

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

MARCELA DE MOURA GARCIA BINI DUTRA

**ATIVIDADES DA NICOTINAMIDA, DO ÁCIDO NICOTÍNICO E DO NICORANDIL EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO ARTICULAR: UMA AVALIAÇÃO
VISANDO AO REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS**

Belo Horizonte - MG

2016

MARCELA DE MOURA GARCIA BINI DUTRA

**ATIVIDADES DA NICOTINAMIDA, DO ÁCIDO NICOTÍNICO E DO NICORANDIL EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO ARTICULAR: UMA AVALIAÇÃO
VISANDO AO REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS**

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.

Orientadores: Prof. Dr. Márcio M Coelho
Prof. Dr. Renes R Machado

Belo Horizonte – MG

2016

D978a Dutra, Marcela de Moura Garcia Bini.
Atividades da nicotinamida, do ácido nicotínico e do nicorandil em modelos experimentais de inflamação articular: uma avaliação visando ao reposicionamento de fármacos / Marcela de Moura Garcia Bini Dutra. – 2016.
128 f. il.

Orientadores: Márcio de Matos Coelho;
Renes de Resende Machado.

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

1. Artrite reumatoide – Teses. 2. Osteoartrite – Teses. 3. Artrite Gotosa – Teses. 4. Dor – Teses. 5. Ácido nicotínico – Teses. 6. Nicotinamida – Teses. 7. Nicorandil – Teses. I. Coelho, Márcio de Matos. II. Machado, Renes de Resende. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615



FOLHA DE APROVAÇÃO

“Atividades da nicotinamida, do ácido nicotínico e do nicorandil em modelos experimentais de inflamação articular: uma avaliação visando ao reposicionamento de fármacos”.

MARCELA DE MOURA GARCIA BINI DUTRA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 27 de julho de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Tony de Paiva Paulino
UFTM

Prof. Adriana Cristina Soares de Souza
UFSJ

Prof. Caryne Margotto Bertollo
UFMG

Prof. Igor Dimitri Gama Duarte
UFMG

Prof. Renes de Resende Machado - Coorientador
UFMG

Prof. Márcio de Matos Coelho - Orientador
UFMG

Belo Horizonte, 27 de julho de 2016.

Dedico o grau de doutor

Aos meus pais, Ivan e Jane Bini, por abrirem e me guiarem pelos caminhos da
educação.

Agradecimentos

Inicialmente, agradeço aos meus queridos orientadores, Professores Márcio Coelho e Renes Machado, pelos anos de boa convivência e troca de ideias e experiências. Fui muito inspirada pela capacidade incrível de raciocínio lógico e ético do Prof. Márcio, além do seu entusiasmo e comprometimento com o ensino, bem como pela dedicação extraordinária do Prof. Renes com todos os seus alunos e por todos os protocolos experimentais nos quais tive sua ajuda inestimável.

Agradeço também à Maria Adelaide Fernandes, pela amizade e pelo apoio dentro e fora do biotério.

Sou muito grata também aos grandes amigos do laboratório, em especial, Elias Nascimento Júnior, pela parceria, conselhos e congressos pelo mundo; Francielle Goulart, por ser uma aluna de iniciação científica tão dedicada e por todas as vezes que me auxiliou fora dos horários tradicionais e fins de semana; Felipe Fernandes, Ivo e minha xará, Marcela Ísis, pela ajuda inestimável na reta final do doutorado.

Ao Batista, por toda a colaboração ao longo desses anos;

Aos colaboradores, Prof. Ângelo de Fátima, por gentilmente fornecer o nicorandil, e ao Prof. Flávio Amaral e às suas alunas, Nathália e Viviane, por viabilizarem os ensaios de recrutamento celular e a quantificação de citocinas.

À CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG pelo suporte financeiro ao longo de toda a minha caminhada na pós-graduação.

Por fim, agradeço imensamente à minha família – meus pais, Ivan e Jane, e Dê, minha irmã de coração – pelo apoio incondicional, suporte e por permitir que os estudos sejam parte tão nobre da minha vida e carreira.

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

- Carl Sagan.

RESUMO

Doenças inflamatórias articulares, tais como a artrite reumatoide (AR), a osteoartrite (OA) e a artrite gotosa (AG) são condições crônicas dolorosas que limitam a qualidade de vida dos pacientes, cuja importância cresce com o fenômeno de envelhecimento populacional. O manejo clínico e terapêutico dessas doenças ainda apresenta limitações, sendo que a dor é sintoma frequentemente relatado como o mais importante pelos pacientes. Modelos experimentais de inflamação articular permitem investigar a patogênese das doenças, estabelecer alvos moleculares da ação de potenciais novas drogas que possam reduzir o desconforto e evitar a progressão da destruição tecidual que acompanha os processos inflamatórios e identificar novas abordagens farmacoterapêuticas. O ácido nicotínico e a nicotinamida, vitaminas do complexo B, bem como o nicorandil, uma molécula representada pelo acoplamento de um doador de óxido nítrico à nicotinamida, apresentam atividades em alguns modelos de dor e inflamação agudas. Na literatura científica, no entanto, não existem estudos que avaliem os efeitos induzidos pelo ácido nicotínico, pela nicotinamida e pelo nicorandil em modelos de inflamação articular. A nicotinamida (doses entre 75 - 1000 mg/Kg, p.o.) e, de maneira mais marcante, o nicorandil (doses entre 50-200 mg/Kg, p.o.), apresentaram atividade antialodínica nos modelos experimentais de inflamação articular induzida por CFA, zimozano e MSU. O nicorandil induziu o efeito antialodínico mais consistente em todos os modelos experimentais, caracterizado por efeito mesmo mais duradouro e mesmo após a sensibilização estabelecida. A investigação de possíveis mecanismos envolvidos nesta atividade demonstrou que a nicotinamida e o nicorandil reduzem o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular e para o tecido periarticular nos modelos de inflamação articular induzidas por zimozano e MSU. A nicotinamida e o nicorandil reduziram a produção de IL-1 β e CXCL-1 no modelo de inflamação articular induzida por MSU. Ainda, a atividade antinociceptiva do nicorandil foi revertida pela administração prévia de naltrexona (5 ou 10 mg/Kg, i.p.) no modelo de inflamação articular induzida por zimozano. Os resultados do presente estudo indicam que a nicotinamida e, principalmente, o nicorandil são fármacos que podem ser investigados visando ao alívio da dor em pacientes com doenças articulares como AR, OA e AG.

Palavras-chave: Artrite reumatoide. Osteoartrite. Artrite Gotosa. Dor. Ácido nicotínico. Nicotinamida. Nicorandil.

ABSTRACT

Inflammatory joint diseases such as rheumatoid arthritis (RA), osteoarthritis (OA) and gout are chronic painful conditions that limit the quality of life of patients, whose importance increases with the population ageing phenomenon. The clinical and therapeutic management of these diseases still have limitations, and pain is usually reported by the patients as the most important symptom. Experimental models of articular inflammation allow investigation of the pathogenesis of the diseases, establishment of potential molecular targets for new drugs that can reduce the discomfort and prevent the progression of tissue destruction which accompanies these inflammatory processes and also to identify new pharmacotherapeutic alternatives. Nicotinamide and nicotinic acid, vitamins of the B complex, and nicorandil, a nitrated nicotinamide derivative, have been shown to exhibit activities in some pain and inflammation models. In scientific literature, there are no studies evaluating the effects induced by nicotinic acid, nicotinamide or nicorandil in models of joint inflammation. Nicotinamide (doses between 75 and 1000 mg/Kg, p.o.) and nicorandil (doses between 50 and 200 mg/Kg, p.o.) exhibited antiallodynic activity in experimental models of joint inflammation induced by CFA, zymosan and MSU. Nicorandil exhibited the most marked effect in all experimental models, characterized by a long lasting effect and efficacy even when sensitization was established. The investigation of possible mechanisms involved in this activity has shown that nicotinamide and nicorandil reduce neutrophil recruitment into the articular cavity and periarticular tissues in models of joint inflammation induced by zymosan and MSU. Nicotinamide and nicorandil reduced IL-1 β and CXCL-1 production in the model of articular inflammation induced by MSU. Furthermore, the antinociceptive effect induced by nicorandil was reversed by the previous administration of naltrexone (5 or 10 mg/Kg, i.p.) in the experimental model of joint inflammation induced by zymosan. The results of this study indicate that nicotinamide and especially nicorandil are drugs that should be further investigated aiming their repositioning in the pain management of patients with RA, OA and gout.

Keywords: Rheumatoid arthritis. Osteoarthritis. Gout. Pain. Nicotinamide. Nicotinic acid. Nicorandil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação diagramática de articulação normal e articulação com AR.

Figura 2 – Representação diagramática da articulação do joelho normal e com AO.

Figura 3 – Fotografias representando graus leve, moderado e grave da AG.

Figura 4 – Fluxograma para o tratamento dos pacientes com AR

Figura 5 – Algoritmo de tratamento de pacientes com episódio agudo de AG segundo recomendações do ACR.

Figura 6 – Estruturas químicas dos compostos da vitamina B₃.

Figura 7 – Estruturas químicas do nicorandil e da nicotinamida.

Figura 8 – Analgesímetro digital utilizado para avaliação da alodínia mecânica; aparato e forma da avaliação da alodínia em ratos.

Figura 9 – Aparato utilizado para avaliar edema de pata em ratos.

Figura 10 – Paquímetro digital utilizado para medida do diâmetro articular.

Figura 11 – Indução de inflamação por meio de injeção de CFA (1 mg/mL) na pata e na base da cauda de ratos.

Figura 12 – Indução de inflamação articular por meio de injeção i.a. de zimosano, CFA ou MSU.

Figura 13 – Escala temporal da avaliação do edema de pata e da alodínia mecânica induzidos por CFA em ratos.

Figura 14 – Escala temporal da avaliação do edema de pata e da alodínia mecânica induzidos por zimosano, CFA ou MSU em camundongos.

Figura 15 – Limiar nociceptivo (a) e volume da pata (b) em ratos após administração intradérmica de salina ou CFA (100 µL por injeção; 1 mg/mL) na pata posterior direita e na base da cauda.

Figura 16 – Edema e eritema na pata posterior ipsilateral observados 21 dias após as injeções de CFA.

Figura 17 – Limiar nociceptivo (a) e volume de pata (b) de ratos tratados com ácido nicotínico (75, 125 ou 250 mg/kg, p.o., 2x/dia) ou veículo (CMC 1%) em modelo de artrite induzida por CFA (100 µL por injeção; 1 mg/mL).

Figura 18 – Limiar nociceptivo (a) e volume de pata (b) de ratos tratados com nicotinamida (75, 125 ou 250 mg/kg, p.o., 2x/dia) ou veículo (CMC 1%) em modelo de artrite induzida por CFA (100 µL por injeção; 1 mg/mL).

Figura 19 – Limiar nociceptivo (a) e volume de pata (b) de ratos tratados com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/kg, p.o., 2x/dia) ou veículo (CMC 0,5%) em modelo de artrite induzida por CFA (100 µL por injeção; 1 mg/mL).

Figura 20 – Limiar nociceptivo (a) e volume de pata (b) de ratos tratados com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/kg, p.o.) ou veículo (CMC 1%) no 12º dia após as injeções de CFA e avaliados 1, 3 e 5 h após o tratamento, em modelo de artrite induzida por CFA (100 µL por injeção; 1 mg/mL).

Figura 21 – Limiar nociceptivo de ratos tratados com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/kg, p.o., 2x/dia) ou veículo (CMC 1%) a partir 12º dia após as injeções de CFA (100 µL por injeção; 1 mg/mL), em modelo de artrite induzida por CFA.

Figura 22 – Limiar nociceptivo (a) e volume de pata (b) de ratos tratados com nicorandil (50, 100 ou 200 mg/kg, p.o.) ou veículo (CMC 1%) no 12º dia após as injeções de CFA (100 µL por injeção; 1 mg/mL) e avaliados 1, 3 e 5h após o tratamento, em modelo de artrite induzida por CFA.

Figura 23 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) em camundongos, após administração i.a. de salina ou zimozano (30 ou 50 µg em injeção de 10 µL).

Figura 24 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com ácido nicotínico (75, 125 ou 250 mg/kg, p.o., -1 h), após administração i.a. de zimozano (50 µg em injeção de 10 µL).

Figura 25 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com ácido nicotínico (75, 125 ou 250 mg/kg, p.o., -1h e +2 h), após administração i.a. de zimozano (50 µg em injeção de 10 µL).

Figura 26 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/kg, p.o., -1 h), após administração i.a. de zimozano (50 µg em injeção de 10 µL).

Figura 27 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com nicotinamida 250, 500 ou 1000 mg/kg, p.o., -1h e +2 h), após administração i.a. de zimozano (50 µg em injeção de 10 µL).

Figura 28 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com nicorandil (50, 100 ou 200 mg/kg, p.o., -1h), após administração i.a. de zimozano (50 µg em injeção de 10 µL).

Figura 29 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) em camundongos, após administração i.a. de salina ou CFA (100 µg em injeção de 10 µL).

Figura 30 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com ácido nicotínico (75, 125 ou 250 mg/kg, p.o., -1 h), após administração i.a. de CFA (100 µg em injeção de 10 µL).

Figura 31 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com ácido nicotínico (75, 125 ou 250 mg/kg, p.o., -1 h e +2h), após administração i.a. de CFA (100 µg em injeção de 10 µL).

Figura 32 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/kg, p.o., -1 h), após administração i.a. de CFA (100 µg em injeção de 10 µL).

Figura 33 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com nicorandil (50, 100 ou 200 mg/kg, p.o., -1h), após administração i.a. de CFA (100 µg em injeção de 10 µL).

Figura 34 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos, após administração i.a. de salina ou MSU (100 µg em injeção de 10 µL).

Figura 35 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com ácido nicotínico (75, 125 ou 250 mg/Kg, p.o., -1 h e +2 h), após administração i.a. MSU.

Figura 36 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/Kg, p.o., -1 h e +2 h), após administração i.a. MSU (100 µg em injeção de 10 µL).

Figura 37 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com nicorandil (50, 100 ou mg/Kg, p.o., -1 h), após administração i.a. MSU (100 µg em injeção de 10 µL).

Figura 38 – Concentrações de TNF-α no tecido da pata (a) e no plasma (b) 7, 14 e 21 dias após a administração de salina ou CFA (100 µL por injeção; 1 mg/mL) na pata posterior direita e na base da cauda.

Figura 39 – Concentrações de IL-6 no tecido da pata 7, 14 e 21 dias após a administração de salina ou CFA (100 µL por injeção; 1 mg/mL) na pata posterior direita e base da cauda.

Figura 40 – Concentrações de TNF-α no tecido da pata no 14º dia após a administração de CFA (100 µL por injeção; 1 mg/mL) na pata posterior direita e base da cauda.

Figura 41 – Efeitos induzidos pela nicotinamida (1000 mg/Kg, p.o., -1 h e 2 h) ou pelo nicorandil (200 mg/Kg, p.o., -1 h) sobre o número total de células (a), neutrófilos (b) e mononucleares (c) no lavado obtido da cavidade articular após 6 h da injeção i.a. de zimozano.

Figura 42 – Efeitos induzidos pela nicotinamida (1000 mg/Kg, p.o., -1 h e 2 h) ou pelo nicorandil (200 mg/Kg, p.o., -1 h) sobre a atividade de MPO no tecido periarticular. após 6 h da injeção i.a. de zimozano.

Figura 43 – Efeitos induzidos pela nicotinamida (1000 mg/Kg, p.o., -1 h e 2h) ou pelo nicorandil (200 mg/Kg, p.o., -1 h) sobre o número total de células (a), neutrófilos (b) e mononucleares (c) no lavado obtido da cavidade articular após 6 h da injeção i.a. de CFA.

Figura 44 – Efeitos induzidos pela nicotinamida (1000 mg/Kg, p.o., -1 h e 2h) ou pelo nicorandil (200 mg/Kg, p.o., -1 h) sobre sobre o número total de células (a), neutrófilos (b) e mononucleares (c) no lavado obtido da cavidade articular após 6 h da injeção i.a. de MSU.

Figura 45 – Efeitos induzidos pela nicotinamida (1000 mg/Kg, p.o., -1 h e 2 h) ou pelo nicorandil (200 mg/Kg, p.o., -1 h) sobre a atividade de MPO no tecido periarticular após 6 h da injeção i.a. de MSU.

Figura 46 – Efeito induzido pela nicotinamida (1000 mg/Kg, p.o., -1 h e +2 h) ou nicorandil (200 mg/kg, p.o., -1 h) sobre as concentrações de TNF- α (a) ou CXCL1 (b) no tecido periarticular coletado 6 h após a injeção i.a. de zimosano.

Figura 47 – Efeito induzido pela nicotinamida (1000 mg/Kg, p.o., -1 h e +2 h) ou nicorandil (200 mg/kg, p.o., -1 h) sobre as concentrações de IL-1 β (a) ou CXCL1 (b) no tecido periarticular coletado 6 h após a injeção i.a. de MSU.

Figura 48 – Limiar nociceptivo de camundongos pré-tratados com naltrexona (5 ou 10 mg/Kg, i.p., -1,5 h) ou salina, seguido do tratamento com nicorandil (200 mg/kg, p.o., -1 h), em modelo de inflamação articular induzida por zimosano i.a. (50 μ g em injeção de 10 μ L).

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACR – *American College of Rheumatology*
AN – Ácido nicotínico
AIA – Artrite induzida por adjuvante
AIE – Anti-inflamatório esteroide
AINE – Anti-inflamatório não-esteroide
AR – Artrite reumatoide
AG – Artrite gotosa
BSA – Albumina bovina sérica
CFA – Adjuvante completo de Freund
COX - Ciclooxigenase
DMCD – Fármacos antirreumáticos modificadores do curso da doença
EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético
ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
EULAR – *European League Against Rheumatism*
FDA – *Food and Drug Administration*
GMP_C – Monofosfato cíclico de guanosina
i.a. – Intra-articular
IASP – Associação Internacional para Estudos da Dor
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
i.d. – Intra-dérmica
IL – Interleucina
i. p. – intraperitoneal
MSU – Cristais de urato
NAD⁺ – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP⁺ – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-κB – Fator nuclear *kappa B*
OA – Osteoartrite
OMS – Organização Mundial de Saúde
OPD – Ortofenilenodiamina

PBS – Solução tampão fosfato

PG – Prostaglandina

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonila

p.o. – *per os*

RENAME – Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

ROS – Radicais reativos de oxigênio

SBR - Sociedade Brasileira de Reumatologia

s. c. – Subcutâneo

TNF – Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Envelhecimento populacional e doenças reumáticas crônicas	18
1.2 Artrite reumatoide (AR).....	19
1.3 Osteoartrite (OA)	22
1.4 Artrite gotosa (AG).....	24
1.5 A dor e o edema em processos inflamatórios articulares.....	26
1.6 Farmacoterapia.....	27
1.7 Modelos experimentais de inflamação articular	36
1.8 Novas funções para fármacos em uso.....	38
2 JUSTIFICATIVA	45
3 OBJETIVOS	46
3.1 Objetivo geral.....	46
3.2 Objetivos específicos	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 Animais.....	47
4.2 Drogas e reagentes	47
4.3 Preparo das soluções e suspensões	49
4.4 Avaliação da alodínia mecânica.....	50
4.5 Avaliação do edema de pata	51
4.6 Avaliação do diâmetro articular	52
4.7 Modelos experimentais.....	53
4.8 Protocolos experimentais.....	56
4.8.2 Padronização do modelo de inflamação articular em camundongos	57
4.9 Quantificação de citocinas	61
4.10 Contagem total e diferencial dos leucócitos no lavado articular.....	63
4.10 Análise estatística	64
5 RESULTADOS	65
5.1 Caracterização das atividades do ácido nicotínico, da nicotinamida e do nicorandil em modelos de inflamação articular	65

5.2 Mecanismos envolvidos nas atividades antialodínicas e/ou antiedematogênica da nicotinamida ou do nicorandil em modelos experimentais de inflamação articular 92

6 DISCUSSÃO 105

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 117

1 INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento populacional e doenças reumáticas crônicas

O aumento da expectativa de vida e o envelhecimento populacional são fenômenos sócio-demográficos observados em quase todas os países. Entre os fatores associados a esses fenômenos estão a redução da taxa de mortalidade infantil e o acentuado declínio da taxa de fecundidade, os quais contribuem para o aumento do número relativo de idosos na população (GOLDENBERG, 2008). De acordo com o último censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2010, o número de habitantes com idades acima de 60 anos ultrapassou a marca de 20 milhões, o que representava cerca de 12% da população brasileira. A estimativa é que, ao final de 2030, a população idosa brasileira exceda 30 milhões, chegando a representar quase 15% da população total.

Com o envelhecimento, os indivíduos ficam mais susceptíveis a desenvolver doenças predispostas em seu perfil genético e associadas ao estilo de vida. Vários estudos demonstraram que mais de 45% da população em geral e 88% da população com idade acima de 65 anos têm uma ou mais doenças crônicas, sendo que mais de 75% de todos os gastos com os cuidados com saúde nos Estados Unidos estão relacionados com tratamentos dessas doenças (FURNERI et al., 2012; GOLDENBERG, 2008). Devido a análises prospectivas populacionais, as doenças reumáticas têm sido alvo de maior interesse e preocupação por parte da sociedade, principalmente entre a população mais idosa, uma vez que representam a principal causa de incapacidade. Nos idosos, uma série de doenças reumáticas típicas tem maior incidência, como a osteoartrite (OA), a osteoporose e a polimialgia reumática, entre outras. Outras doenças reumáticas crônicas ainda sem cura, como, por exemplo, a artrite reumatoide (AR), a gota ou artrite gotosa (AG), a espondilite anquilosante, quando diagnosticadas em faixas etárias inferiores, evoluem com o passar dos anos e representam um comprometimento da qualidade de vida para grande parte dos pacientes, principalmente quando atingem idades mais avançadas (GOLDENBERG,

2008). Embora as doenças reumáticas crônicas possam acometer muitos órgãos e tecidos, as doenças reumáticas mais prevalentes como AR, OA e AG afetam principalmente cartilagens e articulações, provocando dor, edema, deformação, limitação de movimentos e, conseqüentemente, redução da qualidade de vida. No Brasil, 29,9% da população brasileira total e 75,5% da população idosa se declararam portadoras de alguma doença crônica não-transmissível como diabetes, problemas cardiovasculares e câncer. A hipertensão é a doença que mais afeta os idosos brasileiros (50%), seguida por dores na coluna (35,1%) e doenças reumáticas (24,2%) (IBGE, 2009).

1.2 Artrite reumatoide (AR)

A AR é uma doença inflamatória crônica comum, de origem autoimune, cuja ocorrência abrange todas as partes do mundo e todas as etnias (BRANDÃO et al., 1997; SINGH et al., 2016; TORIGOE & LAURINDO, 2006). A doença caracteriza-se por apresentar perfil inflamatório sistêmico que acomete preferencialmente as articulações periféricas, cujos sinais são a sinovite crônica simétrica e erosiva (CARVALHO et al., 2000). A AR pode levar a um comprometimento poliarticular, bem como sinais e sintomas extra-articulares, como fadiga e vasculite, e aumento da taxa de mortalidade (McINNIS & SCHETT, 2011; BAGATINI et al., 2011; COSTELLO & HALVERSON, 2003).

A prevalência da AR na população adulta é estimada em torno de 0,5 a 1,0%, sendo as mulheres duas a três vezes mais acometidas que os homens (BERTOLO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2005). A AR é o tipo de artrite autoimune mais comum em adultos (SINGH et al., 2016). Geralmente, a AR inicia-se entre os 30 e 50 anos e entre 20% a 30% dos pacientes não tratados tornam-se incapacitados para o trabalho após dois a três anos do diagnóstico. A prevalência aumenta com a idade em ambos os gêneros, acompanhando o envelhecimento da população, situação observada nos países desenvolvidos. No Brasil, a prevalência é similar à da população mundial, predominando na população do gênero feminino, com início após os quarenta anos de

vida, sendo a maior incidência na faixa dos cinquenta anos (BRENOL et al., 2007; GOLDENBERG, 2008).

A sobrevivência dos pacientes com AR é menor que a da população em geral e a expectativa de vida pode decrescer de três a dez anos, dependendo da gravidade e da idade do paciente no início da doença. Pacientes com AR apresentam maior número de dias com o comprometimento da saúde física e mental comparados com indivíduos sem a doença (ABELL et al., 2005). Devido ao caráter progressivo, ao desenvolvimento das deformidades, à dor crônica e ao comprometimento da capacidade funcional, a AR representa, além dos prejuízos à saúde individual, impacto econômico e social (LAURINDO et al., 2002).

A patogênese da AR ainda não é bem compreendida. As causas mais prováveis incluem fatores ambientais e genéticos. Entre os fatores ambientais, podem ser mencionados tabagismo e agentes infecciosos (vírus, bactérias ou micoplasmas). Quanto aos fatores genéticos, há concordância em torno de 30% do desenvolvimento da AR em gêmeos monozigóticos e a incidência dos alelos HLA-DR1 ou DR4 na população caucasiana, presentes em 80% dos pacientes com AR, embora a sua contribuição para a hereditariedade da doença (estimada em cerca de 60%) ainda seja alvo de investigações (FOX, 2001; KURKÓ et al., 2013).

O curso da doença não apresenta um padrão homogêneo, principalmente quando se observa o ritmo da evolução da infiltração articular e das manifestações extra-articulares. A doença se inicia com um infiltrado de linfócitos e macrófagos na membrana sinovial. As células sinoviais hiperplasiadas, o infiltrado de linfócitos e macrófagos, juntamente com a neoangiogênese, formam um tecido sinovial proliferativo, chamado de “pannus” (Figura 1), que atinge o osso subcondral e a cartilagem articular, com progressiva destruição desses tecidos (BRENOL et al., 2007).

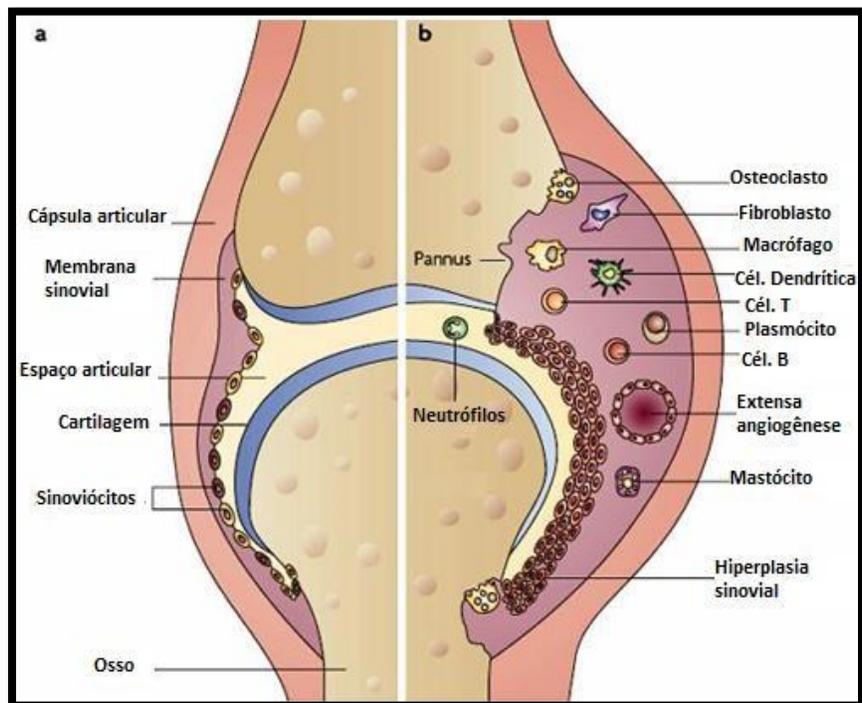


Figura 1- Representação diagramática de articulação normal (a) e com AR (b).

(Fonte: adaptado de reumart.com.br).

A produção de citocinas, em especial as inflamatórias, tem papel bem estabelecido na iniciação e manutenção da inflamação crônica na membrana sinovial (KASAMA et al., 2016). Entre os eventos celulares desencadeados, estão a produção de interferon- γ (IFN- γ) por linfócitos T auxiliares do tipo 1, que estimula a liberação de fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e metaloproteinases pelos macrófagos e fibroblastos sinoviais.

O TNF- α ocupa posição relevante entre as mais de 100 citocinas e quimiocinas diferentes relacionadas à AR pois participa da ativação dos osteoclastos, evento que contribui para erosão articular (McINNES et al., 2016). Resultados de estudos em modelos experimentais indicam os osteoclastos como as principais células envolvidas na patogênese da AR (BRENOL et al., 2007; WILLIAMS et al., 1992).

