role of mu- and delta-opioid receptors. **Pharmacological Research**, v. 113, p. 335-347, 2016.

YOUNG, S.H.; YE, J.; FRAZER, D. G.; SHI, X.; CASTRANOVA, V. Molecular mechanism of tumor necrosis factor- $\alpha$  production in 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -glucan (zymosan)-activated macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 20781-20787, 2001.

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

ZHENG, L.; ZHANG, Z.; SHENG, P.; MOBASHERI, A. The role of metabolism in chondrocyte dysfunction and the progression of osteoarthritis. **Ageing Research Reviews**, v. 66, p. 101249, 2021.

ZHOU, Z.; CONNELL, M. C.; MACEWAN, D. J. TNFR1-induced NF- $\kappa$ B, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. **Cellular Signalling**, v. 19, p. 1238-1248, 2007.