1.3 Osteoartrite (OA)

A OA, doença articular degenerativa, crônica, multifatorial, também conhecida como artrose ou osteoartrose, é a doença reumática mais prevalente entre indivíduos com mais de 65 anos de idade. A OA leva à incapacidade funcional progressiva e está entre as três maiores causas de busca por atendimento médico, juntamente com dores nas costas (LOVELESS et al., 2016). No passado, a OA foi considerada um processo normal do envelhecimento. Entretanto, atualmente, é bem estabelecido que a OA resulta da interação complexa de múltiplos fatores, incluindo o comprometimento da integridade articular, pré-disposição genética, presença de processo inflamatório local, forças biomecânicas e outros processos celulares e bioquímicos (KALUNIAN, 2013; LOESER et al, 2012). Em adultos normais, os condrócitos são células quiescentes. Na OA, no entanto, os condrócitos encontram-se ativados, acarretando proliferação celular, formação de agregados e aumento da produção de proteínas de matriz e enzimas proteolíticas, principalmente metaloproteinases como colagenases e agreganases. A ruptura do estado de repouso normal dos condrócitos pode ser visto como uma resposta à lesão inicial que ativa o remodelamento da matriz, maturação hipertrófica inapropriada e calcificação da cartilagem (LOESER et al., 2012; Figura 2), limitando a amplitude do movimento articular e causando desconforto ao paciente. A OA é, usualmente, uma doença progressiva, que representa um reparo inadequado frente a um agente estressante, iniciado em quaisquer dos tecidos sinoviais, incluindo a cartilagem articular, o osso subcondral, ligamentos, menisco (quando presente), músculos periarticulares e nervos periféricos. Esse reparo inadequado resulta em danos à cartilagem e ao tecido ósseo, levando aos sintomas de dor, rigidez e redução da mobilidade articular (LANE et al., 2011).

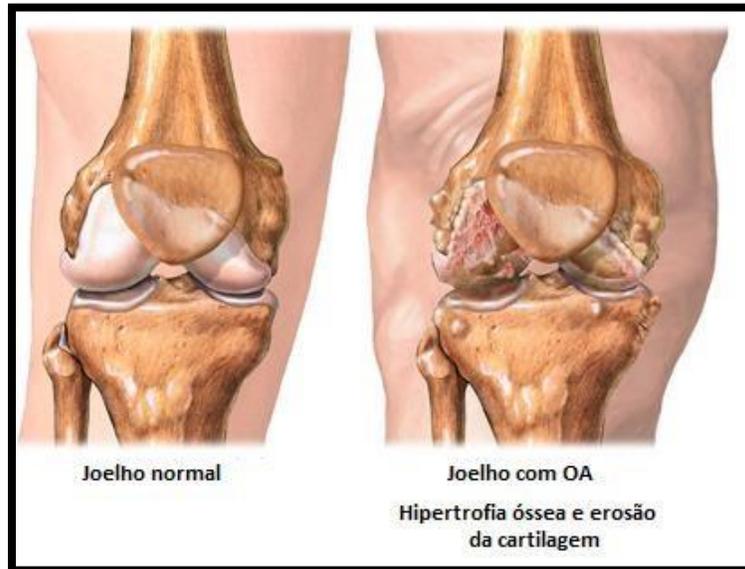


Figura 2 – Representação diagramática da articulação do joelho normal (à direita) e com AO (à esquerda).

(Fonte: Adaptado de *adamimages.com*)

Na OA, o processo inflamatório clássico de infiltração leucocitária não é proeminente, diferente de outros processos inflamatórios articulares, como a AR. Embora a inflamação do tecido sinovial também esteja presente na OA e, em alguns indivíduos seja indistinguível da AR, o componente inflamatório da OA é caracterizado pela detecção de mediadores inflamatórios, tais como citocinas e quimiocinas (como IFN- δ e IL-1 β componentes da resposta imune inata), associados às manifestações clínicas e histórico do paciente. Tais mediadores levam à produção de enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação da matriz extracelular, que culmina em destruição da articulação. A biomecânica é um fator importante para a patogênese da OA e, atualmente, compreende um papel maior que apenas o desgaste natural da articulação ao longo da vida. A carga excessiva ou anormal sobre a articulação estimula as células articulares a produzir mediadores inflamatórios e proteases que medeiam a destruição articular da OA (LOESER, 2012).

Estudos norte-americanos apontam uma prevalência de 9% em adultos acima de 60 anos, representando um número superior a 50 milhões de pessoas apresentando esta

enfermidade (COIMBRA et al., 2002; LOVESLESS et al., 2016). A fisiopatologia da OA é multifatorial e inclui degeneração articular, enfraquecimento da função muscular e traços psicológicos de dor crônica (WANG et al., 2009). Fatores de risco para o declínio funcional incluem dor, edema, redução da força muscular, frouxidão da articulação acometida (principalmente joelhos), baixa estabilidade em posição ortostática, comorbidades e excesso de massa, além de fatores psicológicos, sociais (ansiedade, depressão, fadiga, apoio social) e sociodemográficos (DEKKER et al., 2009). A informação sobre os fatores de risco do paciente com OA pode contribuir para prever quadros de episódios agudos e limitação às atividades, além de fornecer condições otimização do tratamento (DEKKER, et al., 2009).

1.4 Artrite gotosa (AG)

A AG ou gota é uma forma de artrite que causa episódios súbitos e graves de dor, sensibilidade, rubor, calor e tumefação das articulações. A AG afeta, em geral, uma articulação por vez, com maior frequência, a articulação maior do dedo grande do pé, quando então é denominada podagra. Outras articulações podem ser afetadas, incluindo aquelas presentes em joelhos, tornozelos, pés, mãos, punhos e cotovelos. A AG é uma doença crônica resultante da deposição de cristais de urato monossódico (MSU), formados pelo aumento das concentrações de urato. A dor e a tumefação da gota são causadas por deposição de MSU no fluido extracelular da articulação afetada (KHANNA et al., 2012). O ácido úrico é formado quando o organismo realiza o metabolismo de produtos da excreção de purinas, sendo, usualmente solubilizado no sangue e excretado na urina. Nos pacientes com AG, a uricemia é elevada (superior a 7 mg/dL) e, como resultado, os cristais se depositam no fluido articular, cartilagem, ossos, tendões, bursas e outros tecidos, causando inflamação da sinóvia (KHANNA et al., 2012; SBR, sem data). Embora fatores ambientais contribuam para a hiperuricemia, as excreções renal e intestinal têm papel extremamente relevante na regulação das concentrações séricas de urato. A ativação de NLRP3 inflamassoma e liberação de IL-1 β desempenham papel importante na iniciação crises dolorosas de AG, sendo a IL-1 β a citocina mais importante na AG. (DALBETH et al., 2016).

A AG é uma das doenças reumáticas mais comuns da vida adulta, principalmente em homens entre 40 – 50 anos de idade, com uma prevalência estimada em 3,9% nos EUA. Ainda verifica-se um progressivo aumento em muitos outros países nas últimas décadas decorrente de fatores como o aumento das comorbidades que promovem hiperuricemia (hipertensão, obesidade, diabetes melittus tipo II e doença renal crônica; KHANNA et al., 2012; SBR, sem data). Podem ser citados, ainda, certas tendências dietéticas, prescrição de diuréticos tiazídicos e de alça, hereditariedade, idade, gênero masculino ou menopausa precoce como fatores de risco (AHRQ, 2016).

A AG pode afetar a qualidade de vida de diferentes formas, sendo que alguns pacientes podem ter apenas um episódio e não apresentarem outra manifestação articular, enquanto outros pacientes podem ter vários episódios agudos e dolorosos ao longo da vida. Assim, a AG pode ser classificada em leve, moderada e grave, dependendo do número e gravidade dos episódios de dor e tumefação (Figura 3)



Figura 3 – Fotografias representando graus leve (A), moderado (B) e grave (C) de AG
(Fonte: KHANNA et al., 2012)

A AG geralmente ocorre em três fases:

- 1) Dor e tumefação súbitas na articulação, que em geral cessam em 5 a 10 dias;

- 2) Um período assintomático, mas que pode ser seguido de outros episódios agudos graves;
- 3) Após alguns anos, sem tratamento, podem ocorrer tumefação e rigidez persistentes, com dor leve a moderada, em uma ou mais articulações.

Manifestações renais da AG incluem urolitíase, tipicamente ocorrendo em urina ácida (pH 1 a 2). Mais raramente, pode ocorrer nefropatia crônica intersticial por deposição de MSU na medula renal verificada em casos mais graves da doença (KHANNA et al., 2012).

1.5 A dor e o edema em processos inflamatórios articulares

A condição artrítica é extremamente dolorosa e, por décadas, pesquisas médicas têm sido direcionadas ao desenvolvimento de intervenções terapêuticas que promovam o alívio da dor e aumentem a expectativa de vida dos pacientes (REGINSTER, 2002). A dor é um sintoma importante na artrite (YU et al., 2002), frequentemente relatada como o mais importante (WALSH & McWILLIANS, 2014) e caracterizada por hiperalgesia e dor espontânea (SHAIBLE & GRUBB, 1993). De acordo com a definição estabelecida pela *International Association for the Study of Pain* (IASP), a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com lesão tecidual real ou potencial. Geralmente, essa experiência se inicia com a ativação dos nociceptores, que são neurônios sensoriais de alto limiar componentes do sistema nervoso somatossensorial periférico, capazes de codificar e traduzir estímulos nocivos. Nas articulações, os nociceptores localizam-se na cavidade articular, ligamentos, ossos, periósteo e próximos aos vasos, sendo sensíveis à pressão e ao movimento articular. Em indivíduos normais, o relato de dor só ocorre em extremos de movimentação articular. Pacientes com AR relatam a dor em diversos padrões, embora frequentemente distingam os momentos nos quais a dor é constante e intermitente, limitante à realização de tarefas e exercícios. A rigidez matinal, critério essencial para o diagnóstico, pode ser considerada parte da experiência dolorosa e a ocorrência

conjunta da dor e da rigidez sugere mecanismos inflamatórios compartilhados (WALSH & McWILLIANS, 2014).

O edema na sinóvia e nas estruturas periarticulares é um fator que contribui para a rigidez, pois interfere na mecânica normal da articulação (KHURANA & BERNEY, 2005). As citocinas inflamatórias desempenham papel fundamental para início e manutenção do processo inflamatório, resultando em destruição do tecido articular envolvido. A membrana sinovial envolve as articulações e possui, em condições normais, três camadas de células e estroma subsinovial avascularizado. Na artrite aguda, tal membrana apresenta-se espessada, hiperêmica e edematosa (GOLDING, 1999), com seis a dez camadas de células, dilatações venosas, alterações vasculares focais e segmentares, obstrução capilar, áreas de trombose e hemorragia perivascular, entre outros (SKARE, 1999).

1.6 Farmacoterapia

O tratamento das condições inflamatórias articulares consiste em uma abordagem multidisciplinar e busca melhorias funcional, mecânica e clínica. Além dos medicamentos para manejo da dor e do edema, medidas não farmacológicas tais como programas educativos, sessões de fisioterapia, apoio psicossocial, terapia ocupacional e abordagens cirúrgicas são de extrema importância para a manejo apropriado e melhor controle dos sintomas (COIMBRA et al., 2002; MOTA et al., 2012). A abordagem consiste em um processo dinâmico que demanda constante avaliação, variando conforme a atividade e a gravidade da doença. A farmacoterapia das doenças inflamatórias articulares inclui, no geral, o uso de várias classes de fármacos. É importante ressaltar que o manejo farmacoterapêutico dessas doenças reflete, na maioria dos casos, o alívio sintomático da dor e o retardo do agravamento das incapacidades funcionais, sem, no entanto, eliminar a causa do processo inflamatório. As duas classes de fármacos que tradicionalmente mais contribuem para o alívio da dor e um retardo moderado da progressão da doença são os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) e os anti-inflamatórios esteroides (AIEs). Esses fármacos podem

ser usados por pacientes apresentando diferentes doenças inflamatórias articulares, incluindo AR, OA e AG. Outros fármacos, chamados fármacos modificadores do curso da doença (FMCDs) podem ser usados para preservar as funções das articulações e são mais frequentemente usados por pacientes com AR. Fármacos que inibem a xantina oxidase ou aumentam a excreção renal de ácido úrico são úteis no tratamento de pacientes com AG.

1.6.1 Anti-inflamatórios não esteroides (AINEs)

Os AINEs são uma classe de anti-inflamatórios que apresentam atividades analgésica, antipirética e antiedema. Entre os mecanismos de ação propostos para esses fármacos, está a inibição das enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), as quais estão envolvidas na produção de mediadores inflamatórios como prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (NANDAKISHORE et al., 2014; VANE, 1971; VITALI et al., 2016). Adicionalmente, alguns AINEs, como o ácido acetilsalicílico e o ibuprofeno, inibem o fator nuclear *kappa* B (NF- κ B), o que pode resultar na redução da produção de vários mediadores inflamatórios (EPINAT & GILMORE, 1999; GRILLI et al., 1996; LIU et al., 2008; PALAYOOR et al., 1998). Fármacos dessa classe são amplamente usados por pacientes com AR e OA devido às suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (BLUMBERG & FOX, 2001; HOCHBERG et al., 2012). Entretanto, o seu uso requer cautela devido à possibilidade de ocorrência de reações adversas como dor epigástrica e úlceras gastrintestinais, lesões renais e eventos tromboembólicos.

1.6.2 Anti-inflamatórios esteroides (AIEs)

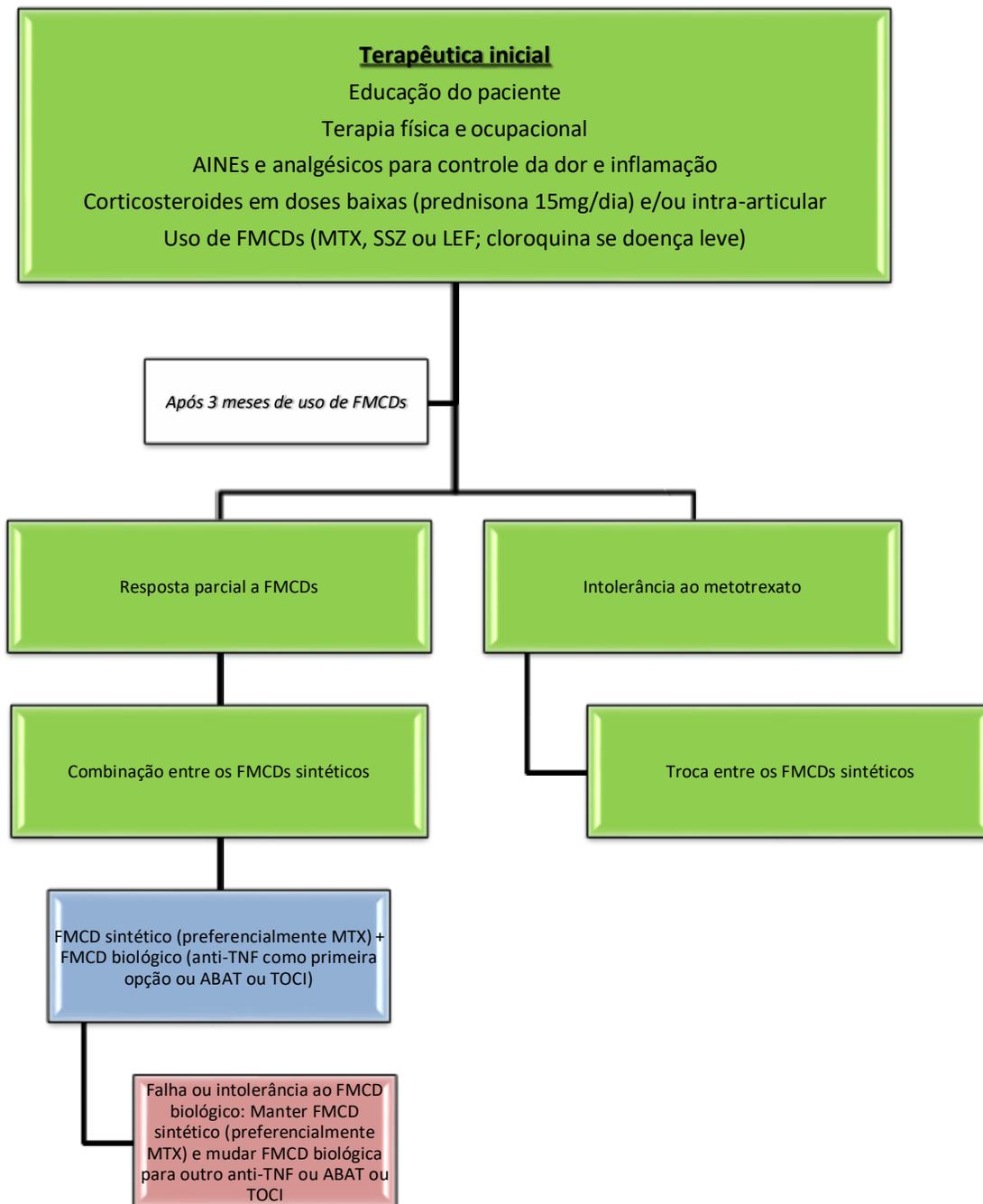
Os AIEs são fármacos que interagem com receptores intracelulares em vários tecidos e exercem um efeito modulatório sobre a expressão de grande número de genes (SCHIMMER & FUNDER, 2011). O efeito induzido por esses fármacos pode ser devido a interações com sequências de DNA específicas levando a uma transativação de genes de proteínas anti-inflamatórias ou, indiretamente, pela inibição dos fatores de transcrição de genes que codificam mediadores inflamatórios como citocinas, moléculas de adesão e enzimas, entre outros. Como consequência, ocorre supressão

de da produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão, inibição da função dos macrófagos teciduais e células apresentadoras de antígenos, inibição da desgranulação dos mastócitos, inibição da produção de PGs e leucotrienos pela redução da expressão de COX-2, entre vários outros efeitos que contribuem para as marcantes atividades anti-inflamatória e imunossupressora dessa classe de fármacos.

Embora os AIEs sejam fármacos anti-inflamatórios eficazes, a sua administração crônica frequentemente resulta em reações adversas graves como redução da densidade óssea, desequilíbrio de fluidos e eletrólitos, elevação da glicemia, imunossupressão, aumento da pressão intraocular e da pressão arterial, entre outras. Essas reações adversas são fatores limitantes do uso dos AIEs no tratamento de pacientes com doenças inflamatórias articulares, principalmente quando o uso é prolongado.

1.6.3 Farmacoterapia da AR

A farmacoterapia da AR, representada segundo o algoritmo da Figura 4, envolve o uso de vários fármacos do grupo dos AINEs e dos AIEs, bem como do grupo dos FMCDs.



Obs: A terapia de primeira linha está indicada em verde, a de segunda linha em azul e a de terceira, em vermelho. Recomenda-se um período mínimo de três meses e máximo de seis meses de avaliação clínica para realizar a troca de esquema terapêutico. ABAT = abatacepte; FMCD = fármaco modificador do curso da doença; MTX = metotrexato; SSZ = Sulfassalazina; TOCI = tocilizumabe.

Figura 4 - Fluxograma para o tratamento dos pacientes com AR
(Adaptado de MOTA et al., 2012).

O consenso mais recente do *American College of Rheumatology* (ACR; SINGH et al., 2016) trouxe mudanças em relação ao manejo de pacientes com AR, recomendando outros anti-TNF ou o tofacitinibe associados ao metotrexato como terapia de segunda linha para pacientes que ainda apresentam a doença com atividade moderada ou alta após três meses de terapia com FMCD (preferencialmente MTX). No Brasil, a Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR) recomenda apenas os fármacos anti-TNF

Os FMCDs incluem um diversificado grupo de moléculas, podendo ser agentes não-biológicos e biológicos (Tabela 1). O objetivo primário das terapias com FMCDs é preservar as funções das articulações, reduzindo ou prevenindo danos (BLUMBERG & FOX, 2001).

**Tabela 1 – FMCDs e suas respectivas classes
(Adaptado de GROSSER et al., 2011)**

Fármaco	Classe ou ação
<u>Moléculas pequenas</u>	
Metotrexato	Anti-folato
Leflunomida	Inibidor de Pirimidina sintase
Hidroxicloroquina	Anti-malárico
Minociclina	Antimicrobiano do grupo das tetraciclinas, inibidor da 5-lipooxigenase
Sulfassalazina	Salicilato
Azatioprina	Inibidor de Purina sintase
Ciclosporina	Inibidor de calcineurina
Ciclofosfamida	Agente alquilante
<u>Biológicas</u>	
Adalimumabe	Fab, antagonista TNF- α
Golimumabe	Fab, antagonista TNF- α
Infliximabe	Anticorpo tipo IgG anti- TNF- α
Certolizumabe	Fragmento Fab que se liga ao TNF- α
Etanercepte	Fragmento proteico que se liga ao TNF- α
Abatacepte	Inibidor da co-estimulação de células (liga a proteína B7 na célula apresentadora de antígeno)
Rituximabe	Fab direcionado ao CD20 de células B citotóxicas
Anakinra	Antagonista de receptor de IL-1
Tocilizumabe	Anticorpo monoclonal tipo IgG anti- IL-6

O metotrexato é um dos FMCDs mais frequentemente usado no tratamento de pacientes com AR (CHOI et al., 2002). Estudos indicaram que tal fármaco pode promover ainda um benefício considerável na sobrevida de pacientes com AR, possivelmente por reduzir o processo inflamatório e a disfunção endotelial na aterosclerose e, conseqüentemente, o risco de complicações cardiovasculares (TURIEL et al., 2010; VAN PALM et al., 2006). As reações adversas induzidas por esse fármaco, principalmente em regime de doses diárias por vários anos, incluem

hepatotoxicidade com fibrose e cirrose (PISETSKY & St CLAIR, 2001). O risco de desenvolvimento de infecções graves em pacientes tratados com FMCDs e AIEs sugere cautela no uso dessa associação (BERNATSKY et al., 2007).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS; 2015), os FMCDs essenciais são cloroquina, azatioprina, hidroxicloroquina, metotrexato, penicilamina e sulfassalazina. Na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME; Ministério da Saúde) de 2014 pertencem à lista dos FMCDs a cloroquina e a hidroxicloroquina, o metotrexato, a azatioprina, a prednisolona, a penicilamina, a sulfassalazina, além do ácido fólico, que pode ser utilizado para minimizar as reações adversas do tratamento.

Pesquisas têm direcionado ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas capazes de inibir ou bloquear a função do TNF- α , uma citocina que possui um papel importante na patogênese da AR. Considerados um avanço da reumatologia, os inibidores de TNF- α , citados como principais representantes das terapêuticas biológicas, apresentam-se como resultados do acúmulo de informações etiológicas adquiridas nas últimas décadas. O TNF- α é uma citocina inflamatória produzida por monócitos e macrófagos. As ações do TNF- α incluem amplificação de múltiplas citocinas nas articulações, quimiotaxia linfocítica, aumento da angiogênese, estimulação de células sinoviais para liberação de metaloproteinases, causando destruição tecidual (COSTELLO & HALVERSON, 2003).

A maior razão para se empregar terapias que inibam a produção de TNF- α ou a sua interação com os receptores, deriva da capacidade de redução da erosão articular, a qual representa condição que causa extremo sofrimento aos pacientes com AR. Muitos destes, com graus moderado ou grave da doença, apresentam-se refratários ao tratamento com os FMCDs, mas apresentam boas respostas aos fármacos anti-TNF- α (COSTELLO & HALVERSON, 2003). Observadas as contraindicações, o alto custo e as vias de administração empregadas caracterizam-se como fatores limitantes adicionais para ampliação de seu emprego. O maior impacto no uso desses agentes bloqueadores de TNF- α é a ocorrência de imunossupressão, que pode resultar em

infecções graves e não-graves, neoplasias, doenças imunes ou reativação de infecções latentes (HAROON & INMAN, 2009; LISTING et al., 2005; VASSILOPOULOS & CALABRESE, 2007). As reações adversas graves, embora relativamente raras, podem ocorrer e de maneira imprevisível e com custos consideráveis (KUKAR et al., 2009). O uso clínico desses agentes biológicos deve ser cautelosamente avaliado, pois, além de serem de custo elevado, uma população significativa de pacientes com AR é refratária à terapia anti-TNF- α . Sugere-se, que nessas populações, possivelmente outras moléculas inflamatórias ou vias imunológicas que conduzem à síndrome clínica apresentam maior relevância (FINGER, 2001).

1.6.4 Farmacoterapia da OA

O tratamento de pacientes com OA, inicialmente baseia-se em abordagens não-farmacológicas como redução da massa corporal, exercícios físicos e sessões de fisioterapia (SMITH et al., 2016; WANG et al., 2009). Entretanto, essas medidas promovem alívio parcial e insuficiente da dor e, assim, frequentemente, a farmacoterapia é empregada ainda em estágios iniciais. Muitas sociedades profissionais – como a ACR, a *European League Against Rheumatism* (EULAR) e a *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) – recomendam o uso de AINEs ou tramadol, um opioide de atividade reduzida, para o manejo primário da dor de pacientes com OA (HOCHBERG et al., 2012; SMITH et al., 2016). As recomendações farmacoterapêuticas do ACR encontram-se resumidas na tabela 2.

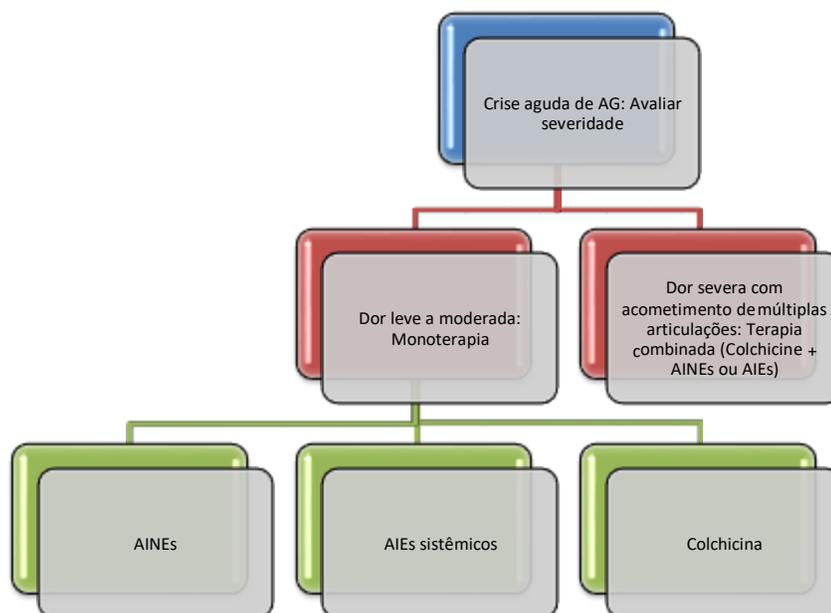
Tabela 2 – Recomendações farmacológicas para o manejo inicial de pacientes com OA de joelho, segundo a ACR

Recomendado	Não recomendado	Sem recomendação
Paracetamol	Sulfato de condroitina	Hialuronato intra-articular
AINEs oral	Glucosamina	Duloxetina
AINEs tópico		Analgésicos opioides
Tramadol		
AIEs intra-articular		

(Fonte: Adaptado de HOCHBERG et al., 2012)

1.6.5 Farmacoterapia da AG

O manejo de pacientes com AG inclui a farmacoterapia e o controle da dieta, objetivando aliviar a dor, abreviar a duração do processo inflamatório durante um episódio agudo, prevenir episódios futuros e evitar lesões nas articulações (SBR, sem data). O tratamento deve ser individualizado e pode requerer ajustes periódicos. É preciso considerar comorbidades (hipertensão, diabetes mellitus tipo II, obesidade, ingesta excessiva de álcool, fatores dietéticos, histórico de urolitíase ou uso de medicamentos que elevem o urato sérico) para elaborar um plano terapêutico apropriado (KHANNA et al, 2012). Pacientes que apresentam hiperuricemia, mas sem outras queixas, não necessitam de tratamento medicamentoso. A SBR recomenda o uso de AINEs (seletivos ou não-seletivos), AIEs (triancinolona por via intra-articular ou prednisona por via oral) e colchicina para alívio da dor e da tumefação durante os episódios agudos. O alopurinol (um inibidor de xantina oxidase) é o principal fármaco recomendado para evitar os episódios agudos e, ocasionalmente, a probenecida, a sulfipirazona e a benzobromarona são usadas para reduzir as concentrações de ácido úrico no sangue por meio do aumento da excreção renal, evitando assim, a formação dos depósitos de ácido úrico nas articulações. O ACR recomenda inibidores de xantina oxidase (alopurinol ou febuxostate) como terapia de primeira linha para pacientes com AG e a probenecida (agente uricosúrico) como alternativa (KHANNA et al, 2012). A figura 5 representa o algoritmo de tratamento de pacientes com AG durante episódios agudos.



OBS: Aplicação de gelo na articulação acometida é recomendada enquanto durar a crise, quantas vezes forem necessárias. Paciente deve ser orientado a mudanças no estilo de vida, principalmente, dietéticas, independente da severidade da crise de AG.

Figura 5 – Algoritmo de tratamento de pacientes com episódio agudo de AG segundo recomendações do ACR (Adaptado de KHANNA et al., 2012)

1.7 Modelos experimentais de inflamação articular

No desenvolvimento de novas estratégias que ultimamente possam contribuir para o tratamento de pacientes com processos inflamatórios articulares, são comumente utilizados modelos experimentais para fornecer subsídios que permitam aumentar o conhecimento sobre os mecanismos da doença, identificação de novos alvos moleculares, investigações de novos agentes terapêuticos ou identificação de atividade de interesse em fármacos conhecidos. A indução de inflamação articular tem sido realizada por meio da administração de agentes artritogênicos, entre os quais o pristane (VINGSBO et al., 1996; ZHENG et al., 2002), o zimozano (GUERREIRO et al., 2006), o adjuvante incompleto de Freund (CANNON et al., 1993; ZHANG et al., 1999), o adjuvante completo de Freund (CFA) (BARTON et al., 2007; BILLIAU & MATTHYS,

2001; CAI et al., 2006; COOK & MOORE, 2006; YU et al., 2002) e o MSU (AMARAL et al., 2016; TORRES et al., 2009).

Os modelos experimentais de artrite induzida por adjuvante são justificados pelas características que se assemelham àquelas da doença humana (BILLIAU & MATTHYS, 2001; CAI et al., 2006; COOK & MOORE, 2006; NAGAKURA et al., 2003). Entre as semelhanças, incluem-se a hipersensibilidade, o edema de articulação e as alterações histopatológicas (DONALDSON et al., 1993; WILSON et al., 2006). Apesar das limitações inerentes aos modelos experimentais, os modelos em roedores forneceram enorme contribuição para o entendimento de mecanismos envolvidos na patogênese e, dessa forma, permitiram grandes avanços na farmacoterapia da AR (ASQUITH et al., 2009).

A artrite induzida por adjuvante (AIA) é um modelo experimental de doença autoimune mediada por células T que possui semelhanças com a AR humana (YOSHINO & CLELAND, 1992; ZHANG et al., 1999). A AIA em ratos foi o primeiro modelo animal a ser descrito e ainda é largamente utilizado em testes pré-clínicos de novos agentes antiartríticos, especialmente os AINEs. Além disso, a AIA em ratos tem sido um modelo há muito empregado para estudar o processo inflamatório (COSTA et al., 1981; PEARSON et al., 1956). O método clássico consiste em injeção intradérmica (i.d.) de CFA em ratos, principalmente os da linhagem Lewis. O CFA é composto por óleo de parafina contendo monooleato de manitol como um surfactante em suspensão contendo bactérias mortas do gênero *Mycobacterium*. Esse modelo apresenta características como início rápido do processo inflamatório e progressão robusta, inflamação poliarticular e intensa reabsorção óssea. Os sinais clínicos da poliartrite grave aparecem, geralmente, cerca de dez dias após injeção do CFA, porém raramente mantêm-se após um mês. Preferencialmente, utiliza-se a via de imunização i.d., na base da cauda (WAUBEN, 1994). No 14º dia após a imunização, além da destruição articular, torna-se mais evidente o infiltrado celular, particularmente o neutrofílico. A resposta inflamatória nesse modelo é dependente de células T e compartilha algumas características com a AR como edema das extremidades, destruição das cartilagens,

infiltração de linfócitos, perda de função das articulações e reabsorção óssea (BILLIAU & MATTHYS, 2001).

A injeção intra-articular (i.a.) de agentes indutores de inflamação também pode ser realizada de modo a simular processos inflamatórios semelhantes aos da OA e AG. O próprio CFA pode ser administrado por via i.a., promovendo processo inflamatório local e nocicepção (LOPES et al., 2016). Outro modelo experimental utiliza zimozano, um polissacáride extraído da membrana de *Saccharomyces cerevisiae*. O zimozano se liga a TLR-2 em macrófagos, levando à liberação de citocinas inflamatórias, mobilização de ácido araquidônico e ativação da cascata do complemento. A injeção de zimozano diretamente no joelho de camundongos de diferentes linhagens resulta em inflamação articular, infiltração de células mononucleadas, hipertrofia de sinóvia e formação de pannus, com pico da doença em torno do 7^o dia. Ainda, esse modelo foi descrito como bifásico, sendo a fase precoce em torno de sete dias e uma outra, tardia, com pico em torno de 14 dias e persistindo até o 25^o dia (FRASNELLI et al., 2005). Nestes modelos, o TNF- α destaca-se como citocina importante para estabelecimento da dor e do edema. A principal limitação deste modelo consiste na natureza monoartrítica da doença. A injeção i.a. de MSU também foi previamente descrita por diversos autores (AMARAL et al., 2016; TORRES et al., 2009) como um modelo experimental reprodutível de AG, resultando em nocicepção e processo inflamatório local com elevação principalmente das concentrações de IL- β .

1.8 Novas funções para fármacos em uso

Nos últimos anos, a pesquisa visando o desenvolvimento de novos fármacos mostrou resultados insuficientes para compensar os grandes investimentos, resultando numa relação extremamente desfavorável entre custo e benefício. Em virtude disso, no campo da pesquisa de novas abordagens farmacoterapêuticas, houve uma concentração de esforços e investimentos na caracterização de novas funções para fármacos em uso como uma alternativa ao processo longo e dispendioso de desenvolvimento de novos fármacos. Essas abordagens têm se mostrado vantajosas

para a indústria farmacêutica, uma vez que parâmetros como segurança e perfil farmacocinético de fármacos em uso clínico estão previamente estabelecidos (BASTOS & COELHO, 2014; CHONG & SULLIVAN, 2007).

1.8.1 Vitaminas do complexo B e o nicorandil

Nesse contexto, podemos citar derivados da vitamina B, complexo formado por 11 vitaminas (tiamina, riboflavina, nicotinamida, ácido pantotênico, piridoxina, biotina, cianocobalamina, ácido fólico, inositol, colina e ácido para-aminobenzoico). A correção de deficiências é seu principal uso terapêutico, mas esses derivados têm sido alvos de investigação de novas atividades farmacológicas. Essas novas funções são relatadas na literatura e suportam a ideia de que algumas destas vitaminas apresentam atividades anti-inflamatória e antinociceptiva. Estudos clínicos demonstraram que altas doses da riboflavina (vitamina B₂) são úteis na profilaxia da enxaqueca, reduzindo a frequência e a duração das crises (BOEHNKE et al., 2004; SCHOENEN et al., 1998). Além disso, foi demonstrado que a deficiência de uma ou mais vitaminas do complexo B está, muitas vezes, associada à ocorrência de neuropatias e dor, como no caso da síndrome do túnel do carpo, caracterizada pela perda de força e sensibilidade das mãos, parestesia e dor que pode se estender do punho ao ombro. Ellis e colaboradores (1982) detectaram deficiência da piridoxina em pacientes que desenvolveram essa síndrome, sendo que os sintomas foram aliviados pela correção da deficiência. Por sua vez, Folkers e colaboradores (1984) descreveram um caso clínico no qual a STC estava associada à deficiência da piridoxina e da riboflavina. O tratamento desse paciente com essas vitaminas reduziu os sinais e sintomas de forma rápida e eficaz e eliminou a necessidade de intervenção cirúrgica.

A maioria das vitaminas do complexo B não é produzida pelo organismo humano, e, por serem moléculas hidrossolúveis, o organismo tem dificuldade para armazená-las, devendo, portanto, serem ingeridas diariamente. A deficiência de vitaminas do complexo B resulta em vários sinais e sintomas dependentes da (s) vitamina(s) envolvida (s) e do grau de privação. Pacientes com deficiência de riboflavina,

nicotinamida, piridoxina ou biotina podem desenvolver dermatites em regiões corporais diversas, como extremidades, face e couro cabeludo. Deficiências graves ou crônicas de vitaminas do complexo B podem levar a alterações morfológicas e comprometimento funcional do sistema nervoso (MARCUS & COULSTON, 2001). Um representante do grupo, o ácido fólico (vitamina B₉) é recomendado pelo Ministério da Saúde (RENAME, 2014) para o tratamento de pacientes com AR, principalmente em combinação com metotrexato, por minimizar as reações adversas.

A deficiência crônica de vitamina B₁ (tiamina) desencadeia uma síndrome conhecida como beribéri, que compreende uma multiplicidade de sinais e sintomas que afetam diferentes sistemas e incluem fadiga muscular, mialgia, parestesia e insuficiência cardíaca (KOIKE et al., 2004). A deficiência mais grave da tiamina pode resultar em uma alteração psiquiátrica conhecida como síndrome de Wernicke-Korsakoff, caracterizada por encefalopatia grave e aguda que se manifesta como confusão mental, distúrbios óculo-motores e ataxia (MURATA et al., 1999). Há evidências que demonstram a importância da vitamina B₆ ou piridoxina para o funcionamento do sistema nervoso central, sendo uma delas, o controle pela piridoxina de um tipo raro de crises convulsivas recorrentes que não são atenuadas por antiepiléticos convencionais. Porém, ainda não se identificou a alteração bioquímica responsável por esse tipo de crise convulsiva (BAXTER, 2003). A deficiência da vitamina B₁₂ ou cianocobalamina, por sua vez, pode levar ao desenvolvimento da anemia megaloblástica como um dos sinais iniciais. A cianocobalamina participa tanto do metabolismo do aminoácido metionina e do ácido fólico quanto da síntese de ácidos nucleicos. Observa-se que sua deficiência interfere na mitose e, assim, afeta de forma marcante os tecidos nos quais há altas taxas de renovação celular, como o tecido hematopoiético (HILLMAN, 2001).

Outra vitamina do complexo B que vem sendo estudada é a vitamina B₃, que possui duas substâncias como representantes: a nicotinamida (ou niacinamida) e o ácido nicotínico (ou niacina), representadas a seguir:

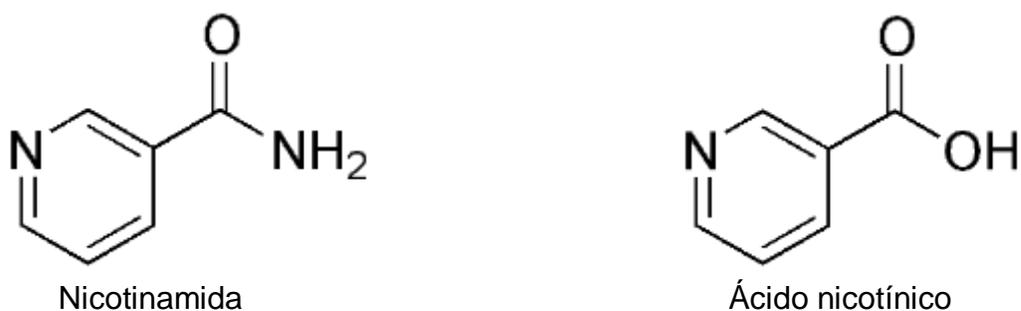


Figura 6 - Estruturas químicas dos compostos da vitamina B₃.

Essas vitaminas atuam no organismo como precursoras das coenzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP⁺) que, por sua vez, atuam conjuntamente com várias outras enzimas, catalisando reações de oxirredução envolvendo acepção e doação de elétrons e hidrogênio, essenciais para o processo respiratório de mamíferos (MARCUS & COULSTON, 2001).

Vitaminas do complexo B se inserem nesse contexto de investigação de novas funções para fármacos já existentes, uma vez que, embora possuam estruturas bastante semelhantes e atuem de maneira idêntica como vitaminas, o ácido nicotínico e a nicotinamida têm diferentes funções farmacológicas e perfis toxicológicos. O ácido nicotínico, por exemplo, é o mais antigo dos fármacos utilizados no tratamento de pacientes com dislipidemias e o mais versátil, induzindo alterações favoráveis de todos os parâmetros lipídicos (ALTSCHUL et al., 1955; KNOPP, 1998), aumento da síntese e da secreção de apolipoproteína A1 e aumento do catabolismo da lipoproteína (a) (FORTI, 2000). Embora já tenha sido considerado fármaco de escolha para o tratamento de pacientes com hipercolesterolemia grave (CLEMENTZ, 1987), uma revisão mais recente, demonstrou que o ácido nicotínico não reduz a mortalidade e que o benefício em desfechos secundários (infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral não-fatais) é reduzido quando utilizado em monoterapia (KEENE, et al., 2014). As doses utilizadas na farmacoterapia para dislipidemias são altas, podendo chegar a 6 g por dia, sendo que a necessidade diária dessa vitamina é de aproximadamente 50

mg por dia. Foi demonstrado que a nicotinamida, embora não seja eficaz no tratamento das dislipidemias, pode ser útil na prevenção do diabetes mellitus tipo 1. Este tratamento foi proposto a partir da observação de que altas doses de nicotinamida previnem o diabetes induzido por estreptozotocina em ratos. Além disso, a nicotinamida possui atividade protetora de células β pancreáticas (MASIELLO et al., 1990). Apesar dos resultados positivos obtidos em ensaios pré-clínicos, a eficácia da nicotinamida na prevenção do diabetes mellitus tipo 1 em humanos ainda não foi bem estabelecida (GALE et al., 2004).

Outros estudos investigaram o efeito induzido pela nicotinamida em modelos experimentais de dor e inflamação. Foi demonstrada a atividade anti-inflamatória da nicotinamida em modelos de artrite induzida por peróxido cromato de potássio (MIESEL et al., 1995), pleurite (CUZZOCREA et al., 1999) e edema de pata (GODIN et al., 2011) induzidos por carragenina. É possível que essa atividade esteja associada à inibição da produção de mediadores inflamatórios, da infiltração leucocitária e da expressão do gene da COX-2 (PERO et al., 1999; GRANGE, et al., 2008; UNGERTSTEDT et al., 2003). A nicotinamida e o ácido nicotínico também inibem a resposta nociceptiva induzida por formaldeído e a alodínia mecânica induzida por carragenina (GODIN et al., 2011, 2012).

O nicorandil, ou nitrato de 2-nicotinamidoetil (Figura 7), é um doador de óxido nítrico (NO), amplamente aceito como um agente efetivo para o tratamento de pacientes com doenças cardíacas isquêmicas, em especial, a *angina pectoris*, com eficácia similar àquela do dinitrato de isossorbida e uma opção terapêutica para pacientes refratários ao tratamento convencional (EL-MOSELBY et al., 2009; FRAMPTON et al., 1992). A estrutura química do nicorandil demonstra que se trata da nicotinamida acoplada a um doador de NO. A ligação de um radical doador de NO a estrutura química de fármacos, em especial a AINEs e AIEs, pode melhorar o seu perfil farmacológico, seja por meio do aumento da eficácia terapêutica ou da redução de ocorrência de reações adversas. Como exemplos, temos o ácido acetilsalicílico (AAS), o paracetamol, o naproxeno e a

prednisona. Os NO-AINEs não somente exibem baixa toxicidade gastrointestinal, como podem apresentar benefícios adicionais como no caso do NO-paracetamol, que apresenta um perfil hepatoprotetor, diferentemente do paracetamol que, em elevadas doses, pode causar toxicidade ao fígado (KEEBLE & MOORE, 2002). Nitroclufenaco (WALLACE et al., 1994) e nitronaproxeno (DAVIES et al., 1997) também induzem lesões gastrointestinais reduzidas quando comparados aos fármacos originais. Recentemente, um novo híbrido do AAS acoplado mutuamente a um doador de NO e de ácido sulfídrico (H₂S) apresentou atividade superior àquela do AAS em modelos de dor e inflamação (contorção induzida por ácido acético, hiperalgesia induzida por carragenina e induzida por CFA; FONSECA et al., 2015).

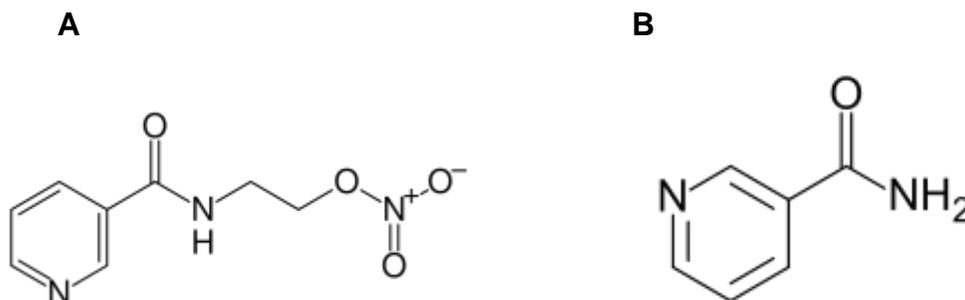


Figura 7 – Estruturas químicas do nicorandil (A) e da nicotinamida (B).

O nicorandil está disponível no Japão desde 1984 e, atualmente, está licenciado também na Europa e na Austrália, aprovado para o uso na prevenção e no tratamento de pacientes com *angina pectoris* crônica. O maior ensaio clínico já realizado com o nicorandil demonstrou redução de ocorrência de infarto não-fatal, hospitalização não planejada por dores no peito e morte por doença cardiovascular em 5126 pacientes com angina no Reino Unido (IONA Study Group, 2002). O seu amplo uso clínico em alguns países possibilitou que informações sobre a sua segurança sejam conhecidas e que, caso haja alguma nova indicação terapêutica, sua implantação efetiva na clínica seja uma etapa relativamente mais rápida e simples. Previamente, foi demonstrada a atividade antinociceptiva do nicorandil em modelo experimental de dor induzida por

formaldeído em camundongos (DUTRA et al., 2013), o que estimula maiores investigações das atividades desse fármaco em outros modelos de dor e inflamação.

Na literatura científica, não existem estudos que tenham investigado os efeitos induzidos por nicotinamida, ácido nicotínico ou nicorandil em modelos experimentais de inflamação articular. Entre os poucos estudos na área, podemos citar o de Hoffer (1959), em que foram descritos relatos de seis casos nos quais altas doses de nicotinamida (900 a 4000 mg/dia) ou ácido nicotínico (1000 mg/dia) induziram melhora clínica de pacientes com diversos tipos de artrite. Jonas e colaboradores (1996), por sua vez, realizaram um estudo envolvendo 70 pacientes com osteoartrite e relataram que nicotinamida induziu melhora clínica por promover aumento da flexibilidade articular, reduzir a inflamação e possibilitar diminuição da dose de outros medicamentos utilizados nessa doença. No entanto, não foram encontrados outros estudos que investigaram a possibilidade de uso dessas substâncias no tratamento de pacientes com AR, OA ou AG, nem os mecanismos que poderiam contribuir para o efeito benéfico induzido por tal tratamento.

2 JUSTIFICATIVA

AR, OA e AG são doenças de elevada prevalência na população, cuja importância vem crescendo junto ao fenômeno de envelhecimento da população e o consequente aumento das doenças crônicas. O tratamento de pacientes com condições inflamatórias articulares é realizado com fármacos cuja finalidade é o alívio sintomático, como no caso dos anti-inflamatórios e analgésicos, e com outros fármacos que podem modificar o curso da doença (FMCDs) de modo a preservar a função articular. Entretanto, a farmacoterapia atual ainda apresenta falhas no alívio dos episódios de dor durante as crises e, muitas vezes, não evita a progressão da doença para a destruição dos tecidos cartilaginoso e ósseo. Vitaminas do complexo B, como a nicotinamida e o ácido nicotínico, bem como o nicorandil se inserem em um contexto de investigação de novas funções para fármacos já existentes, que apresenta vantagens do ponto de vista da segurança e investimentos. O interesse na avaliação da atividade do ácido nicotínico, da nicotinamida e do nicorandil em modelos de inflamação articular deriva da constatação da ausência de estudos que investigaram este aspecto, da evidência da atividade desses fármacos em outros modelos de dor e inflamação, do bom perfil de segurança desses fármacos e também da necessidade ainda evidente da identificação de novas alternativas farmacoterapêuticas para pacientes com AR, AO e AG.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar as atividades do ácido nicotínico, da nicotinamida e do nicorandil em modelos experimentais de inflamação articular.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos induzidos pelos tratamentos com ácido nicotínico, nicotinamida ou nicorandil sobre a alodínia mecânica e o edema em modelos experimentais de inflamação articular induzidos por diferentes estímulos.
2. Avaliar os mecanismos envolvidos nas atividades dos compostos em investigação, principalmente os efeitos sobre o recrutamento celular, a produção de citocinas e quimiocinas e a ativação de mecanismos opioides.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados machos de camundongos da linhagem Swiss (25 – 30 g) e fêmeas de ratos da linhagem Holtzman (140 – 170 g). Os animais experimentais foram fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia e pelo Biotério Central, ambos da UFMG. Ração e água foram fornecidas *ad libitum*. A temperatura da sala de experimentação foi mantida em 27 ± 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 – Protocolo 179/2013).

4.2 Drogas e reagentes

- Nicotinamida (Sigma, EUA) – Composto da vitamina B₃.
- Ácido nicotínico (Sigma, EUA) – Composto da vitamina B₃.
- Nicorandil – Nitrato de 2-nicotinamidoetil (sintetizado pelo Prof. Ângelo de Fátima, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFMG) – Fármaco antianginoso.
- CFA - Adjuvante completo de Freund (Sigma, EUA) – Suspensão contendo *Mycobacterium tuberculosis* (1 mg/mL) inatividade por calor e emulsificada em óleo mineral – Indutor de inflamação articular
- Zimozano (Sigma, EUA) – Indutor de inflamação articular.
- Ácido úrico (Sigma, EUA) – Composto usado para produção de cristais de urato monossódico (MSU), indutor de inflamação articular.
- Naltrexona (Sigma, EUA) – Antagonista de receptores opioides.

- Solução fisiológica (Sanobiol, Brasil), carboximetilcelulose (CMC; Galena, Brasil) – Veículos.
- Heparina 5000 UI/mL (Blau, Brasil) – Anticoagulante.
- Kits comerciais de ELISA para quantificação de TNF- α e IL-6 de ratos (R&D Systems, EUA).
- Kits comerciais de ELISA para quantificação de TNF- α , IL-1 β e CXCL-1 de camundongos (R&D Systems, EUA).
- Cloretos de sódio (Synth, Brasil) e de potássio (Synth, Brasil) – Reagente para soluções de ELISA e solução extração de citocinas.
- Fosfatos de sódio (Vetec, Brasil) e potássio (Synth, Brasil) monobásicos – Reagentes para soluções de ELISA.
- Tween 20 (Sigma, EUA) – Reagente para o tampão de lavagem e solução extração de citocinas.
- Albumina de soro bovina (BSA; Sigma, EUA) – Proteína usada para preparo do tampão de bloqueio e da solução diluente das amostras nos ensaios por ELISA.
- Ortofenilenodiamina (OPD; Sigma, EUA) – Reagente para soluções de ELISA.
- Peróxido de hidrogênio (Synth, Brasil) – Reagente para soluções de ELISA.
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA; Sigma, EUA) – Reagente para preparo de solução de extração de citocinas.
- Aprotinina (Sigma, EUA) – Inibidor de protease utilizado no preparo de solução de extração de citocinas.
- Cloreto de benzalcônio (Sigma, EUA) – Reagente para preparo de solução de extração de citocinas.
- Fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF; Sigma, EUA) – Reagente para preparo de solução de extração de citocinas.

4.3 Preparo das soluções e suspensões

Ácido nicotínico, nicotinamida e nicorandil foram suspensos em solução de CMC 1%. Zimozano e MSU foram suspensos em solução salina estéril. A solução de naltrexona foi preparada em solução salina estéril. Todas as soluções e suspensões foram preparadas imediatamente antes das administrações.

As soluções utilizadas para os ensaios por ELISA estão descritas a seguir:

- **Solução tampão fosfato (PBS):**

Reagentes: 12 g de NaCl; 0,302 g de KCl; 1,725 g de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4); 0,306 g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4). Os reagentes foram dissolvidos em 1500 ml de água destilada e o pH foi ajustado para 7,4.

- **Solução tampão de lavagem:**

Reagente: tween 20 0,1% em tampão fosfato salino (PBS).

- **Solução tampão de bloqueio (BSA 1%):**

Reagente: 200 mg de BSA dissolvidos em 20 ml de PBS.

- **Solução diluente das amostras (BSA 0,1%):**

Reagente: 40 mg de BSA dissolvidos em 40 ml de PBS.

- **Solução tampão citrato:**

Reagentes: 13,41 g de NaH_2PO_4 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_2O_2 30%. Os reagentes foram dissolvidos em 10 ml de solução tampão citrato.

- **Solução STOP:**

Reagente: ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 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 ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$). Os reagentes foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada.

- **Solução para extração de citocinas:**

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

4.4 Avaliação da alodínia mecânica

Os animais foram colocados em compartimentos de acrílico (22 x 18 x 14 cm) dispostos sobre um suporte que possui como base uma tela metálica. A alodínia mecânica foi avaliada por meio de um analgesímetro digital (Insight Ltda, Ribeirão Preto, Brasil; **Figura 8a**), o qual permite determinar o limiar nociceptivo de retirada da pata, cujo resultado é expresso em gramas (g). Uma ponteira de polietileno acoplada a um transdutor de força (escala de 0,1 a 1000 g – ou 0,1 a 10 N) foi pressionada no centro da superfície plantar da pata posterior direita de cada animal. Um gradiente crescente de pressão, controlado por um experimentador treinado, foi realizado até que o animal retirasse a pata e esse limiar de retirada foi registrado pelo aparelho automaticamente (**Figura 8b**). Foram realizadas cinco leituras por animal para cada momento de avaliação, os valores extremos foram excluídos e a média foi calculada com os três valores intermediários. No dia anterior ao início de cada protocolo experimental, o limiar nociceptivo basal e a massa corporal de cada animal foram determinados. A divisão dos animais nos grupos experimentais foi feita de forma que as médias do limiar nociceptivo e da massa corporal dos diferentes grupos fossem estatisticamente semelhantes. Para os protocolos cujos tratamentos farmacológicos

foram realizados ou iniciados no 12º dia, o limiar nociceptivo basal foi novamente determinado, após a sensibilização dos animais pelo CFA, sendo este o utilizado para a divisão dos grupos experimentais.

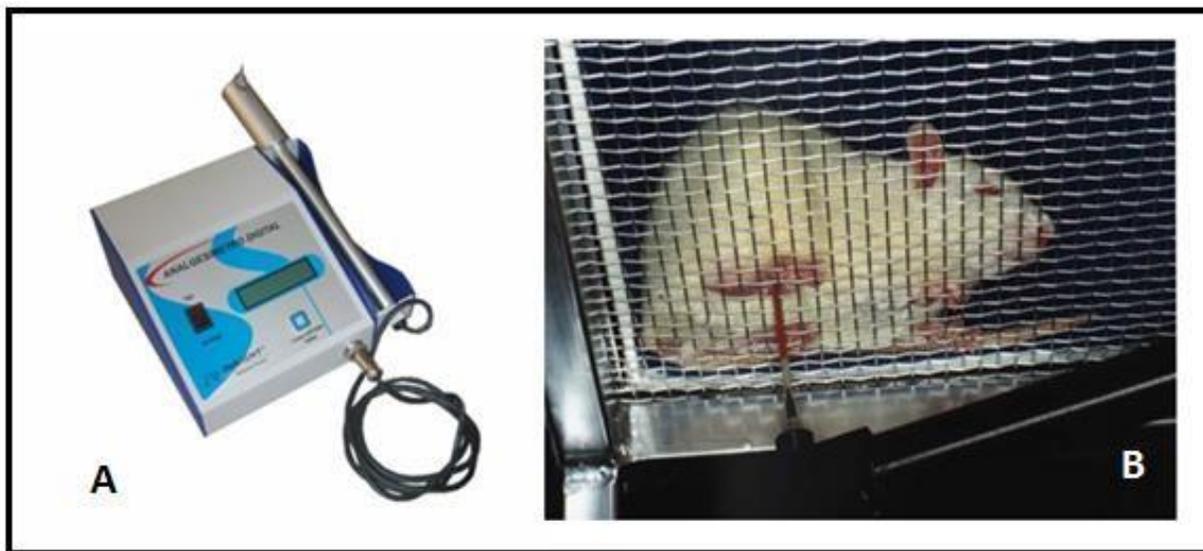


Figura 8 – Analgesímetro digital utilizado para avaliação da alodínia mecânica (a); aparato e forma da avaliação da alodínia em ratos (b).

4.5 Avaliação do edema de pata

A avaliação do volume de pata foi realizada com uso de um pletismômetro (Modelo 7140, Ugo Basile, Itália; **Figura 9**). Esse aparelho contém uma célula cilíndrica para a medida do volume de pata, preenchida com uma solução de baixa concentração eletrolítica, conectada a outra célula, dentro da qual existe um eletrodo. Um sistema de vasos comunicantes faz com que o deslocamento da solução eletrolítica na célula na qual a pata do animal é mergulhada resulte em um deslocamento da solução na célula que contém o eletrodo. Após ter sido calibrado, o aparelho converte o deslocamento do líquido em volume, que é indicado em um visor digital. Quando a pata do animal é introduzida na célula de medida até a articulação tíbio-tarsal, um pedal é pressionado pelo experimentador, que fixa, dessa forma, o valor do volume observado.



Figura 9 – Aparato utilizado para avaliar edema de pata em ratos.

4.6 Avaliação do diâmetro articular

Para avaliação do diâmetro articular dos camundongos nos protocolos de inflamação articular induzida por CFA, zimozano ou MSU, foi utilizado um paquímetro digital (Mitutoyo, modelo 200 mm, resolução 0,01 mm, escala Absolute; **Figura 10**). A medida é feita com o animal imobilizado manualmente e o diâmetro é medido com leve extensão da articulação do joelho esquerdo, que recebeu a injeção intra-articular do estímulo inflamatório ou controle.

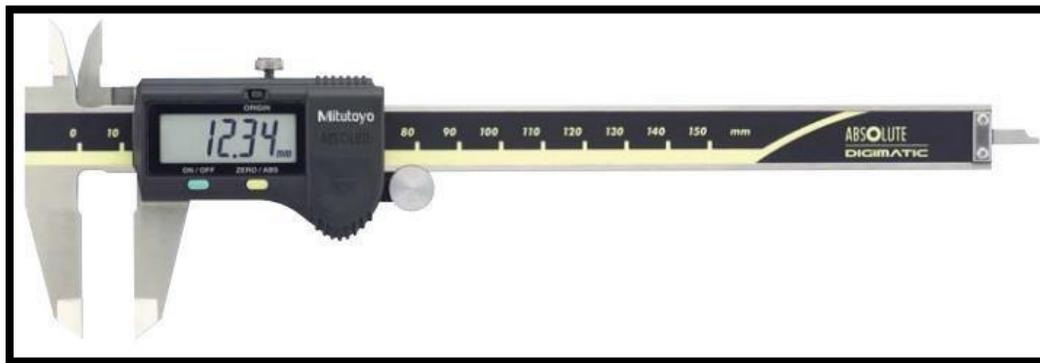


Figura 10 – Paquímetro digital utilizado para medida do diâmetro articular.

4.7 Modelos experimentais

4.7.1 Modelo experimental de inflamação articular induzida por CFA em ratos

A inflamação em ratos foi induzida por meio de três injeções i.d. de CFA (1 mg/mL) em sítios distintos nos dois primeiros dias de cada protocolo experimental (**Figura 11**). No primeiro dia, a injeção de CFA foi por via i.d. na base da cauda (100 μ L) e na pata posterior direita (100 μ L). No segundo dia, houve um reforço, com nova injeção de i.d. de CFA somente na base da cauda (100 μ L). Os animais foram acompanhados por 21 dias após a primeira injeção de CFA (BAUEROVA et al., 2010). As avaliações da alodínia mecânica e do edema de pata ocorreram a cada três dias.



Figura 11 – Indução de inflamação por meio de injeção de CFA (1 mg/mL) na pata e na base da cauda de ratos.

4.7.2 Modelo experimental de inflamação articular induzida por zimosano em camundongos

A indução de inflamação articular em camundongos machos seguiu o método descrito por Guerrero e colaboradores (2006), que consistiu na injeção intra-articular (i.a.) no joelho esquerdo de zimosano (50 μg em 10 μL de solução salina estéril), utilizando uma agulha adaptada (**Figura 12**). A injeção foi feita em animais anestesiados com solução contendo cetamina (80 mg/Kg) e xilazina (8 mg/Kg), por via intraperitoneal (i.p.). O protocolo de padronização teve duração de 96 h, ocorrendo avaliações da alodínia mecânica e do edema articular imediatamente antes e 3, 6, 24, 48, 72 e 96 h após a indução da inflamação.

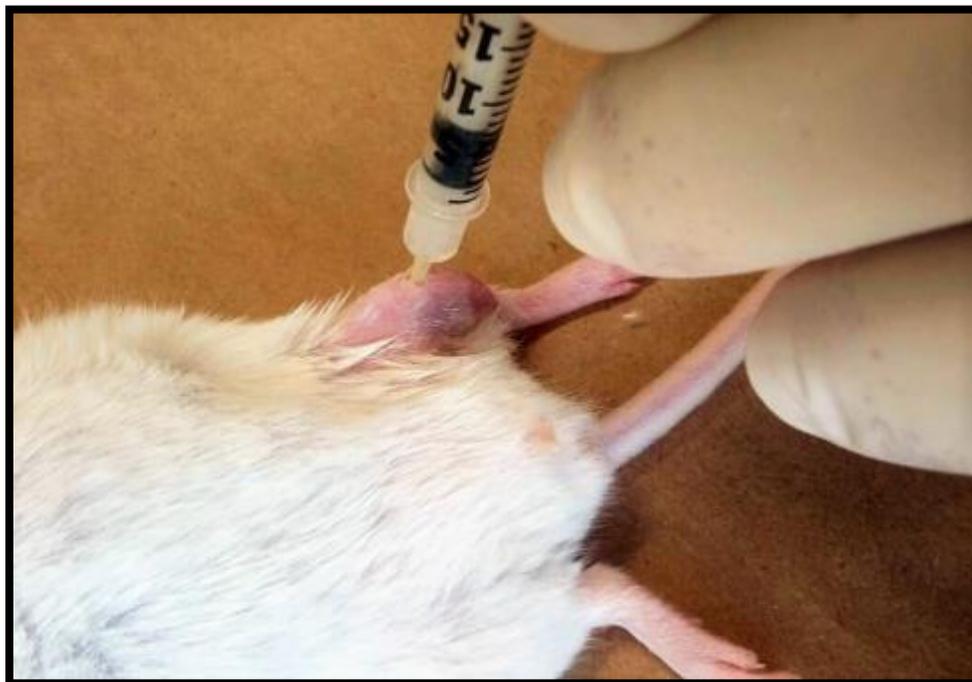


Figura 12 – Indução de inflamação articular por meio de injeção i.a. de zimozano, CFA ou MSU.

4.7.3 Modelo experimental de inflamação articular induzida por CFA em camundongos

A indução de inflamação articular em camundongos machos seguiu o método descrito por Lopes e colaboradores (2016), que consistiu na injeção i.a. no joelho esquerdo de CFA (100 μg em 10 μL em solução salina estéril), utilizando uma agulha adaptada (**Figura 12**). A injeção foi feita 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 da alodínia mecânica e do edema articular imediatamente antes e 3, 6, 24, 48, 72, 96 e 168 h após a indução da inflamação.

4.7.4 Modelo experimental de inflamação articular induzida por MSU em camundongos

A indução de inflamação articular em camundongos machos seguiu o método descrito por Amaral e colaboradores (2016), Vieira e colaboradores (2015) e Torres e

colaboradores (2009), que consistiu na administração i.a. no joelho esquerdo de MSU (100 µg em 10 µL de solução salina estéril), utilizando uma agulha adaptada (**Figura 12**). Os cristais de MSU foram previamente preparados conforme descrito na literatura (AMARAL et al., 2016). Brevemente, 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 MSU 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 MSU injetado, quantidade de endotoxina inferior a 5 pg). A injeção foi feita em animais levemente anestesiados com a mistura de cetamina e xilazina, na proporção de 2:1. O protocolo de padronização teve duração de 96 h, ocorrendo avaliações da alodínia mecânica e do diâmetro articular imediatamente antes e 3, 6, 24, 48 e 72 h após a indução da inflamação.

4.8 Protocolos experimentais

4.8.1 Padronização do modelo de inflamação induzida por CFA em ratos

Para padronização do modelo experimental utilizando ratos, CFA ou solução salina (n= 6) foram injetados na base da cauda e na pata posterior direita dos animais nos dias 0 e 1 do protocolo experimental (Figura 13). As avaliações do limiar nociceptivo e do volume de pata ocorreram a cada três dias, até o 21^o dia.

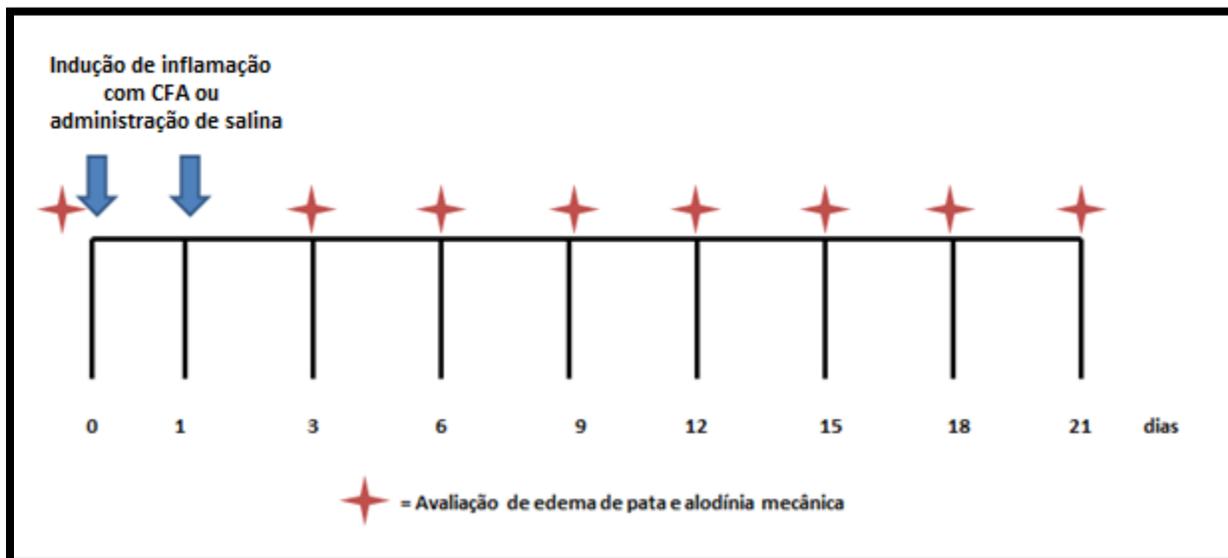


Figura 13 – Escala temporal da avaliação do edema de pata e da alodínia mecânica induzidos por CFA em ratos.

4.8.2 Padronização do modelo de inflamação articular em camundongos

Para padronização dos modelos experimentais de inflamação articular induzida por zimozano, CFA ou MSU em camundongos, esses estímulos inflamatórios ou solução salina (n= 8-10) foram administrados (i.a.) no joelho esquerdo (Figura 14). As avaliações do limiar nociceptivo e do volume de pata ocorreram nos tempos previamente estabelecidos.

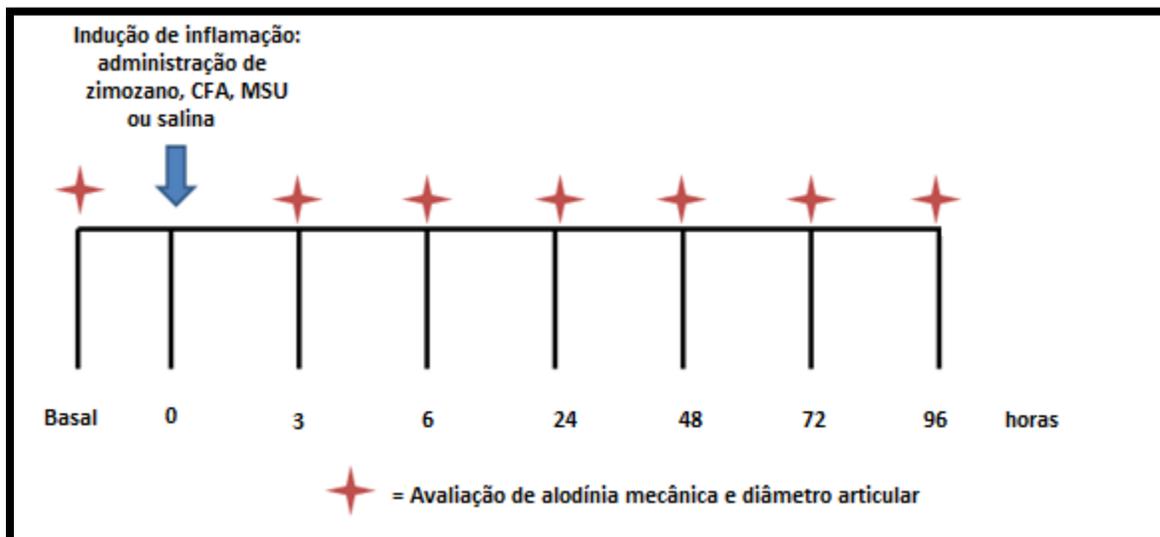


Figura 14 – Escala temporal da avaliação do edema de pata e da alodínia mecânica induzidos por zimozano, CFA ou MSU em camundongos.

4.8.3 Efeitos induzidos por nicotinamida e ácido nicotínico em modelo experimental de inflamação induzida por CFA em ratos

Nicotinamida ou ácido nicotínico (doses entre 75 a 1000 mg/Kg) foram administrados *per os* (p.o.) aos animais (n=6), duas vezes ao dia, a partir do dia 1 do protocolo experimental, correspondente ao segundo dia da indução da inflamação. Ao longo do período experimental, a primeira dose foi administrada entre 8 e 9 h e a segunda dose entre 16 e 17 h. O edema de pata e a alodínia mecânica foram avaliados a cada três dias, até o 21º dia, sempre 1 h após a primeira administração do dia. Nesses protocolos, as doses iniciais de ácido nicotínico foram estabelecidas entre 250 a 1000 mg/kg, mas reduzidas para 75 – 250 mg/kg devido à mortalidade dos animais tratados com doses mais elevadas. Os protocolos com nicotinamida foram iniciados com doses entre 75 – 250 mg/Kg, com justificativa dos efeitos induzidos previamente pelo ácido nicotínico. As doses de nicotinamida foram aumentadas até 1000 mg/Kg nos protocolos subsequentes, tendo em vista o melhor perfil de segurança desse composto.

Em outro protocolo, nicotinamida foi administrada duas vezes por dia a partir do 12º dia do protocolo experimental, mantendo-se a avaliação a cada três dias até o 21º dia.

4.8.4 Efeitos induzidos por dose única de nicotinamida ou nicorandil em modelo experimental de inflamação induzida por CFA em ratos

Nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/Kg) ou nicorandil (50, 100 ou 200 mg/Kg) foram administrados *p.o.* aos animais (n=6) no 12^o após as injeções de CFA. Edema de pata e alodínia mecânica foram avaliados 1, 3 e 5 h após o tratamento.

4.8.5 Efeitos induzidos por ácido nicotínico, nicotinamida ou nicorandil em modelos experimentais de inflamação articular induzida por zimozano, CFA ou MSU em camundongos

Os compostos foram administrados *p.o.* 1 h antes da indução da inflamação articular (tratamento denominado “PRE”) ou 1 h antes e 2 h após a indução da inflamação articular (tratamento denominado “PRÉ+PÓS”). Inicialmente, foram realizados apenas os pré-tratamentos para os três compostos, sendo que aqueles que não apresentaram atividade antialodínica ou antiedema com esse esquema de tratamento foram avaliados em um esquema de pré+pós-tratamentos. Os resultados obtidos nos modelos de inflamação induzida por zimozano e CFA foram considerados para definir os protocolos experimentais no modelo de inflamação articular induzida por MSU. Nesse modelo, o esquema de tratamento com nicorandil foi PRE e os esquemas de tratamento com ácido nicotínico e nicotinamida foram apenas PRÉ+PÓS. O quadro a seguir sumariza os esquemas de tratamento.

Quadro 1 – Esquemas de tratamento com ácido nicotínico, nicotinamida ou nicorandil nos diferentes modelos experimentais de inflamação articular em camundongos.

<u>MODELO EXPERIMENTAL</u>	<u>ESQUEMAS DE TRATAMENTO</u>
<u>ZIMOZANO</u>	
Ácido nicotínico	PRÉ e PRÉ+PÓS
Nicotinamida	PRÉ e PRÉ+PÓS
Nicorandil	PRÉ
<u>CFA</u>	
Ácido nicotínico	PRÉ e PRÉ+PÓS
Nicotinamida	PRÉ
Nicorandil	PRÉ
<u>MSU</u>	
Ácido nicotínico	PRÉ+PÓS
Nicotinamida	PRÉ+PÓS
Nicorandil	PRÉ

No modelo de inflamação articular induzida por zimozano, ainda foi investigado a participação de receptores opioides por meio da administração naltrexona (5 ou 10 mg/Kg, i.p., 1,5 h antes da injeção i.a. de zimozano) sobre a atividade antialodínica do nicorandil, substância que apresentou melhor atividade na redução da alodínia mecânica em todos os protocolos avaliados. A escolha deste modelo se deveu ao perfil de resposta do fármaco nos três modelos i.a., sendo o de zimozano aquele no qual o nicorandil apresentou melhor atividade.

4.9 Quantificação de citocinas

A definição das citocinas a serem quantificadas em cada modelo e o momento de coleta das amostras foram determinados com base nos resultados de alodínia mecânica e edema. Desse modo, foram escolhidos:

- Modelo de artrite induzida por CFA em ratas Holtzman - Coleta de sangue total e tecido de pata no 14^o dia após a primeira injeção de CFA dos animais tratados com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/Kg, 2x/dia, p.o.) ou veículo. As citocinas quantificadas foram TNF- α e IL-6.

- Modelo de inflamação articular induzida por zimozano, CFA ou MSU, i.a., em camundongos Swiss – Coleta de tecido periarticular 6 h após a injeção i.a. do respectivo estímulo inflamatório. A quantificação de citocinas ocorreu somente se houvesse diferença na contagem total de células no lavado articular. As citocinas quantificadas foram TNF- α e CXCL-1 no modelo de inflamação induzida por zimozano e IL-1 β e CXCL-1 no modelo de inflamação induzida por MSU.

4.9.1 Coleta e preparo das amostras

Para determinar a concentração das citocinas TNF- α , IL-6, IL-1 β ou CXCL-1, foram coletadas amostras de sangue total obtidas da artéria abdominal, em tubos contendo heparina e amostras do tecido da pata em ratos ou tecido periarticular do joelho esquerdo em camundongos. As amostras de sangue foram centrifugadas (3000 rpm, 15 min a 4^o C) e o plasma foi coletado. Os materiais coletados foram estocados a -70^o C até o dia da análise. O tecido das patas ou 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^o C). O sedimento do homogeneizado foi usado para a determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

4.9.2 Concentrações de TNF- α , IL-6 IL-1 β e CXCL-1.

Os sobrenadantes resultantes da homogeneização e da centrifugação das amostras foram recolhidos e armazenados no freezer -70 °C. Para o modelo utilizando ratos, a quantificação inicial foi feita em tecido da pata. A quantificação em sangue total também foi feita quando houve aumento das concentrações no tecido da pata. Para os modelos utilizando camundongos, a quantificação foi realizada diretamente no tecido periarticular. As concentrações de TNF- α , IL-6, IL-1 β 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 100 μ l desse anticorpo em cada poço. A placa foi mantida na geladeira (4 °C) durante 12 h.

Após esse período, a placa foi lavada com tampão de lavagem e bloqueada com tampão de bloqueio (BSA 1%). Após 1 h, a placa foi lavada novamente e foram adicionados 100 μ l do TNF- α , IL-6, IL-1 β ou CXCL-1 (duplicata), em diluição seriada, correspondentes à curva-padrão, nas duas primeiras colunas da placa. Nos outros poços, foram adicionados 100 μ l dos sobrenadantes diluídos (1:3) em BSA 0,1% e nos últimos dois poços, foram adicionados 100 μ l de PBS (branco). A placa foi mantida na geladeira (4 °C) durante 12 h.

Em seguida, a placa foi lavada e foram adicionados 100 μ 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 100 μ l do revelador estreptavidina em cada poço e, durante 20 min, a placa foi mantida novamente no agitador. Por último, foram adicionados 100 μ 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 50 μ l de H₂SO₄. A leitura foi feita no leitor de ELISA, usando comprimento de onda de 490 nm. Os resultados foram expressos em quantidade da respectiva citocina presente no tecido (pg/mg de tecido para ratos e pg/100 mg de tecido para camundongos) ou plasma (pg/mL de plasma).

4.9.3 Atividade da MPO

Ao sedimento resultante, foi adicionado 750 µl de solução de NaCl 0,2% gelado para cada 50 mg de tecido, 30 segundos. 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. Em seguida, 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 H₂O₂ em cada poço e a placa foi incubada novamente a 37 °C por 5 min. Para finalizar, foram adicionados 100 µl de H₂SO₄ em cada poço. A atividade da MPO foi calculada de acordo com a alteração da densidade óptica (D.O.), avaliada em leitor de ELISA, usando comprimento de onda de 450 nm.

4.10 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 feita em 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 em 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

por um experimentador treinado. 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 6 h com base nos perfis temporal e pico de resposta dos modelos experimentais, e nos efeitos induzidos por nicotinamida e nicorandil nas avaliações de alodínia mecânica e edema articular.

4.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism® (versão 5.0), por meio da análise de variância simples de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls, que realiza a comparação de todos os grupos entre si, ou teste t quando a comparação foi feita para dois grupos experimentais. Adotou-se nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

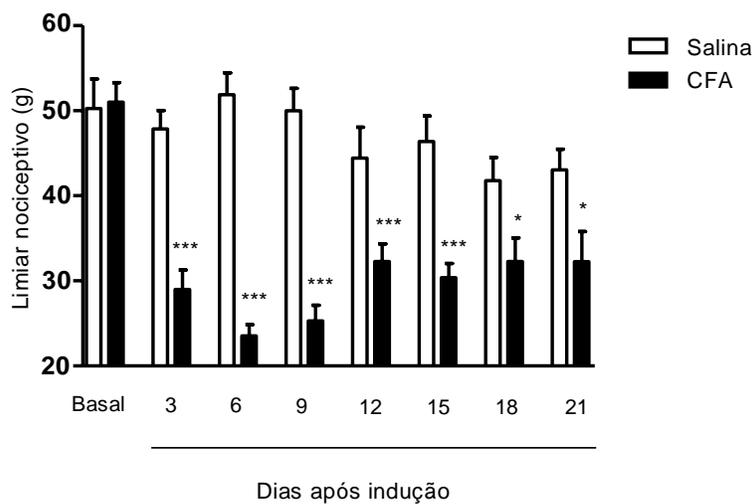
5.1 Caracterização das atividades do ácido nicotínico, da nicotinamida e do nicorandil em modelos de inflamação articular

Todos os modelos experimentais selecionados para o presente estudo – inflamação articular induzida por CFA em ratos e inflamação articular induzida por zimozano, CFA ou MSU em camundongos – foram padronizados durante o desenvolvimento deste estudo. As respostas observadas nos protocolos iniciais de padronização foram consideradas para definir os protocolos subsequentes nos quais foram avaliados os efeitos induzidos pelos compostos em investigação sobre a alodínia mecânica e o edema de pata ou o edema articular.

5.1.1 Artrite induzida por CFA em ratos

As injeções de CFA induziram redução do limiar nociceptivo e aumento significativo do volume da pata durante todo o período de observação. O grupo controle, que recebeu injeções de solução salina estéril, apresentou alterações não significativas, do volume da pata e da sensibilidade ao estímulo mecânico durante os 21 dias de observação (**Figura 15**). Ao longo do período de observação e avaliação, os animais que receberam CFA desenvolveram edema e eritema facilmente visualizados na pata posterior direita (**Figura 16**).

(a)



(b)

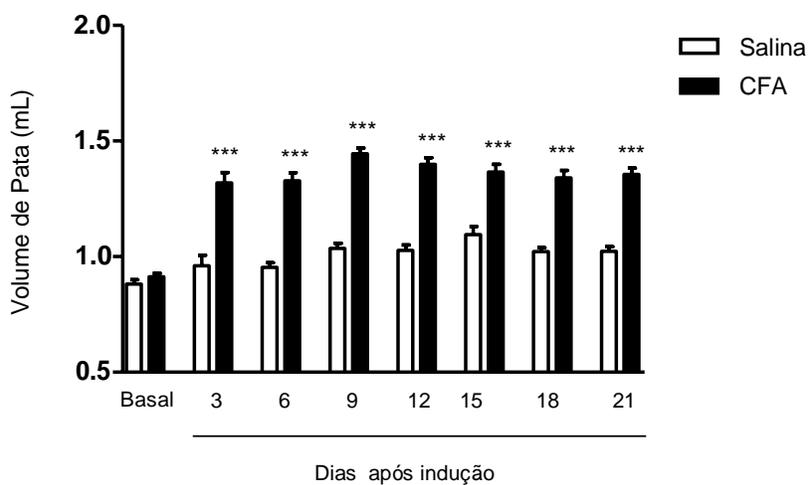


Figura 15 – Limiar nociceptivo (a) e volume da pata (b) em ratos após administração i.d. de salina ou CFA (100 μ L por injeção; 1 mg/mL) na pata posterior direita e na base da cauda. * e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente. $n = 6$.

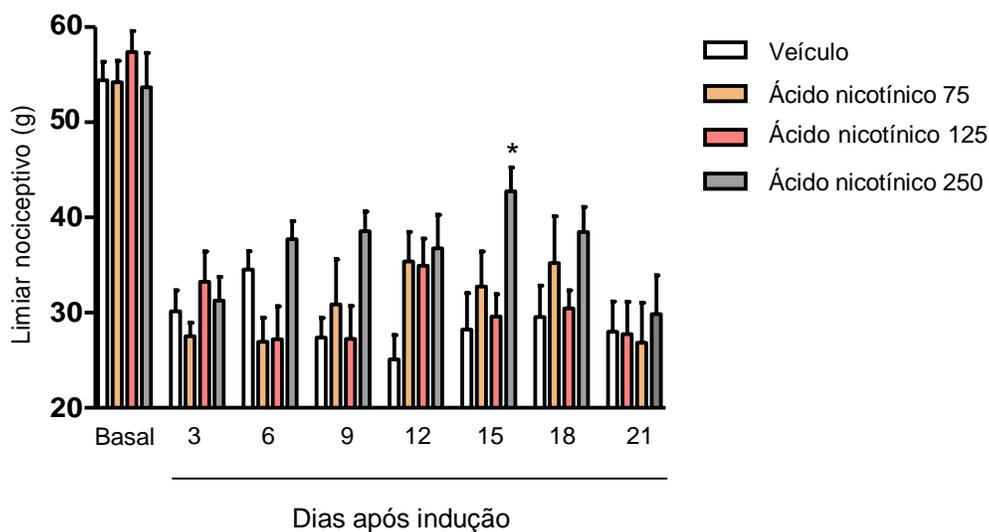


Figura 16 – Edema e eritema na pata posterior ipsilateral observados 21 dias após as injeções de CFA.

5.1.2 Efeitos induzidos pelo ácido nicotínico sobre alodínia mecânica e edema de pata em modelo de artrite induzida por CFA em ratos

Ácido nicotínico (250, 500 e 750 mg/Kg), em duas administrações diárias iniciadas a partir do dia seguinte à última injeção de CFA, induziu efeito antinociceptivo nos 9º e 12º dias. Não houve redução do edema de pata durante o período de avaliação (resultados não demonstrados). Entretanto, a administração repetida de doses mais elevadas de ácido nicotínico (500 e 750 mg/Kg) induziu mortalidade a partir do 6º dia de tratamento. Desse modo, optou-se pela exclusão dos grupos tratados com essas doses e início de outro protocolo no qual foram usadas doses menores (75, 125 e 250 mg/kg), também administradas duas vezes ao dia, a partir do dia seguinte à última injeção de CFA. Nesse protocolo, o ácido nicotínico (250 mg/Kg), de maneira pontual, mas significativa, evitou que o limiar nociceptivo dos animais reduzisse, no 15º dia. Não houve redução do edema de pata durante o período de avaliação (**Figura 17**).

(a)



(b)

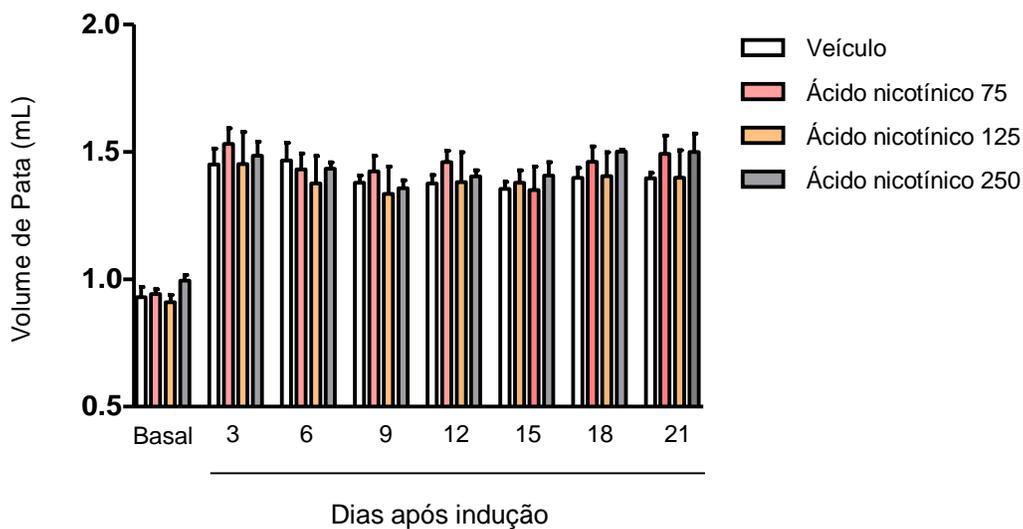
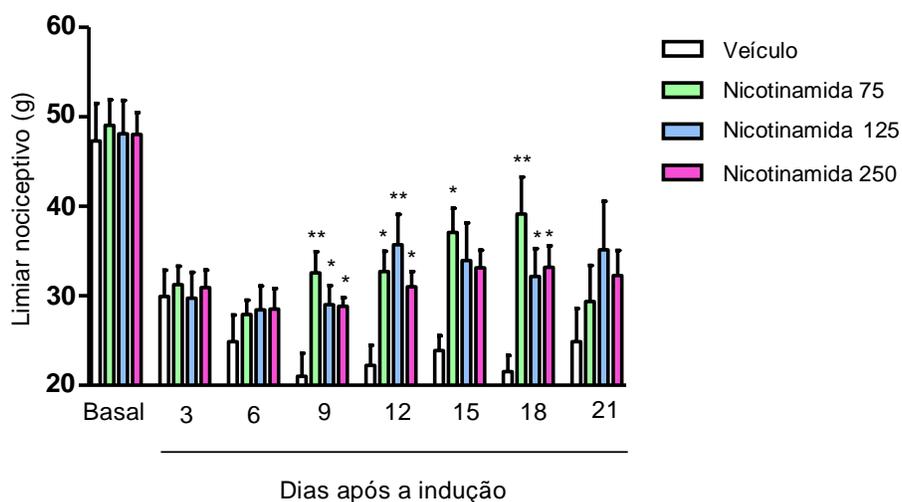


Figura 17 – Limiar nociceptivo (a) e volume de pata (b) de ratos tratados com ácido nicotínico (75, 125 ou 250 mg/kg, p.o., 2x/dia) ou veículo (CMC 1%) em modelo de artrite induzida por CFA (100 μ L por injeção; 1 mg/mL). *indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e $p < 0,05$. $n = 6$.

5.1.3 Efeitos induzidos pela nicotinamida sobre alodínia mecânica e edema de pata em modelo de artrite induzida por CFA em ratos

Nicotinamida (75, 125 e 250 mg/Kg) reduziu a alodínia mecânica entre o 9^o e 18^o dias após a indução da artrite com CFA (**Figura 18a**). Entretanto, nicotinamida não alterou o edema de pata durante o período de avaliação (**Figura 18b**).

(a)



(b)

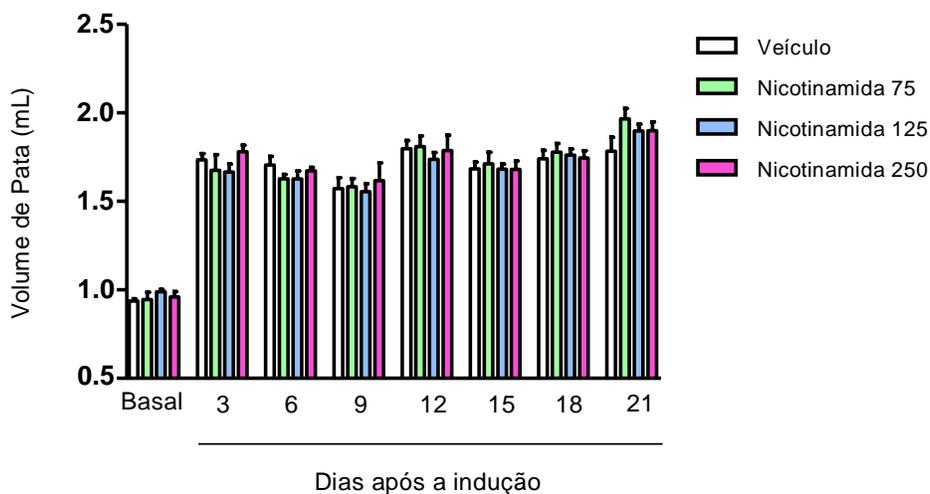
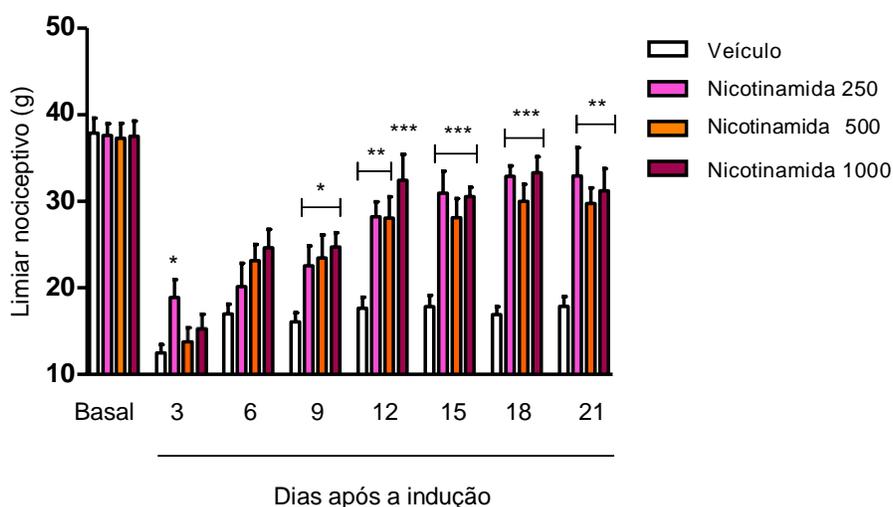


Figura 18 – Limiar nociceptivo (a) e volume de pata (b) de ratos tratados com nicotinamida (75, 125 ou 250 mg/kg, p.o., 2x/dia) ou veículo (CMC 1%) em modelo de artrite induzida por CFA (100 µL por injeção; 1 mg/mL). * e ** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente. $n = 6$.

Uma vez que a nicotinamida, ao contrário do ácido nicotínico, não induziu mortalidade, em protocolo subsequente, as doses desse composto foram elevadas para 250, 500 e 1000 mg/Kg, a fim de se avaliar se haveria aumento de magnitude do efeito antinociceptivo observado e/ou detecção de efeito antiedematogênico. De fato, doses de nicotinamida entre 250 e 1000 mg/Kg induziram efeito antinociceptivo a partir do 9º dia até o final do protocolo experimental. Entretanto, doses mais elevadas de nicotinamida não reduziram o edema induzido pela administração de CFA (**Figura 19**).

(a)



(b)

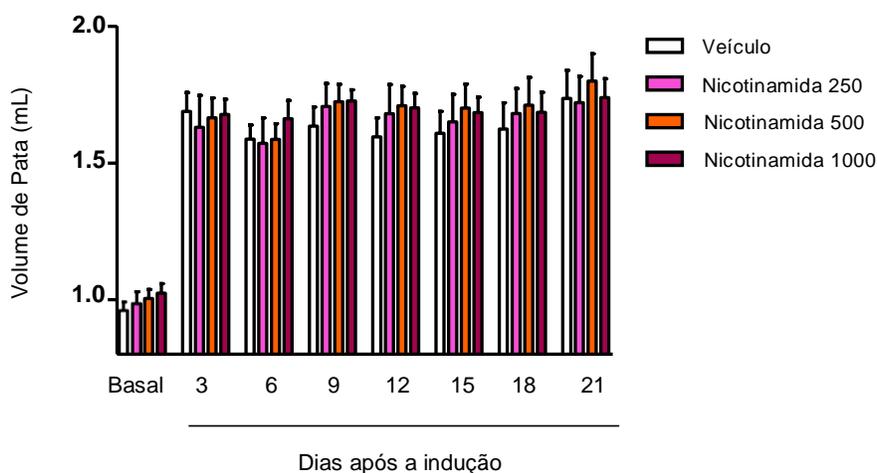
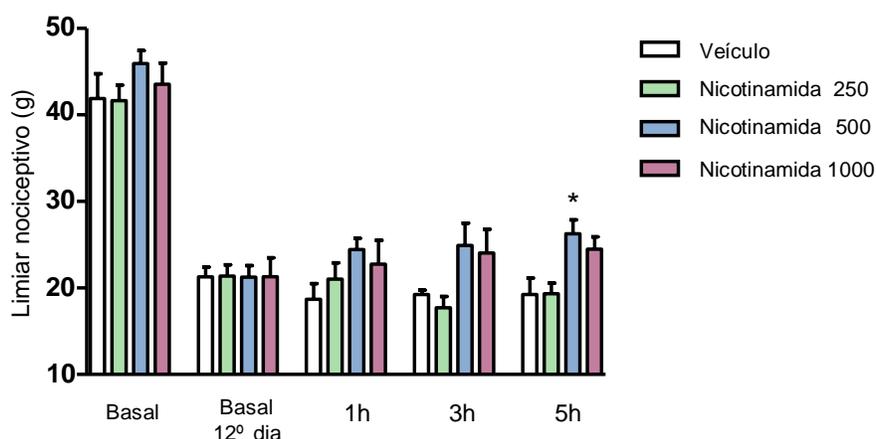


Figura 19 – Limiar nociceptivo (a) e volume de pata (b) de ratos tratados com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/kg, p.o., 2x/dia) ou veículo (CMC 0,5%) em modelo de artrite induzida por CFA (100 µL por injeção; 1 mg/mL). *, ** e * indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e p<0,05, p<0,01 e p<0,001, respectivamente. n=6.**

Em seguida, foi realizado um protocolo no qual a nicotinamida foi administrada em dose única no 12º dia, momento no qual a alodínia mecânica estava estabelecida de maneira consistente e coincidente com a observância de efeito antinociceptivo no protocolo anterior. O limiar nociceptivo e o volume de pata foram avaliados 1, 3 e 5 h após a administração da nicotinamida. Uma redução significativa da alodínia mecânica somente foi observada após 5 h da administração da dose intermediária de nicotinamida (500 mg/Kg). Não houve redução do edema de pata durante o período de avaliação (**Figura 20**).

(a)



(b)

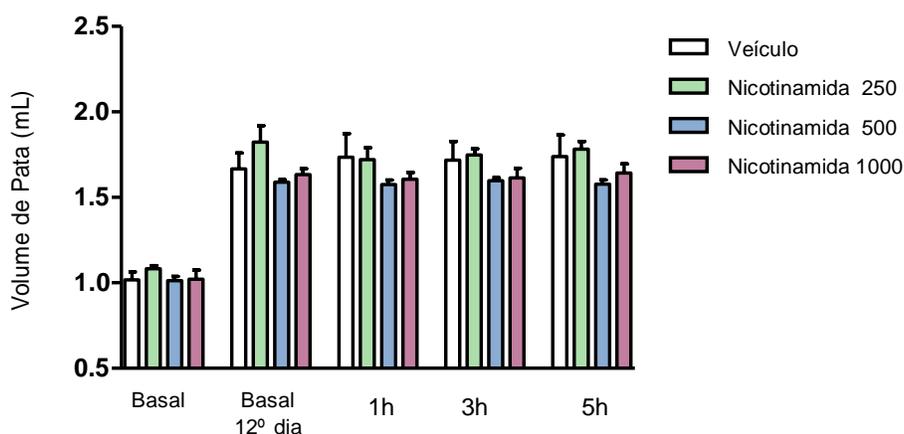


Figura 20 – Limiar nociceptivo (a) e volume de pata (b) de ratos tratados com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/kg, p.o.) ou veículo (CMC 1%) no 12º dia após as injeções de CFA e avaliados 1, 3 e 5 h após o tratamento, em modelo de artrite induzida por CFA (100 µL por injeção; 1 mg/mL). * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e $p < 0,05$. $n = 5-6$.

Apesar da ausência de efeito antinociceptivo persistente com administração única, verificou-se a possibilidade da existência desse efeito com a administração crônica, duas vezes ao dia, a partir do 12º dia, também com a finalidade de investigar o efeito induzido pela nicotinamida quando a sensibilização nociceptiva está estabelecida. A maior dose (1000 mg/kg) induziu efeito antinociceptivo no 15º de avaliação (**Figura 21**).

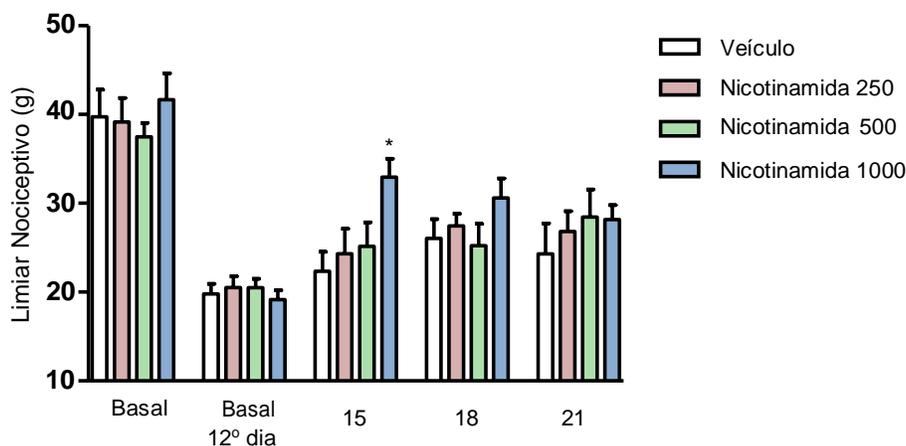
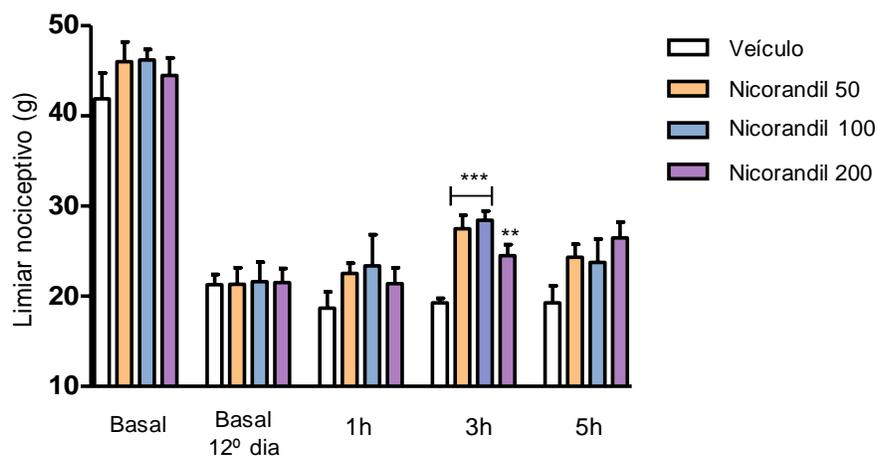


Figura 21 – Limiar nociceptivo de ratos tratados com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/kg, p.o, 2x/dia) ou veículo (CMC 1%) a partir 12º dia após as injeções de CFA (100 µL por injeção; 1 mg/mL), em modelo de artrite induzida por CFA. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e $p < 0,05$. n=5-6.

5.1.4 Efeitos induzidos pelo nicorandil sobre alodínia mecânica e edema de pata em modelo de artrite induzida por CFA em ratos

Uma vez que nicotinamida inibiu a alodínia mecânica no modelo de artrite induzida por CFA, elaborou-se um protocolo no qual o nicorandil, fármaco que apresentou maior potência em outro modelo experimental de dor nociceptiva e inflamatória (formalina; DUTRA et al., 2013), foi administrado em dose única, também no 12º dia após a indução da artrite por CFA. Assim como observado para a nicotinamida, o nicorandil não apresentou atividade antiedematogênica (**Figura 22b**). Entretanto, na 3ª hora da avaliação da alodínia mecânica foi verificado efeito antinociceptivo para todas as três doses do fármaco, mesmo com única administração (**Figura 22a**).

(a)



(b)

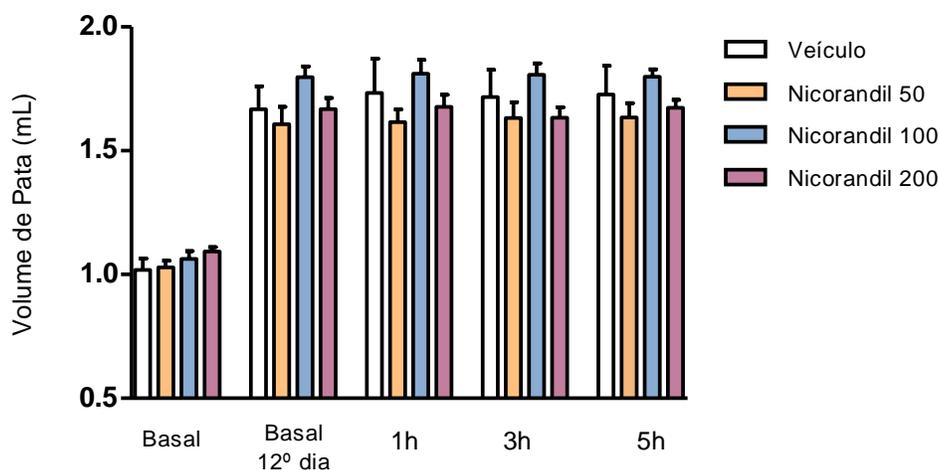


Figura 22 – Limiar nociceptivo (a) e volume de pata (b) de ratos tratados com nicorandil (50, 100 ou 200 mg/kg, p.o.) ou veículo (CMC 1%) no 12º dia após as injeções de CFA (100 µL por injeção; 1 mg/mL) e avaliados 1, 3 e 5h após o tratamento, em modelo de artrite induzida por CFA. ** e * indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. $n = 5-6$.**

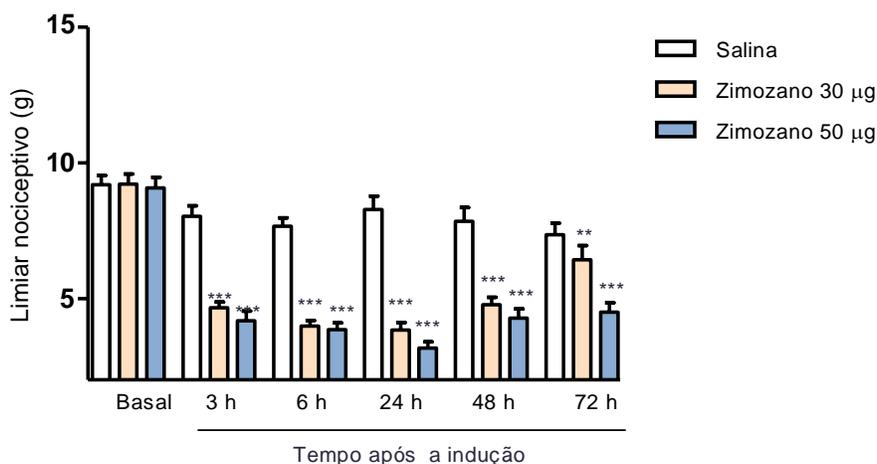
Os resultados encontrados para a nicotinamida e, principalmente, para o nicorandil, estimularam investigações adicionais sobre as atividades desses compostos e sobre os mecanismos envolvidos. No entanto, as longas durações dos protocolos de inflamação articular induzida por CFA em ratos e a disponibilidade reduzida de nicorandil, justamente o composto com maior atividade, limitaram investigações adicionais com

esse modelo. Assim, modelos de inflamação articular induzida pela injeção i.a. de CFA, zimosano e MSU em camundongos foram selecionados, pois permitiram investigações mais amplas das atividades do ácido nicotínico, da nicotinamida e do nicorandil utilizando quantidades menores desses compostos e em protocolos menos laboriosos.

5.1.5 Inflamação articular induzida por injeção i.a. de zimosano em camundongos

A injeção i.a. de zimosano induziu alodínia mecânica e edema articular durante todo o período de observação – até a 72^a hora. O grupo controle, que recebeu injeções de solução salina estéril, apresentou mínimas alterações, não significativas, do diâmetro da articulação do joelho e da sensibilidade ao estímulo mecânico durante os três dias de observação (**Figura 23**).

(a)



(b)

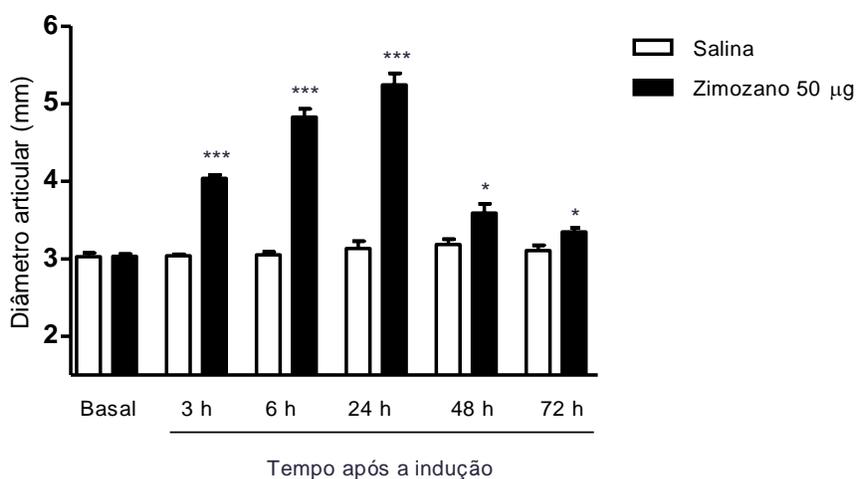


Figura 23 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) em camundongos, após administração i.a. de salina ou zimozano (30 ou 50 µg em injeção de 10 µL). *, ** e * indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. $n = 8-9$.**

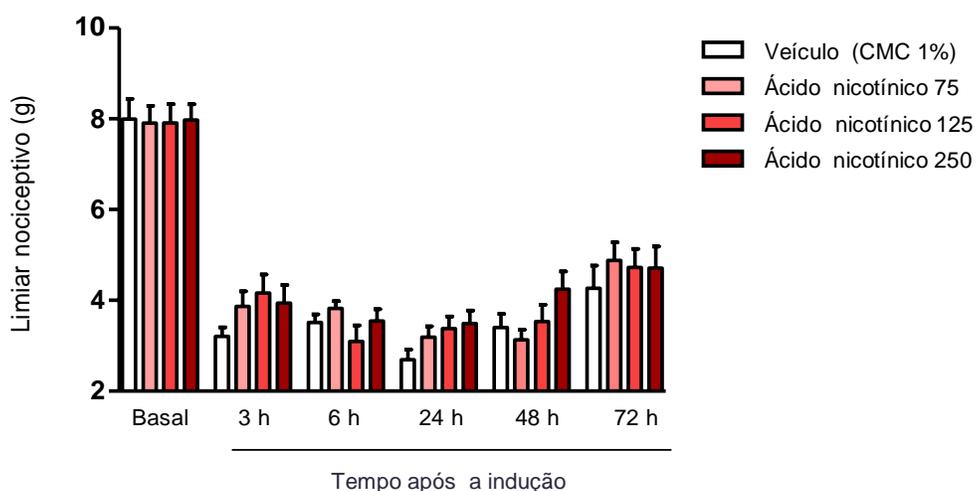
5.1.6 Efeitos induzidos por ácido nicotínico, nicotinamida e nicorandil em modelo de artrite induzido por zimozano

Inicialmente, o ácido nicotínico (75, 125 ou 250 mg/Kg), a nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/Kg) ou o nicorandil (50, 100 ou 200 mg/Kg), foram administrados p.o. 1 h antes da indução de inflamação articular induzida por zimozano. Em protocolo

subsequente, o ácido nicotínico e a nicotinamida foram administrados previamente (1 h) e posteriormente (2 h) à injeção i.a. de zimozano.

Ácido nicotínico reduziu o edema articular com os dois esquemas de tratamento, de maneira mais tardia, na 24^a e 48^a hora, para as três doses avaliadas (**Figuras 24b e 25b**). Entretanto, não induziu efeito antinociceptivo (**Figuras 24a e 25a**).

(a)



(b)

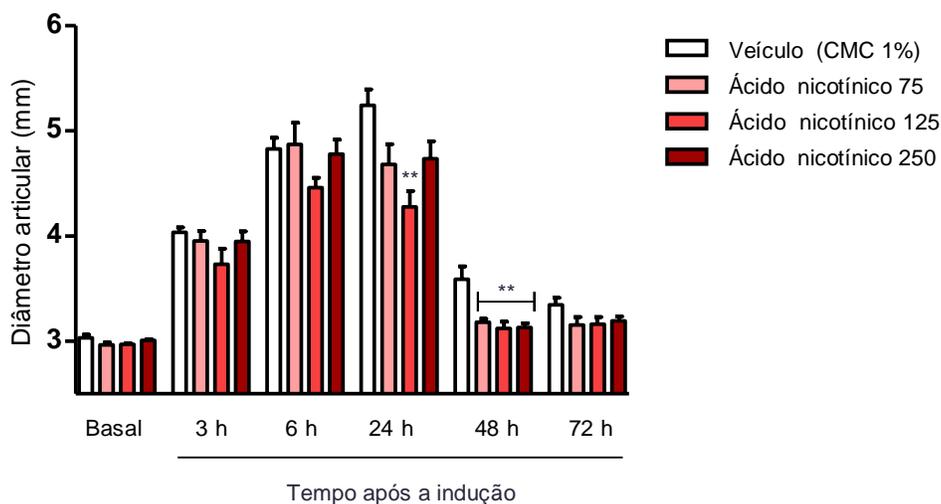
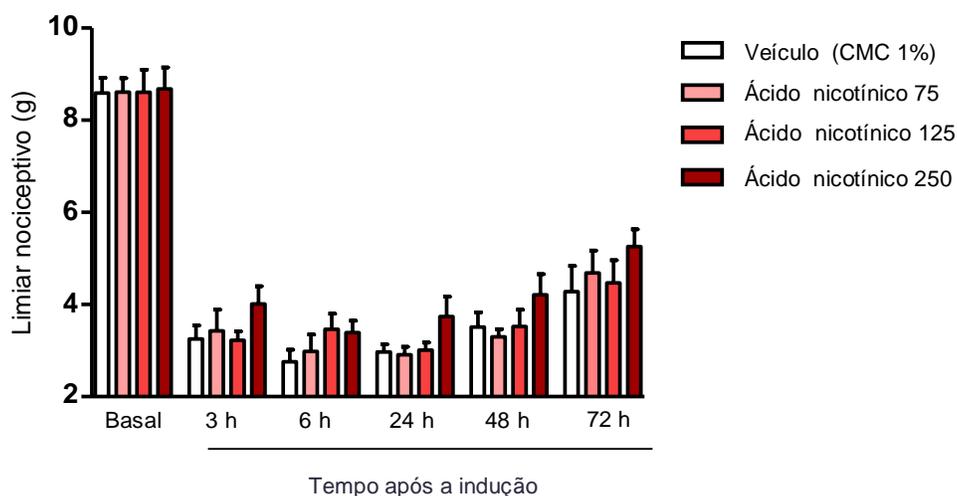


Figura 24 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com ácido nicotínico (75, 125 ou 250 mg/kg, p.o., -1 h), após administração i.a. de zimozano (50 µg em injeção de 10 µL). ** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e $p < 0,01$. n=8-9.

(a)



(b)

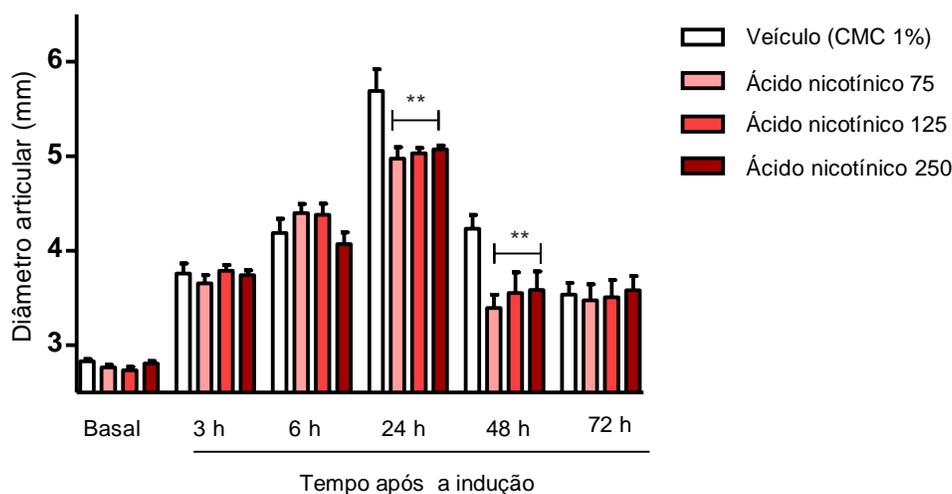
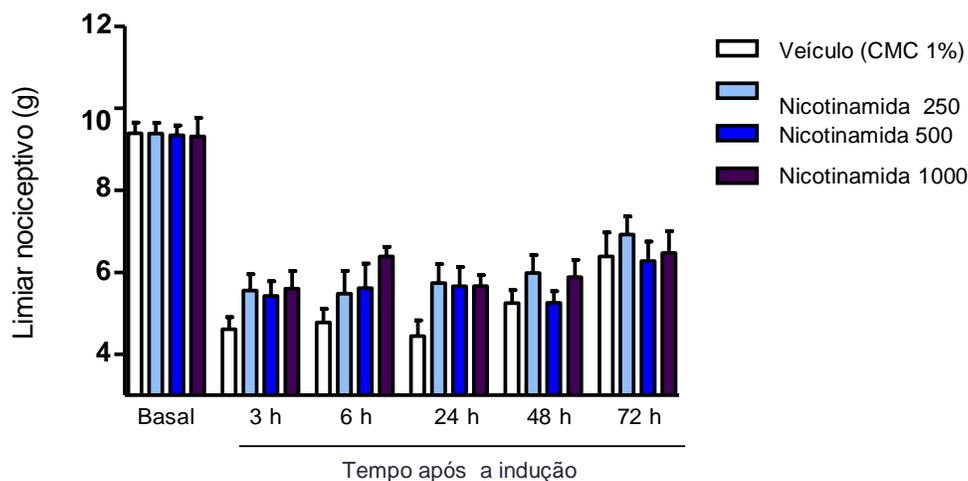


Figura 25 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com ácido nicotínico (75, 125 ou 250 mg/kg, p.o., -1h e +2 h), após administração i.a. de zimosano (50 µg em injeção de 10 µL). ** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e $p < 0,01$. n=8-9.

A nicotinamida inibiu o edema articular quando administrada previamente e quando administrada previamente e posteriormente à injeção i.a. de zimosano (**Figuras 26b e 27b**). Entretanto, o efeito antialodínico foi detectado apenas com o esquema de dupla

administração de nicotinamida nas 3^a (250, 500 e 1000 mg/Kg) e 6^a h (1000 mg/Kg) após a indução da inflamação articular (**Figura 26a e 27a**).

(a)



(b)

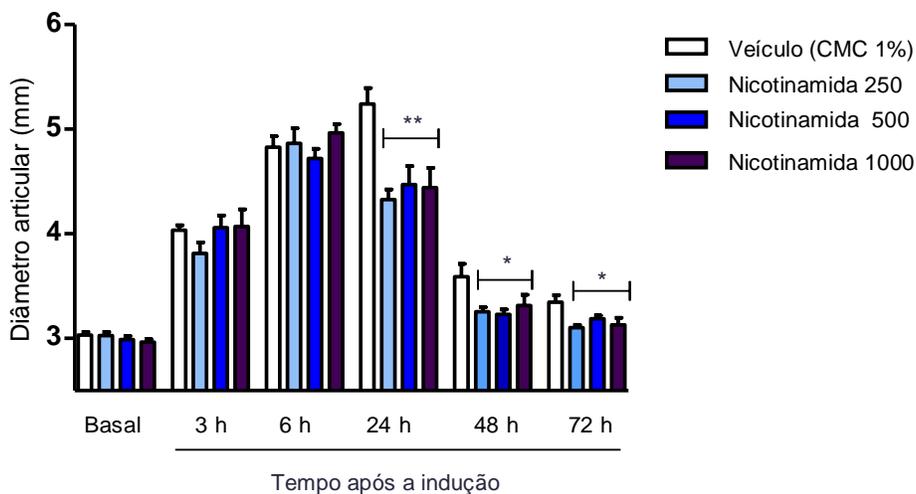
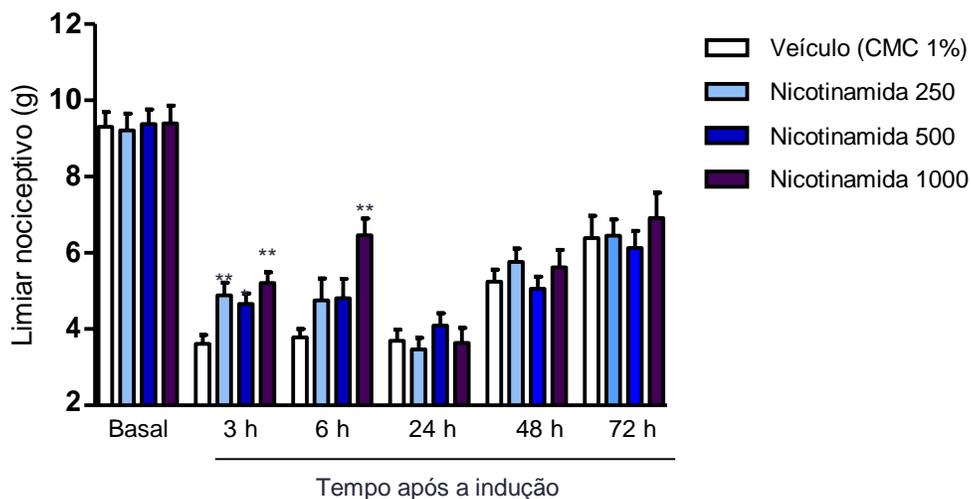


Figura 26 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/kg, p.o., -1 h), após administração i.a. de zimozano (50 µg em injeção de 10 µL). * e ** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e p<0,05 e p<0,01, respectivamente. n=8-9.

(a)



(b)

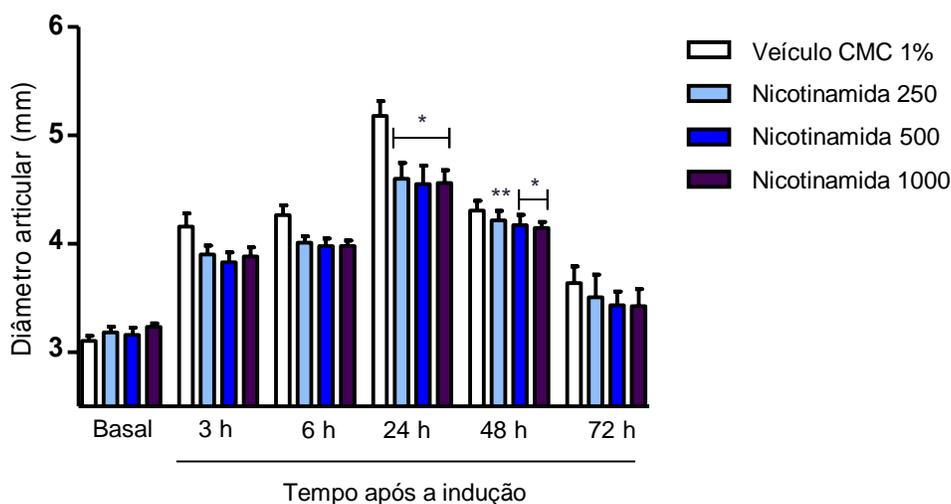
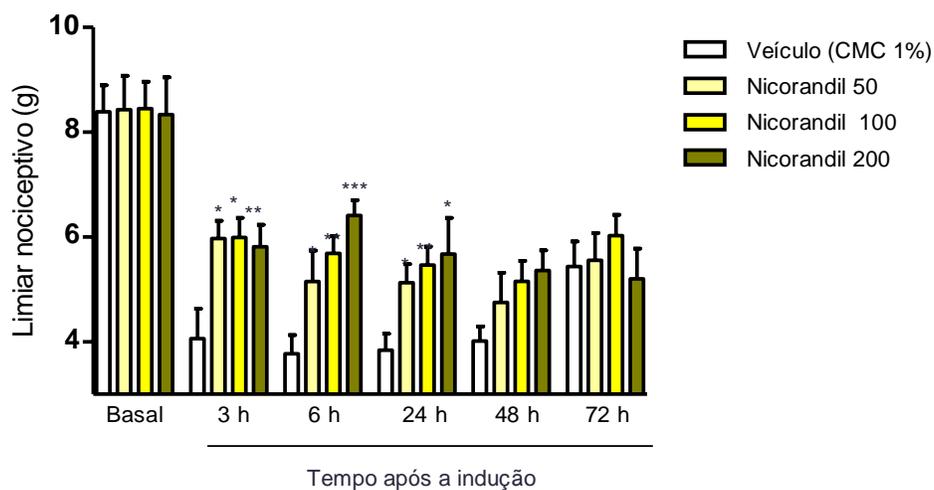


Figura 27 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com nicotinamida 250, 500 ou 1000 mg/kg, p.o., -1h e +2 h), após administração i.a. de zimozano (50 μ g em injeção de 10 μ L). *, **e indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente. $n = 8-9$.

Nicorandil, com uma única administração no esquema de pré-tratamento, induziu efeito antialodínico nas 3^a, 6^a e 24^a h, mas não redução de edema articular, após a indução de inflamação articular nas três doses avaliadas (50, 100 e 200 mg/Kg), (Figura 28).

(a)



(b)

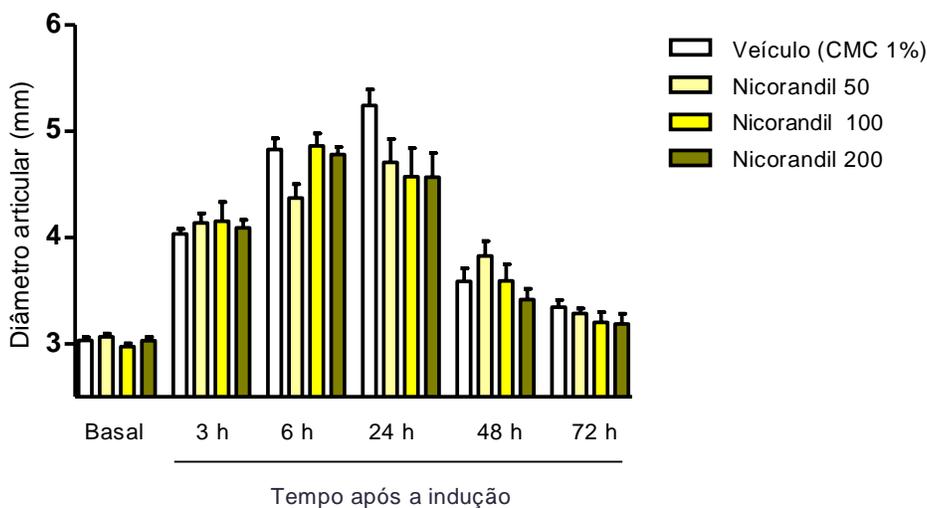


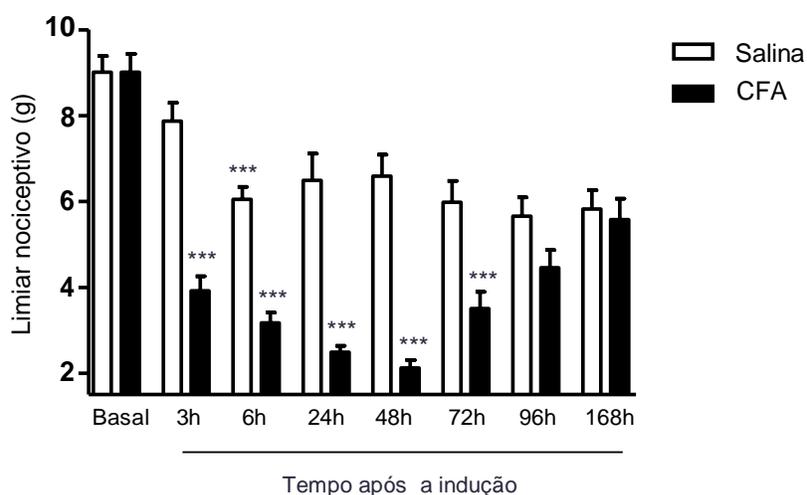
Figura 28 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com nicorandil (50, 100 ou 200 mg/kg, p.o., -1h), após administração i.a. de zimosano (50 µg em injeção de 10 µL). *, **e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. $n = 5-8$.

5.1.7 Inflamação articular induzida por injeção i.a. de CFA em camundongos

A injeção i.a. de CFA induziu alodínia mecânica e edema articular durante todo o período de observação – até a 72ª h – com respostas máximas entre 24 e 48 h. O

grupo controle, que recebeu injeção de solução salina estéril, apresentou mínimas alterações, não significativas, do diâmetro articular e da sensibilidade ao estímulo mecânico durante os três dias de observação (**Figura 29**).

(a)



(b)

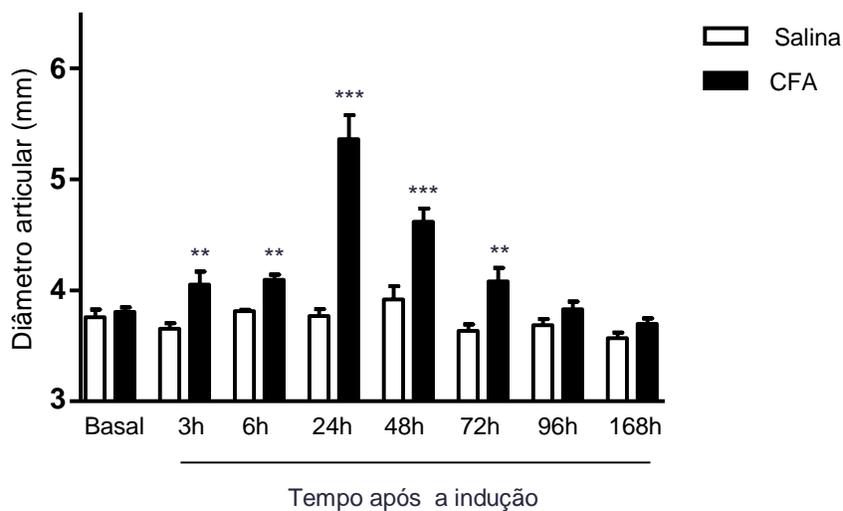
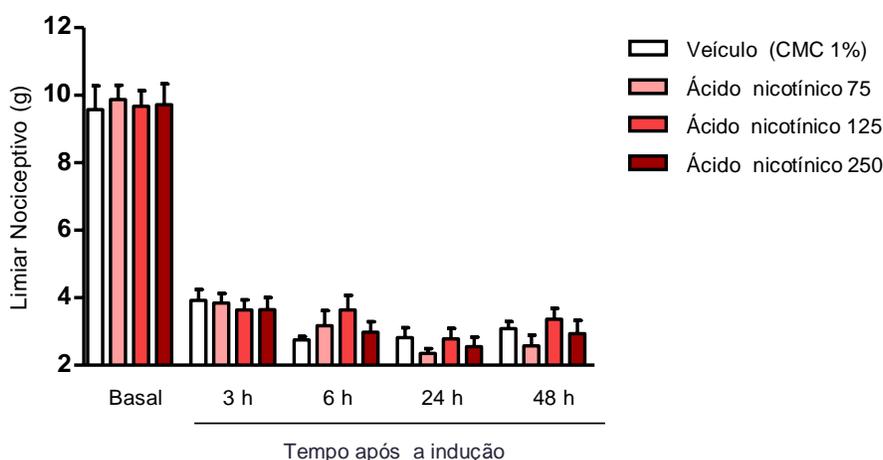


Figura 29 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) em camundongos, após administração i.a. de salina ou CFA (100 µg em injeção de 10 µL). **e * indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. $n = 8-9$.**

5.1.8 Efeitos induzidos por ácido nicotínico, nicotinamida e nicorandil em modelo de artrite induzido por CFA i.a.

O ácido nicotínico não induziu efeito antinociceptivo ou antiedematogênico tanto no protocolo com tratamento único quanto no protocolo com tratamento duplo (**Figuras 30 e 31**). No protocolo com dupla administração de ácido nicotínico, houve detecção, de maneira pontual, mas significativa, de aumento do limiar nociceptivo, na 24^a h, apenas para a dose de 125 mg/Kg.

(a)



(b)

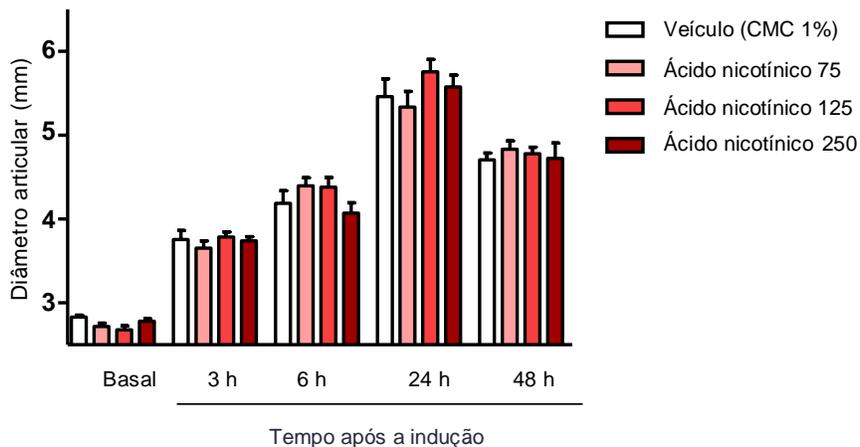
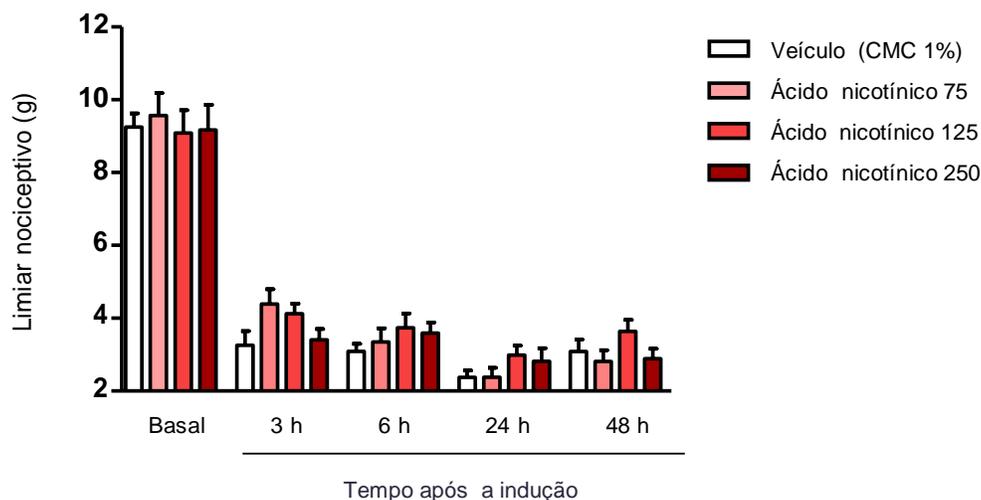


Figura 30 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com ácido nicotínico (75, 125 ou 250 mg/kg, p.o., -1 h), após administração i.a. de CFA (100 µg em injeção de 10 µL). n=8-9.

(a)



(b)

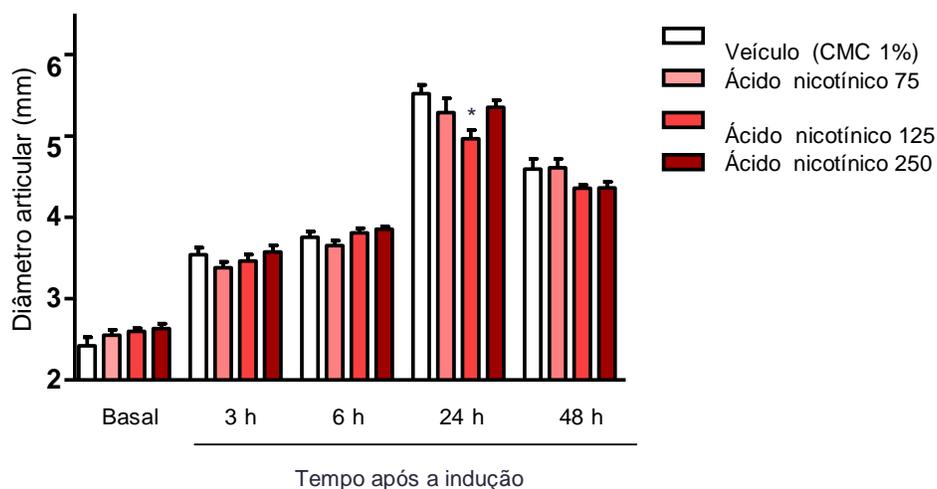
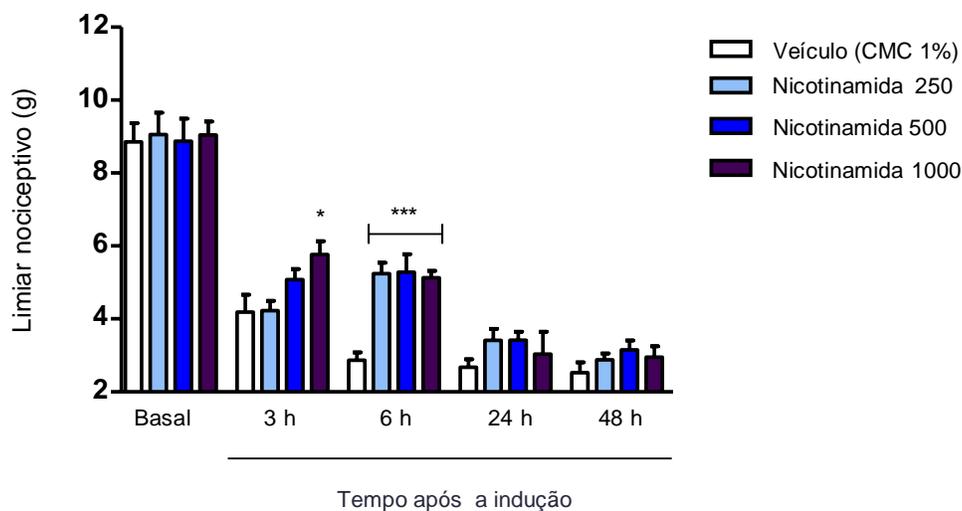


Figura 31 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com ácido nicotínico (75, 125 ou 250 mg/kg, p.o., -1 h e +2h), após administração i.a. de CFA (100 µg em injeção de 10 µL). * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e $p < 0,05$. n=8-9.

Nicotinamida e nicorandil foram administrados apenas no esquema de pré-tratamento no modelo de inflamação articular induzida por CFA i.a., pois, com esse esquema inicial foi possível detectar, de maneira mais consistente, atividade antialodínica. Redução do edema articular também foi detectada, mas de maneira menos evidente.

Nicotinamida, nas doses de 250 ou 500 mg/Kg, induziu efeito antialodínico na 6^a h após a injeção i.a de CFA, e na dose de 1000 mg/Kg induziu tal efeito nas 3^a e 6^a h. A dose de 500 mg/Kg reduziu edema articular na 3^a hora e a de 250 mg/Kg, nas 6^a e 24^a h (Figura 32)

(a)



(b)

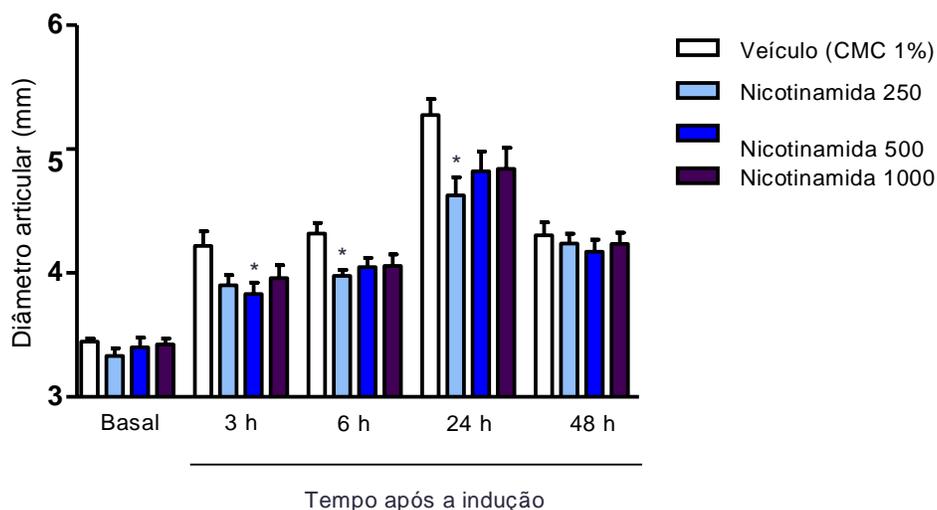
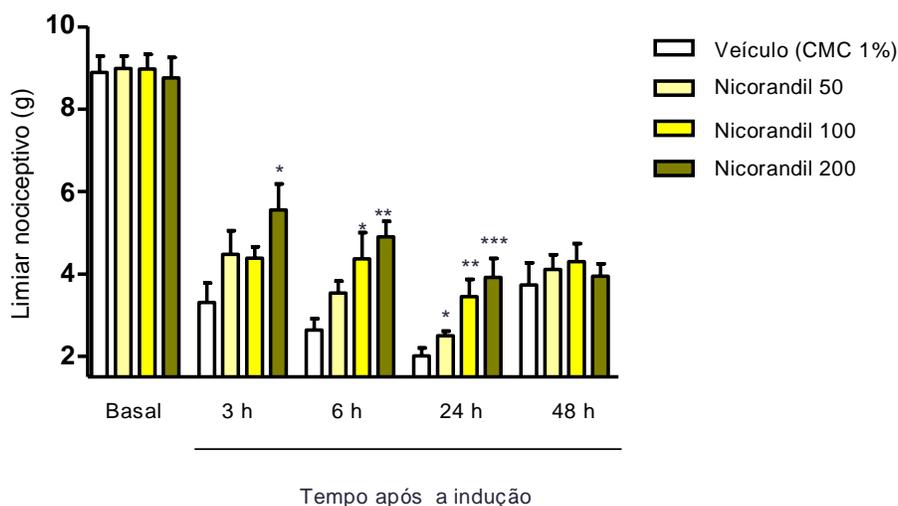


Figura 32 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/kg, p.o., -1 h), após administração i.a. de CFA (100 µg em injeção de 10 µL). *, e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente. $n = 8-9$.

O nicorandil foi o fármaco que, mais uma vez, induziu efeito antialodínico de maior magnitude, ainda que administrado em doses menores comparadas às de nicotinamida, que também induziu tal efeito. A redução de edema articular foi detectada apenas com a dose de 50 mg/Kg, na 6^a h após a indução da inflamação articular (**Figura 33b**). O nicorandil reduziu a alodínia mecânica na 3^a (200 mg/Kg), 6^a (100 e 200 mg/Kg) e 24^a h (nas três doses avaliadas) após a injeção i.a. de CFA (**Figura 33a**). A atividade antinociceptiva do nicorandil, muito superior à sua atividade antiedematogênia, está de acordo resultados observados nos modelos de inflamação articular induzido por CFA em ratos (**Figura 22**) e de inflamação articular induzida por zimozano em camundongos (**Figura 28**).

(a)



(b)

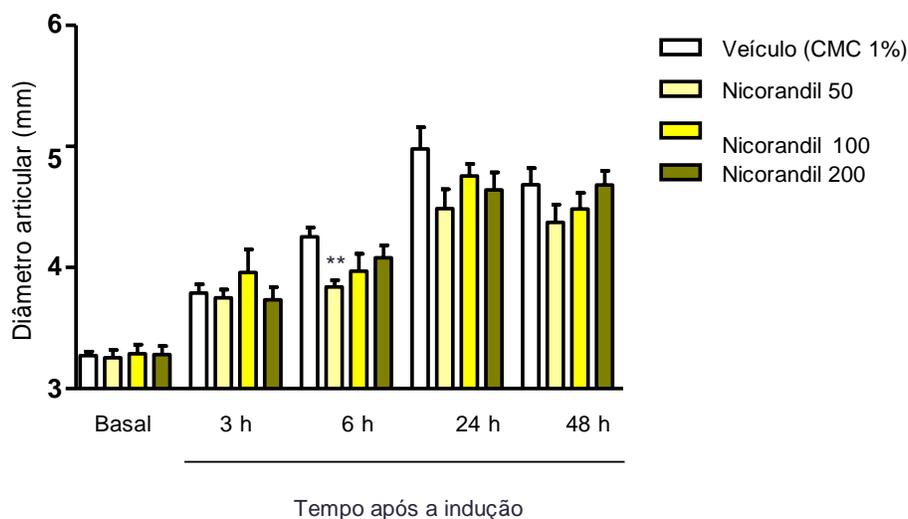


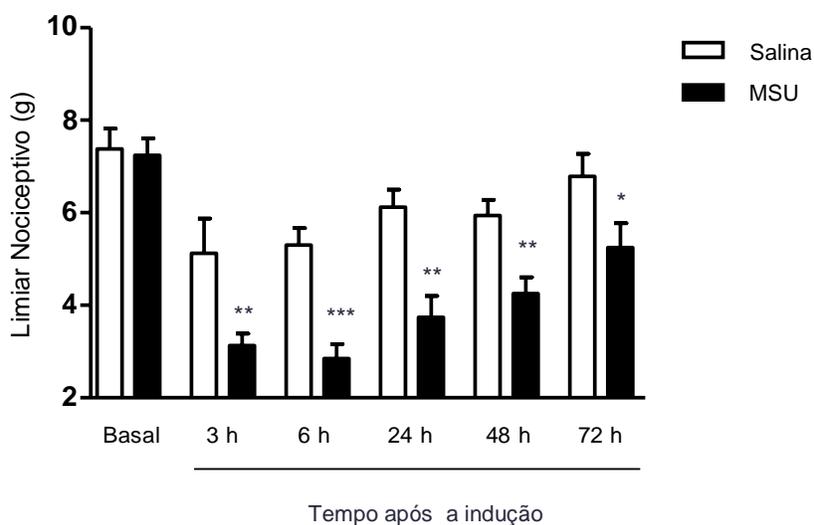
Figura 33 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com nicorandil (50, 100 ou 200 mg/kg, p.o., -1h), após administração i.a. de CFA (100 µg em injeção de 10 µL). *, **e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. $n = 6-9$.

5.1.9 Inflamação articular induzida por injeção i.a. MSU em camundongos

A injeção i.a. de MSU induziu alodínia mecânica e edema articular. A alodínia mecânica foi observada até 72 h e o edema articular até 24 h após a injeção de MSU. O grupo controle, que recebeu injeção de solução salina estéril, apresentou mínimas alterações,

não significativas, do diâmetro articular e da sensibilidade ao estímulo mecânico durante todo o período de observação (**Figura 34**).

(a)



(b)

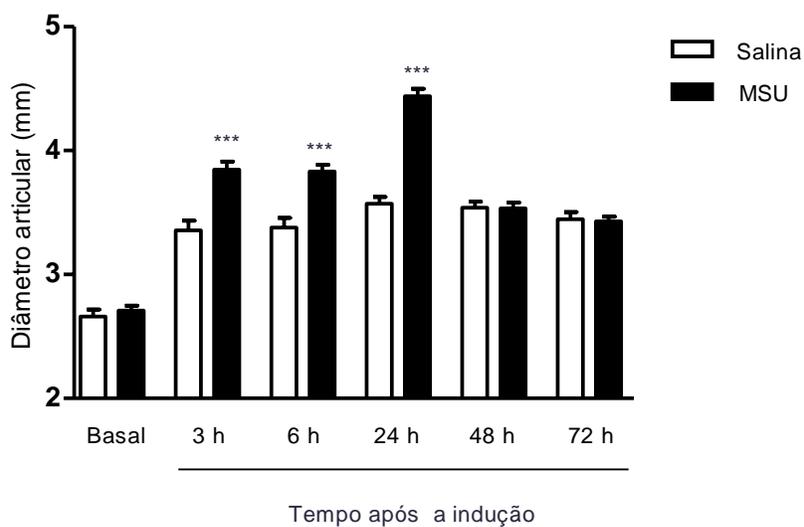


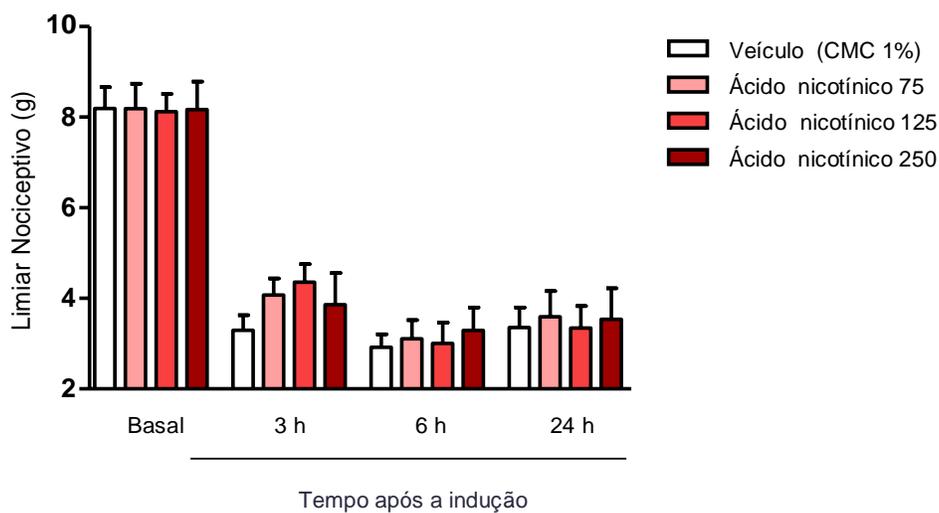
Figura 34 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos, após administração i.a. de salina ou MSU (100 µg em injeção de 10 µL). *, **e * indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e p<0,05, p<0,01 e p<0,001, respectivamente. n=9-10.**

5.1.10 Efeitos induzidos por ácido nicotínico, nicotinamida e nicorandil em modelo de artrite induzido por MSU

A escolha pelo protocolo com dupla administração (pré+pós) do ácido nicotínico e da nicotinamida se deveu aos resultados nos outros modelos, visando obtenção de resultados mais consistentes e redução do número de animais experimentais a serem usados. Não obstante, o ácido nicotínico, a nicotinamida e o nicorandil mantiveram o padrão de atividade observado nos outros dois modelos de inflamação articular, isto é, o efeito mais marcante foi o antialodínico e o nicorandil foi o composto que apresentou atividade mais consistente, quando se leva em consideração as menores doses usadas e o efeito mais duradouro.

Neste modelo, ácido nicotínico (p.o., -1h e +2h) foi desprovido de atividade antialodínica, nas doses entre 75-250 mg/Kg (**Figura 35**). Nicotinamida induziu efeito antialodínico, mas não antiedematogênico, nas 3^a e 6^a h após a indução de inflamação articular com MSU nas doses de 500 ou 1000 mg/Kg (**Figura 36**).

(a)



(b)

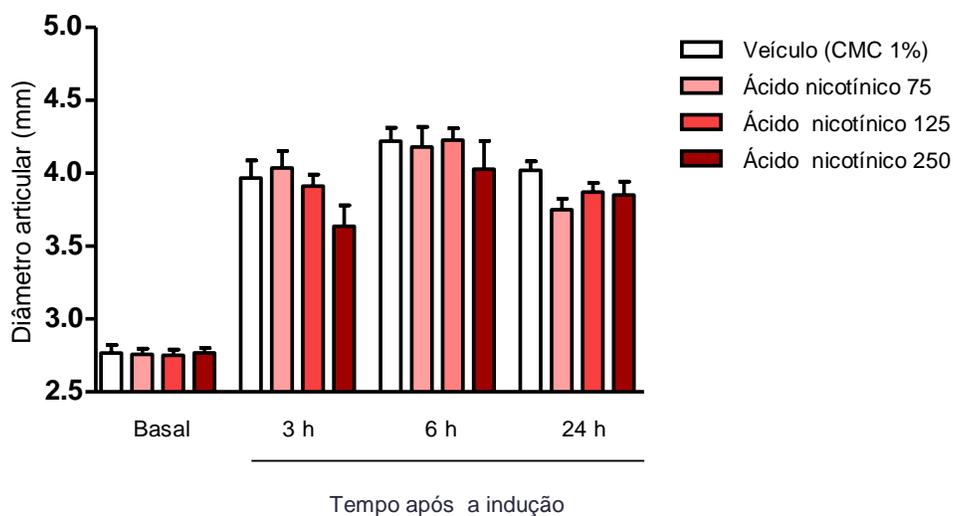
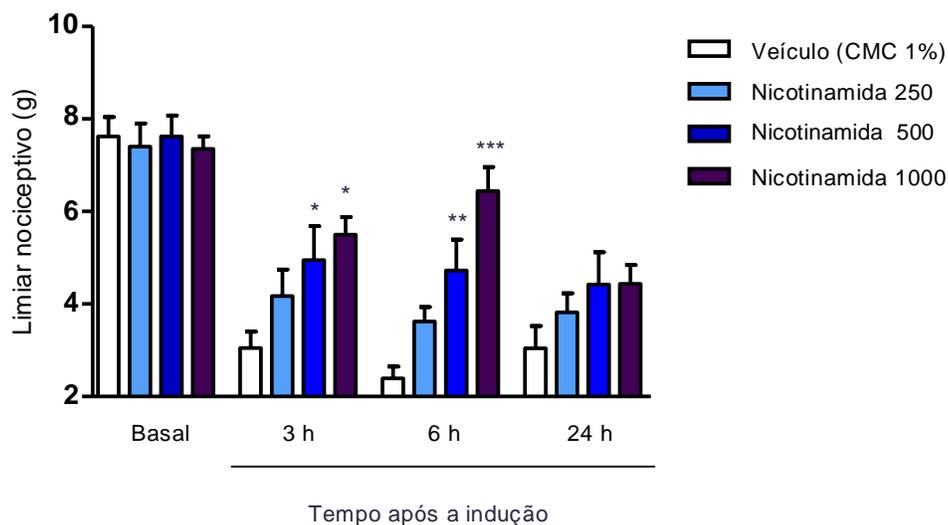


Figura 35 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com ácido nicotínico (75, 125 ou 250 mg/Kg, p.o., -1 h e +2 h), após administração i.a. MSU (100 µg em injeção de 10 µL). n=8-9.

(a)



(b)

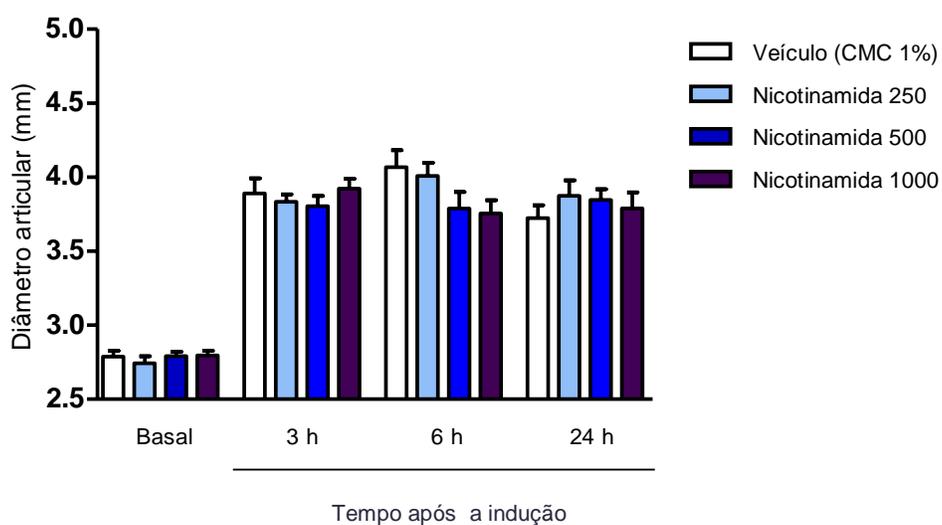
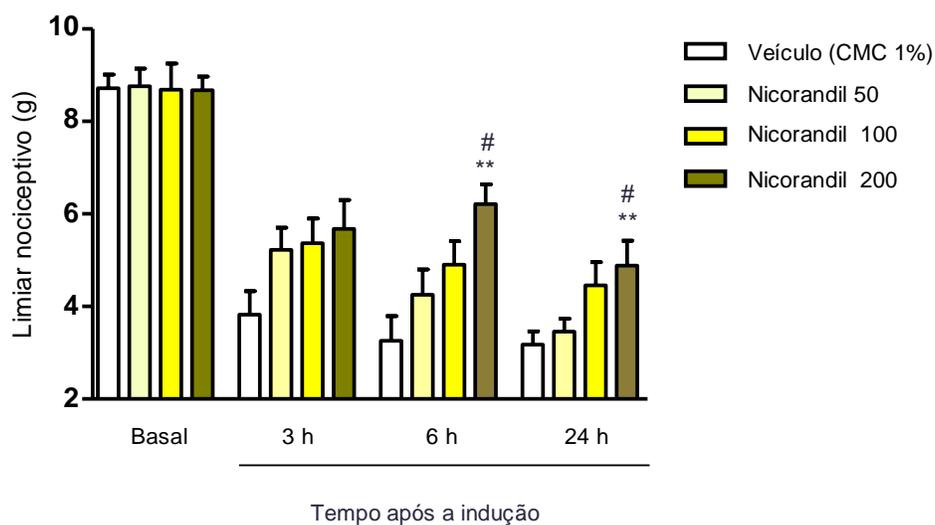


Figura 36 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/Kg, p.o., -1 h e +2 h), após administração i.a. MSU (100 µg em injeção de 10 µL).*, **e * indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. $n = 8-9$.**

O nicorandil induziu redução da alodínia mecânica, mas não de edema articular, nas 6^a e 24^a hora após a injeção de MSU, apenas para a maior dose (200 mg/Kg; **Figura 37**).

(a)



(b)

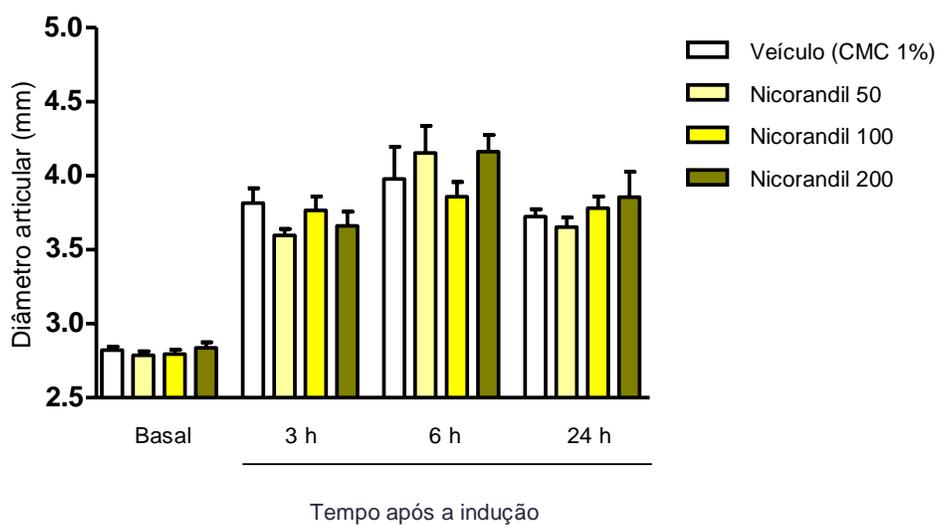


Figura 37 – Limiar nociceptivo (a) e diâmetro articular (b) de camundongos tratados com nicorandil (50, 100 ou 200 mg/Kg, p.o., -1 h), após administração i.a. MSU (100 µg em injeção de 10 µL). ** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e $p < 0,01$; # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo nicorandil 50 mg/Kg. $n = 7-9$.

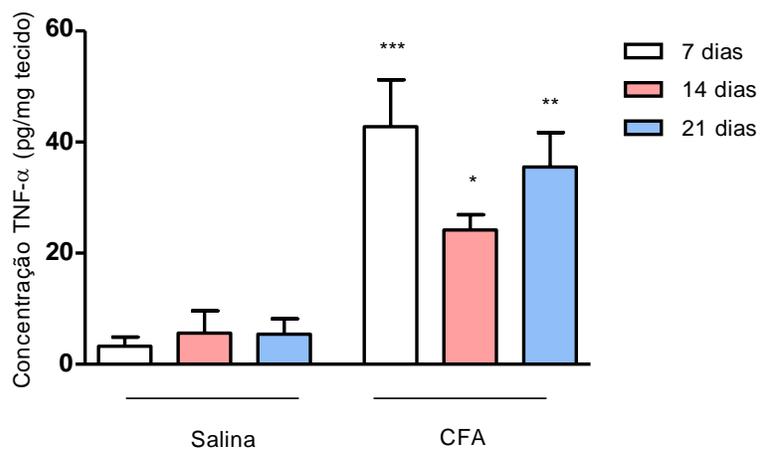
5.2 Mecanismos envolvidos nas atividades antialodínicas e/ou antiedematogênica da nicotinamida ou do nicorandil em modelos experimentais de inflamação articular

De modo a compreender mecanismos envolvidos nas atividades verificadas para nicotinamida e nicorandil nos diferentes modelos experimentais selecionados, procedeu-se a quantificação de citocinas (em ratos e camundongos) e/ou contagem de células no lavado i.a. de camundongos. Ainda, o envolvimento de receptores opioides foi investigado para a atividade do nicorandil no modelo de inflamação articular induzida por zimosano, modelo no qual a atividade antialodínica do fármaco foi verificada nas 3^a, 6^a e 24^a horas, para todas as doses administradas.

5.2.1 Nicotinamida em modelo de artrite em ratas Holtzman

As concentrações de TNF- α , mas não de IL-6, na pata encontraram-se elevadas no grupo CFA, em comparação ao grupo controle, nos dias 7, 14 ou 21 (**Figuras 38a e 39**). O grupo CFA, quando comparado ao grupo controle, também apresentou concentração plasmática de TNF- α aumentada no 14^o dia (**Figura 38b**).

(a)



(b)

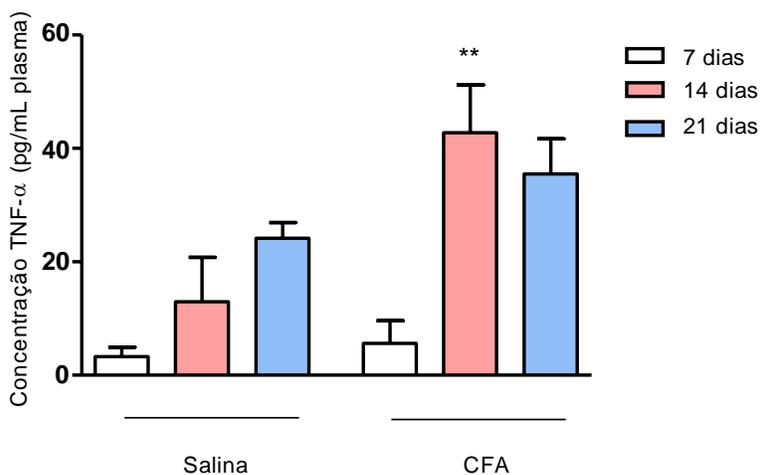


Figura 38 – Concentrações de TNF- α no tecido da pata (a) e no plasma (b) 7, 14 e 21 dias após a administração de salina ou CFA (100 μ L por injeção; 1 mg/mL) na pata posterior direita e na base da cauda. *, ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. $n = 6$.

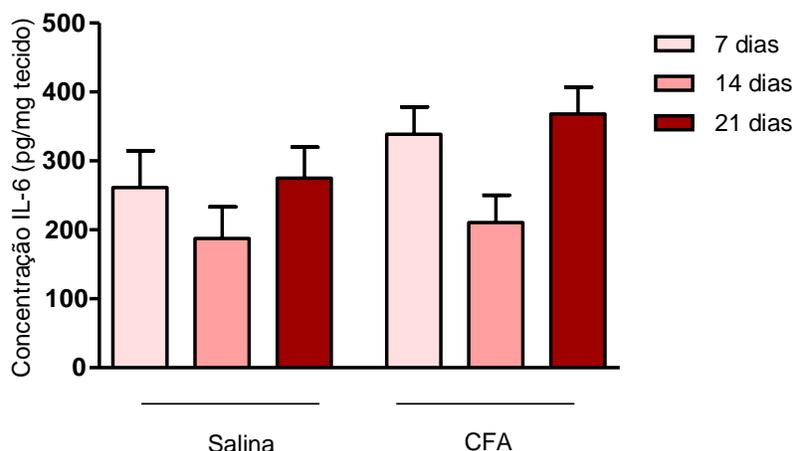


Figura 39 – Concentrações de IL-6 no tecido da pata 7, 14 e 21 dias após a administração de salina ou CFA (100 μ L por injeção; 1 mg/mL) na pata posterior direita e base da cauda. n=6.

Por fim, com base no padrão do efeito antialodínico observado nos protocolos anteriores e também no perfil das concentrações de TNF- α nos dias 7, 14 e 21, selecionou-se o 14^o dia para quantificação desta citocina por método imunoenzimático. Conforme demonstrado na Figura 21, observamos que a administração de nicotinamida (1000 mg/Kg) reduziu a concentração de TNF- α em tecido de pata dos animais quando comparado ao grupo controle. Não foi observado diferença estatística significativa para as doses de 250 ou 500 mg/Kg, embora seja possível constatar uma tendência de redução da concentração de TNF- α de maneira dose-dependente (**Figura 40**). A quantificação de TNF- α em sangue periférico dos grupos tratados com nicotinamida ou veículo também foi realizada, mas não houve diferença estatística entre os grupos (resultados não demonstrados).

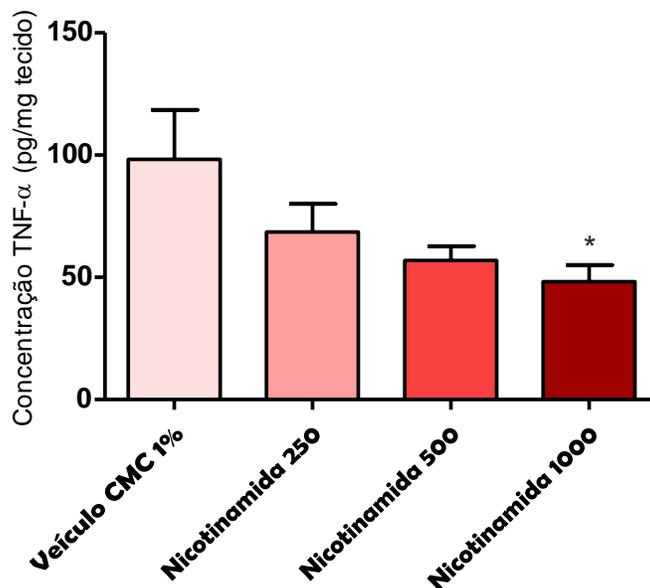


Figura 40 – Efeitos induzidos por nicotinamida sobre as concentrações de TNF- α no tecido da pata no 14º dia após a administração de CFA (100 μ L por injeção; 1 mg/mL) na pata posterior direita e base da cauda. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e $p < 0,05$. $n = 6$.

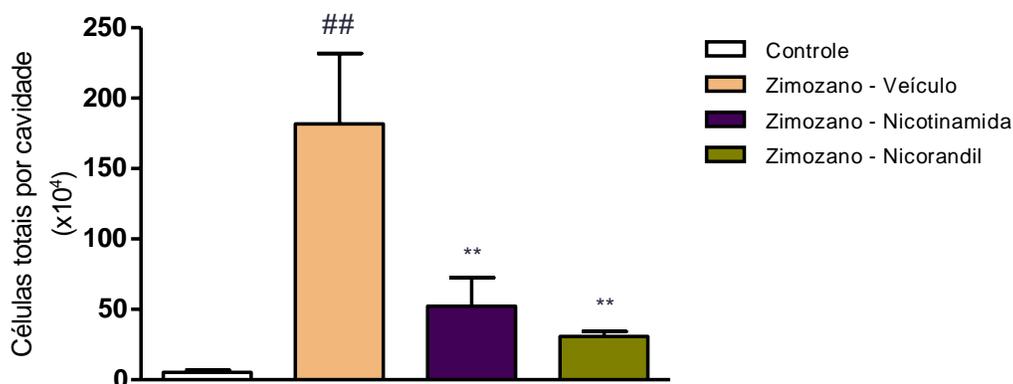
5.2.2 Efeitos induzidos por nicotinamida ou nicorandil sobre a contagem total, diferencial e atividade de MPO no lavado articular e na produção de citocinas em modelos experimentais de inflamação articular

De modo a compreender possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos induzidos por nicotinamida e nicorandil nos modelos de inflamação articular induzidos por zimosano, CFA ou MSU, foi realizada a contagem total e diferencial de células no lavado articular dos camundongos, coletado 6 h após a injeção de cada um destes estímulos inflamatórios, bem como a quantificação de citocinas no tecido periarticular. A atividade de MPO também foi realizada para os modelos que utilizaram zimosano ou MSU como estímulos inflamatórios.

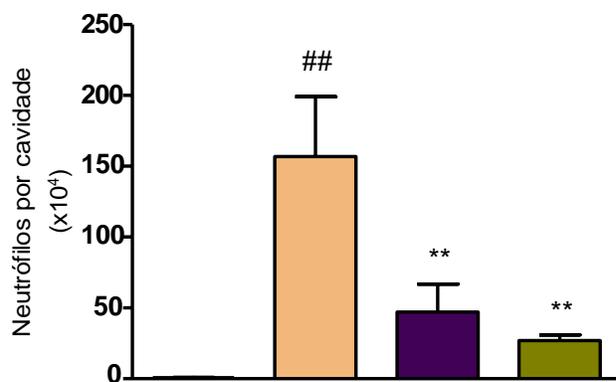
No modelo utilizando zimosano, nicotinamida (1000 mg/Kg, p.o., -1 e 2 h) e nicorandil (200 mg/Kg, p.o., -1h) reduziram o número total de células na cavidade articular (**Figura 41a**), principalmente de neutrófilos (**Figura 41b**), que consiste na maior parte

das células inflamatórias recrutadas no intervalo de tempo avaliado. Os dois fármacos também reduziram a atividade de MPO, confirmando o menor recrutamento neutrofílico para o local da inflamação (**Figura 42**).

(a)



(b)



(c)

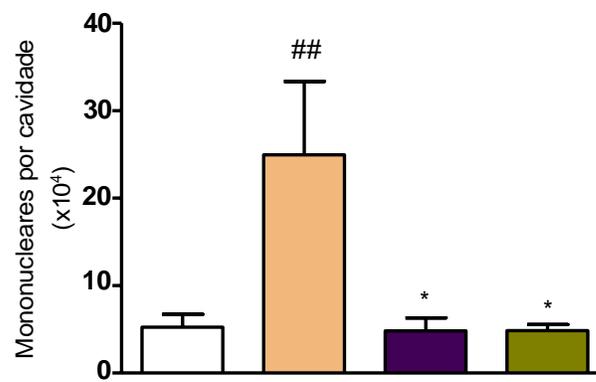


Figura 41 – Efeitos induzidos pela nicotinamida (1000 mg/Kg, p.o., -1 h e 2 h) ou pelo nicorandil (200 mg/Kg, p.o., -1 h) sobre o número total de células (a), neutrófilos (b) e mononucleares (c) no lavado obtido da cavidade articular após 6 h da injeção i.a. de zimozano. * e ** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com veículo e p<0,05 e p<0,01, respectivamente. ## indica diferença estatisticamente significativa ao grupo controle e p<0.001. n=6.

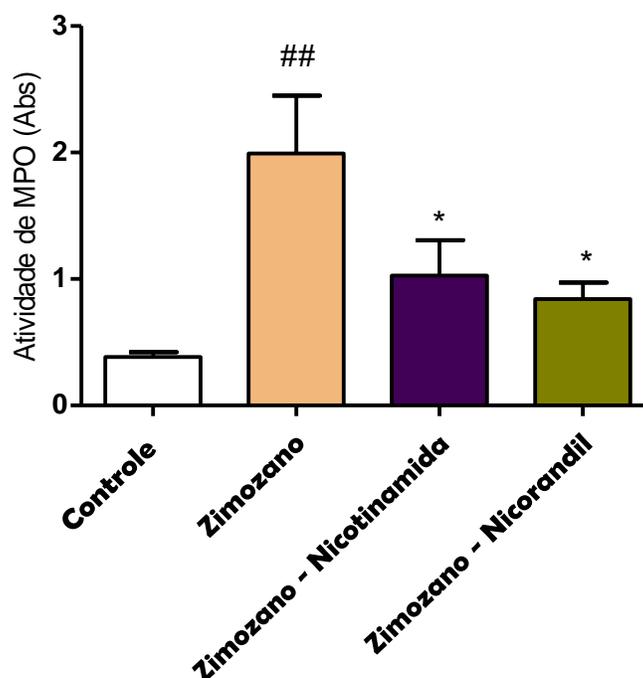
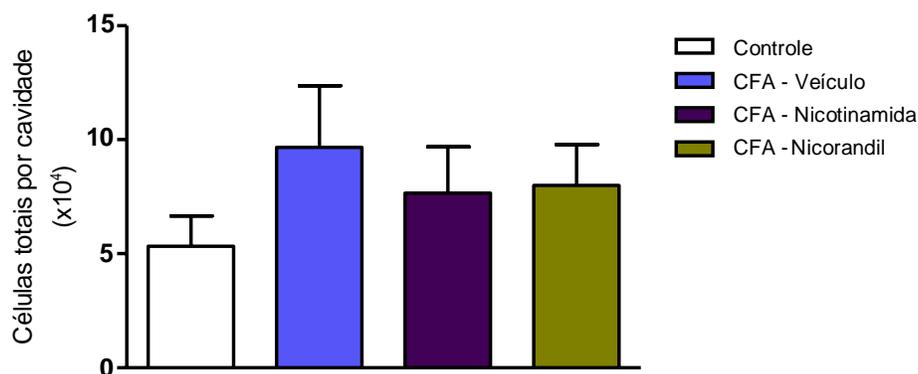


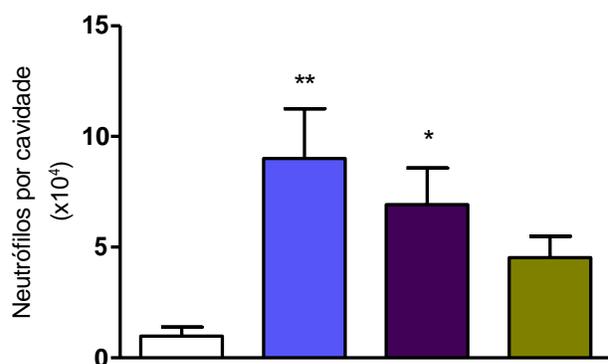
Figura 42 – Efeitos induzidos pela nicotinamida (1000 mg/Kg, p.o., -1 h e 2 h) ou pelo nicorandil (200 mg/Kg, p.o., -1 h) sobre a atividade de MPO no tecido periarticular, após 6 h da injeção i.a. de zimozano. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo e $p < 0,05$. ### indica diferença estatisticamente significativa ao grupo controle e $p < 0,01$. $n = 5-6$.

No modelo de inflamação articular induzida pela injeção i.a. de CFA, não foi verificado aumento do número de células totais no lavado articular coletado 6 h após a injeção de CFA ou salina estéril (controle; **Figura 43a**). Embora o número de neutrófilos no grupo tratado com CFA tenha aumentado de maneira estatisticamente significativa quando comparado ao grupo que recebeu injeção i.a. de salina (**Figura 43b**), o valor foi considerado ainda muito baixo, uma vez que o número total de células não apresentou diferença entre os grupos avaliados neste momento de coleta. O número de células mononucleadas também não variou entre os grupos controle ou tratados com veículo, nicotinamida ou nicorandil 1 h antes da injeção de CFA i.a. (**Figura 43c**). Tendo em vista esses resultados, não foram realizados os protocolos para quantificação de citocinas e quimiocinas, bem como o protocolo para avaliação da atividade da MPO, no modelo de inflamação articular induzida pela injeção i.a. de CFA.

(a)



(b)



(c)

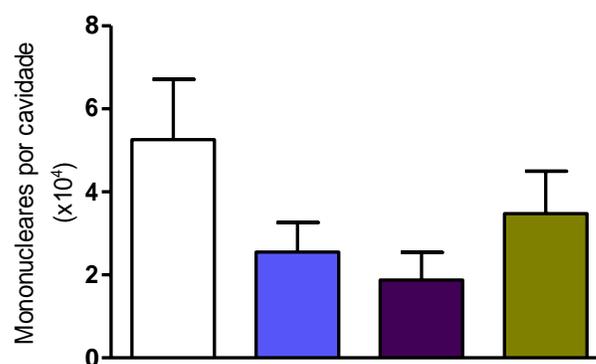
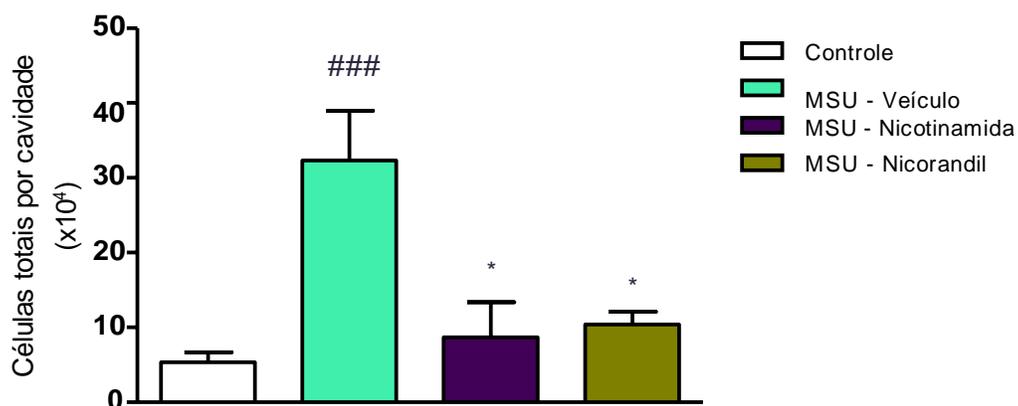


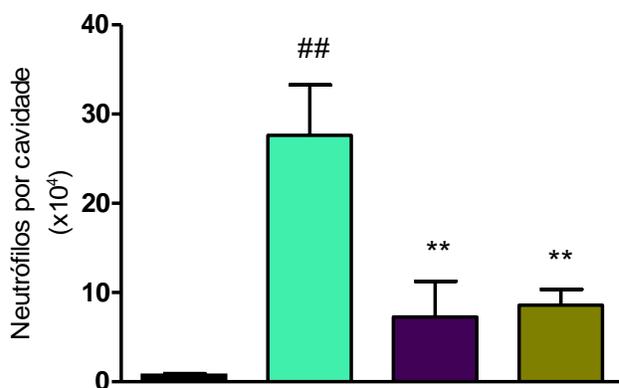
Figura 43 – Efeitos induzidos pela nicotinamida (1000 mg/Kg, p.o., -1 h e 2h) ou pelo nicorandil (200 mg/Kg, p.o., -1 h) sobre o número total de células (a), neutrófilos (b) e mononucleares (c) no lavado obtido da cavidade articular após 6 h da injeção i.a. de CFA. * e ** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle e $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente. n=5-6.

No modelo de inflamação articular induzida por MSU, a nicotinamida (1000 mg/Kg, p.o., -1 e 2 h) e o nicorandil (200 mg/Kg, p.o., -1h) reduziram o número total de células na cavidade articular (**Figura 44a**), sendo esta redução associada principalmente à redução do recrutamento de neutrófilos (**Figura 44b**), mas não de células mononucleadas (**Figura 44c**). Assim como no modelo de zimosano, a nicotinamida e o nicorandil reduziram a atividade da MPO (**Figura 45**), confirmando o menor recrutamento de neutrófilos detectado na contagem de células do lavado articular.

(a)



(b)



(c)

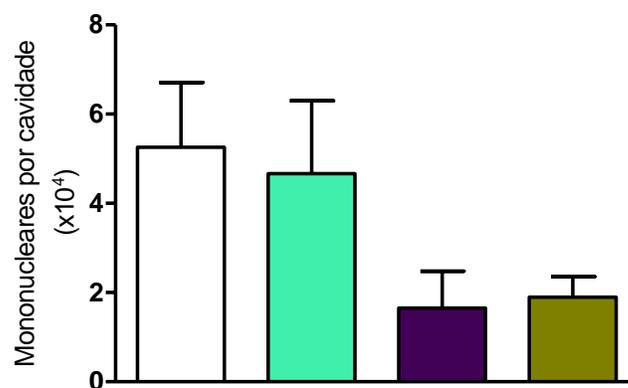


Figura 44 – Efeitos induzidos pela nicotinamida (1000 mg/Kg, p.o., -1 h e 2h) ou pelo nicorandil (200 mg/Kg, p.o., -1 h) sobre o número total de células (a), neutrófilos (b) e mononucleares (c) no lavado obtido da cavidade articular após 6 h da injeção i.a. de MSU. ** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo e $p < 0,01$. ## e ### indicam diferença estatisticamente significativa ao grupo controle e $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. $n = 6$.

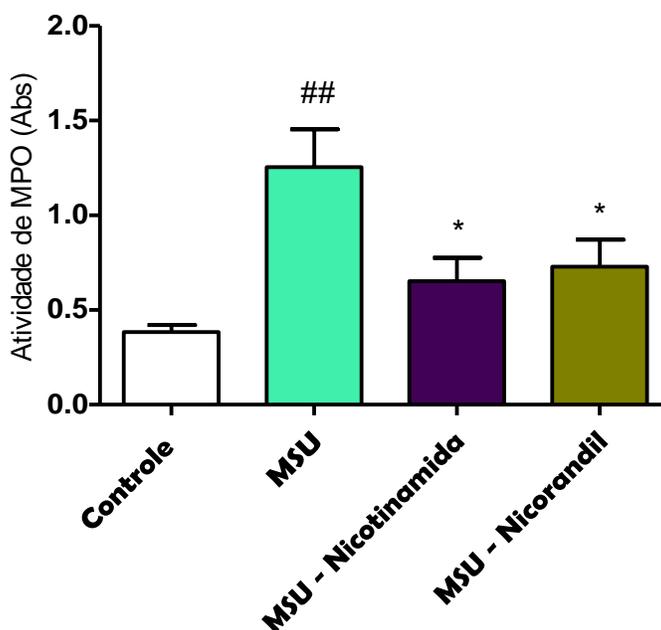


Figura 45 – Efeitos induzidos pela nicotinamida (1000 mg/Kg, p.o., -1 h e 2 h) ou pelo nicorandil (200 mg/Kg, p.o., -1 h) sobre a atividade de MPO no tecido periarticular após 6 h da injeção i.a. de MSU. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo e $p < 0,05$. ## indica diferença estatisticamente significativa ao grupo controle e $p < 0,01$. $n = 5-6$.

Para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas atividades antialodínica e anti edematogênica da nicotinamida e do nicorandil nos modelos experimentais de inflamação articular induzida por zimozano e MSU (modelos nos quais houve recrutamento celular marcante; **Figuras 41 e 44**), foram determinadas as concentrações de CXCL-1 em tecido periarticular de animais com inflamação articular induzida por zimozano ou MSU, de TNF- α em tecido periarticular de animais com inflamação articular induzida por zimozano e de IL- β em tecido periarticular de animais com inflamação articular induzida por MSU. A escolha das citocinas reflete os resultados encontrados por Vieira e colaboradores (2015), nos quais o papel de IL-1 β mostrou-se mais significativo que o TNF- α no modelo de inflamação articular induzida por injeção i.a. de MSU. O tratamento com nicotinamida (1000 mg/Kg, p.o., pré+ pós tratamento) ou nicorandil (200 mg/Kg, p.o., pré-tratamento) não reduziu as concentrações de TNF- α ou CXCL-1 6 h após a injeção de zimozano (**Figura 46**),

Entretanto, no modelo de inflamação articular induzida por MSU, os dois compostos reduziram as concentrações tanto de IL-1 β quanto de CXCL-1 (**Figura 47**).

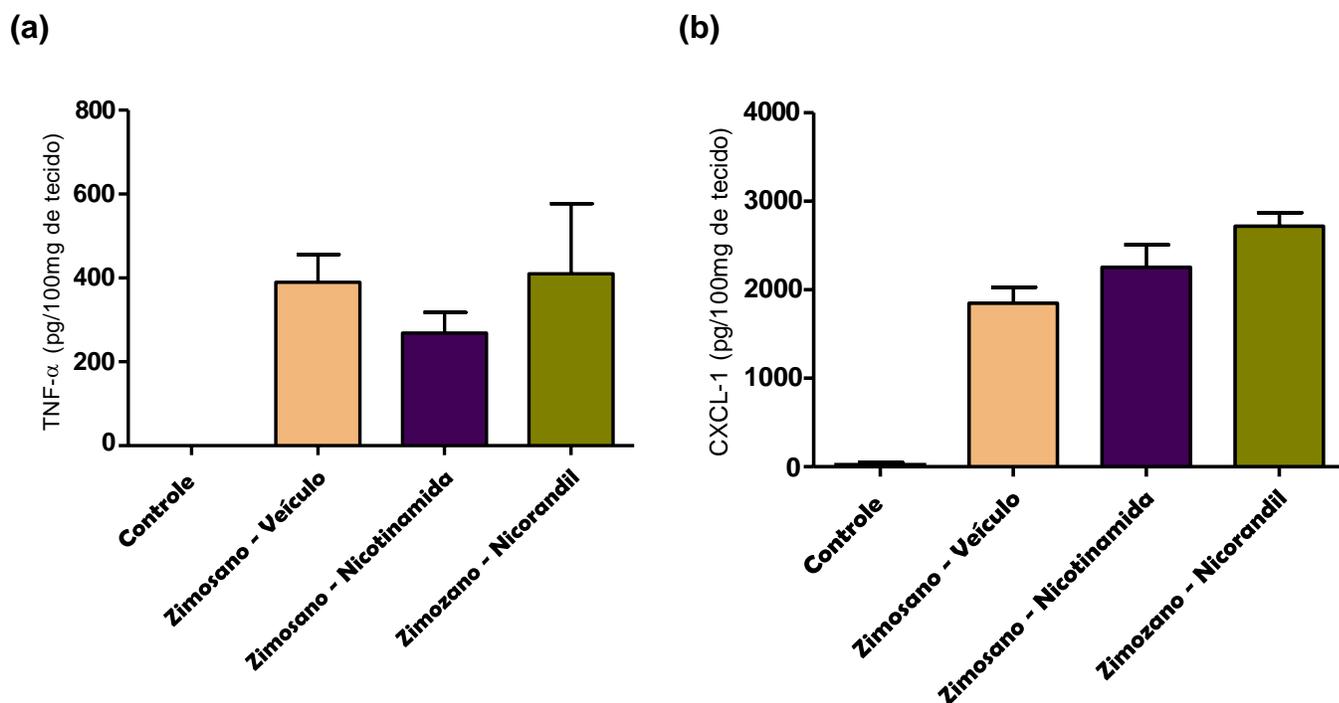


Figura 46 – Efeito induzido pela nicotinamida (1000 mg/Kg, p.o., -1 h e +2 h) ou nicorandil (200 mg/kg, p.o., -1 h) sobre as concentrações de TNF- α (a) ou CXCL-1 (b) no tecido periarticular coletado 6 h após a injeção i.a. de zimosano. n=5-6.

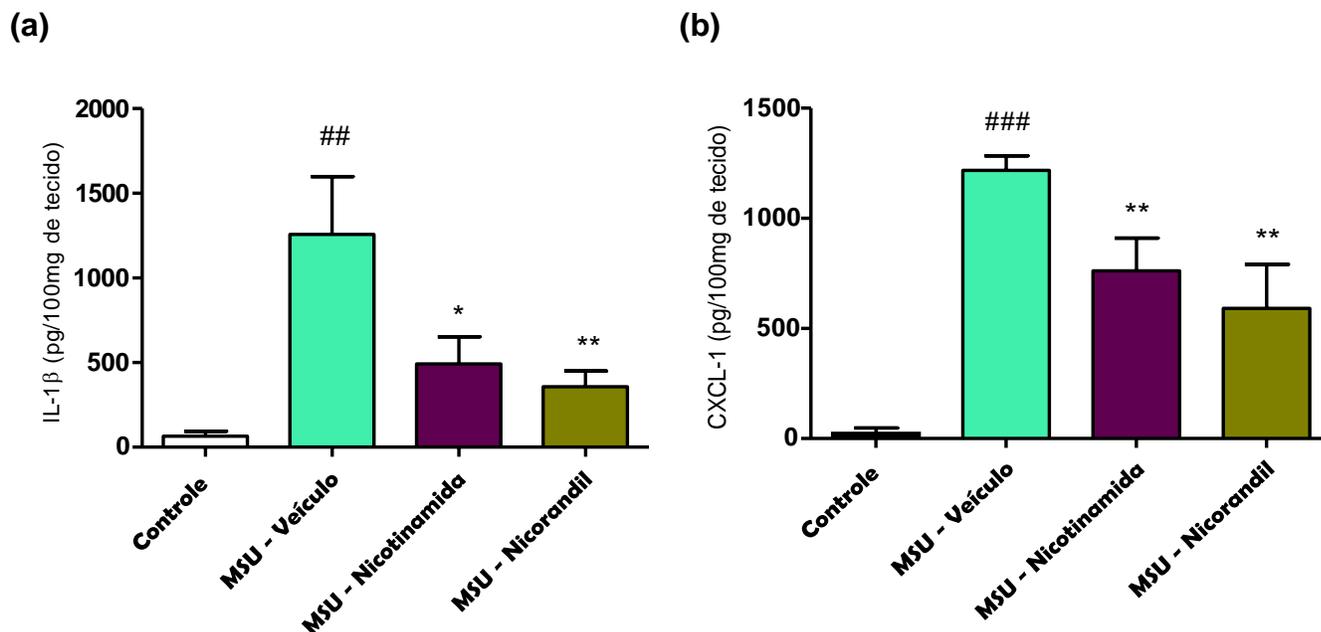


Figura 47 – Efeito induzido pela nicotinamida (1000 mg/Kg, p.o., -1 h e +2 h) ou nicorandil (200 mg/kg, p.o., -1 h) sobre as concentrações de IL-1 β (a) ou CXCL-1 (b) no tecido periarticular coletado 6 h após a injeção i.a. de MSU. * e ** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo e $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente. ## e ### indicam diferença estatisticamente significativa ao grupo controle e $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. $n = 5-6$.

5.2.3 Efeito induzido por naltrexona sobre a atividade antialodínica do nicorandil modelo experimental de inflamação articular induzida por zimozano em camundongos

O modelo de inflamação articular induzida por zimozano foi escolhido para a avaliação do papel da ativação de mecanismos opioides endógenos na atividade antialodínica do nicorandil. A escolha do nicorandil deveu-se à sua atividade antinociceptiva mais marcante, como observada no presente estudo, e também à observação de que mecanismos opioides medeiam a atividade desse composto em outro modelo de dor (DUTRA et al., 2015). Assim, elaborou-se um protocolo no qual os animais foram pré-tratados com naltrexona (5 ou 10 mg/Kg, i.p., 1,5 h antes da injeção i.a. de zimozano e 0,5 h antes da administração de nicorandil). Os animais foram avaliados até a 6^a h

após a injeção de zimozano. Neste protocolo, a naltrexona, nas doses de 5 e 10 mg/Kg, reverteu o efeito antialodínico induzido pelo nicorandil nos dois momentos de avaliação (**Figura 48**).

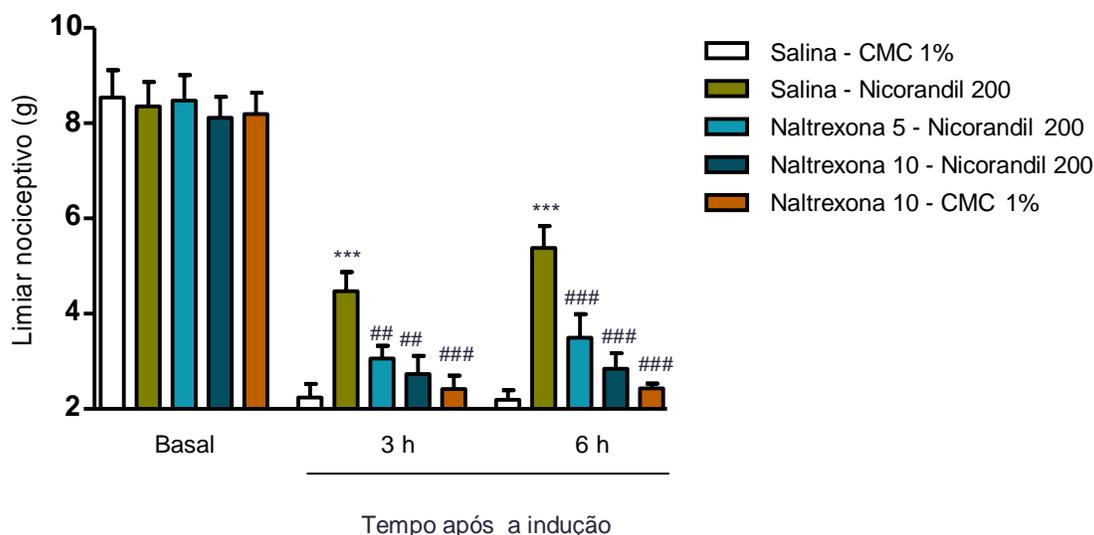


Figura 48 – Limiar nociceptivo de camundongos pré-tratados com naltrexona (5 ou 10 mg/Kg, i.p., -1,5 h) ou salina, seguido do tratamento com nicorandil (200 mg/kg, p.o., -1 h), em modelo de inflamação articular induzida por zimozano i.a. (50 µg em injeção de 10 µL). * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com salina + veículo e $p < 0,001$. ## e ### indicam diferença estatisticamente significativa ao grupo salina + nicorandil e $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. $n = 7-8$.**

O quadro 2 todos os resultados obtidos no presente estudo.

Quadro 2 – Resumo dos resultados

Modelo experimental de artrite reumatoide induzida por CFA em ratas Holtzman				
	Redução da alodínia mecânica	Redução do edema de pata	Efeito sobre produção de citocinas	
Ácido nicotínico	Sim. Apenas no 15º dia (250)	Não.	NSA.	
Nicotinamida	Sim. 9º ao 18º dia (75/125/250); 9º ao 21º dia (250/500/1000); administração única 12º dia: 5h (500); a partir 12º dia: 15º dia (1000).	Não.	Reduz TNF- α no tecido.	
Nicorandil	Sim. 3h após administração única no 12º dia (50/100/200).	Não.	NSA.	
Modelo experimental de inflamação articular induzida por zimozano i.a. em camundongos Swiss				
	Redução da alodínia mecânica	Redução do edema articular	Efeito sobre contagem de células no lavado articular	Efeitos sobre a produção de citocinas no tecido
Ácido nicotínico	Não.	Pré e pré+pós: Sim. 24 h (125), 48 h (75/125/250)	NSA.	NSA.
Nicotinamida	Pré: Não. Pré+pós: Sim. 3 h (250/500/1000).	Não.	Reduz células totais, neutrófilos e mononucleados; reduz atividade de MPO.	Não reduz TNF- α ou CXCL-1.
Nicorandil	Sim. 3 h, 6 h, 24 h (50/100/200). Efeito revertido por naltrexona.	Não.	Reduz células totais e neutrófilos; reduz atividade de MPO.	Não reduz TNF- α ou CXCL-1.
Modelo experimental de inflamação articular induzida por CFA i.a. em camundongos Swiss				
	Redução da alodínia mecânica	Redução do edema articular	Efeito sobre contagem de células no lavado articular	Efeitos sobre a produção de citocinas no tecido
Ácido nicotínico	Não.	Pré: Não. Pré+pós: 24 h (250).	NSA.	NSA.
Nicotinamida	Sim. 3 h (1000), 6 h (250/500/1000).	Sim. 3 h (500), 6 h (250).	NSA.	NSA.
Nicorandil	Sim. 3 h (200), 6 h (100/200), 24 h (50/100/200).	Sim. 6 h (500).	NSA.	NSA.
Modelo de inflamação articular induzida por MSU i.a. em camundongos Swiss				
	Redução da alodínia mecânica	Redução do edema articular	Efeito sobre contagem de células no lavado articular	Efeitos sobre a produção de citocinas no tecido
Ácido nicotínico	Não.	Não.	NSA.	NSA.
Nicotinamida	Sim. 3 h, 6 h (500/1000).	Não.	Reduz células totais e neutrófilos; reduz atividade de MPO.	Reduz IL-1 β e CXCL-1.
Nicorandil	Sim. 6 h, 24 h (100/200).	Não.	Reduz células totais e neutrófilos; reduz atividade de MPO.	Reduz IL-1 β e CXCL-1.

Legenda: NSA – Não se aplica/Não realizado.

6 DISCUSSÃO

A inflamação articular que acomete pacientes com AR, OA e AG geralmente está associada ao relato de dor moderada a intensa e edema da sinóvia e das estruturas periarticulares. A dor e o edema periarticular interferem de forma negativa na mecânica normal da articulação e podem resultar em comprometimento da atividade motora e redução da qualidade de vida. A dor é o sintoma mais frequente e relevante relatado por pacientes com inflamação articular (YU et al., 2002; WALSH & McWILLIANS, 2014), sendo caracterizada por hiperalgesia e dor espontânea (SHAIBLE & GRUBB, 1993). Embora o maior objetivo da farmacoterapia seja reduzir a destruição tecidual e a progressão da doença, fármacos com atividade analgésica são frequentemente usados por pacientes com AR, OA e AG. Assim, a busca por novas alternativas farmacoterapêuticas que induzem analgesia e que tenham bom perfil de segurança é justificada.

O presente estudo investigou as atividades do ácido nicotínico, da nicotinamida e do nicorandil em modelos de inflamação articular induzida por diferentes estímulos. Esses estímulos, a saber, CFA, zimosano e MSU, são usados para induzir alterações bioquímicas e celulares que simulam aquelas que ocorrem durante a AR, a OA e a AG, respectivamente. A investigação das atividades do ácido nicotínico, da nicotinamida e do nicorandil nesses modelos é justificada pela inexistência de estudos que tenham avaliado essas atividades.

A inflamação articular induzido por meio de múltiplas injeções de CFA em ratas da linhagem Holtzman simula as alterações bioquímicas e celulares da AR e foi inicialmente usada como modelo para avaliação das atividades do ácido nicotínico, da nicotinamida e do nicorandil. Esse modelo é amplamente utilizado em pesquisa de candidatos a fármacos e para melhor compreensão da patogênese da AR. Esse modelo mostrou-se reprodutível com desenvolvimento de alodínia mecânica e edema de pata durante todo o período de avaliação.

No modelo de inflamação articular induzida por CFA em ratas, o ácido nicotínico, administrado ao longo de vários dias, induziu efeito antinociceptivo muito reduzido e não induziu efeito antiedematogênico. Em um protocolo inicial, o ácido nicotínico foi administrado repetidamente em doses que variaram entre 250 e 1000 mg/Kg. Entretanto, as doses de 750 e 1000 mg/Kg induziram mortalidade, um resultado inesperado, uma vez que a dose administrada por via oral que induz toxicidade aguda em ratos é >7000 mg/Kg (LABSYNTH, 2016). Ainda, em estudo anterior de nosso grupo de pesquisa no qual a atividade do ácido nicotínico foi avaliada em outros modelos experimentais de dor e inflamação (GODIN et al., 2012), foram utilizadas as mesmas doses e vias de administração que aquelas do presente estudo sem observação de mortalidade, embora o composto tenha sido administrado de forma aguda. A mortalidade verificada no presente estudo, em contrapartida, está de acordo com observações de outros autores como Lunaderlli e colaboradores (2004), que relataram mortalidade de 25 e 100% após administração de ácido nicotínico nas doses de 800 e 1000 mg/Kg, respectivamente. Embora a comparação entre efeitos induzidos por doses únicas e por doses repetidas não seja apropriada, os protocolos de administração aguda orientam os estudos de administrações repetidas – estes últimos sujeitos ao efeito cumulativo da substância avaliada. A mortalidade observada no presente estudo mostrou-se dose-dependente e de ocorrência tardia, o que reforça a possibilidade de toxicidade.

A administração repetida de nicotinamida não inibiu o edema, mas induziu efeito antinociceptivo mais marcante do que aquele induzido pelo ácido nicotínico no modelo de inflamação articular induzida pelo CFA em ratas. O efeito antinociceptivo foi observado após a administração de várias doses e em diferentes dias. Deve ser destacado que o tratamento prolongado com doses elevadas de nicotinamida, de forma diferente do que foi observado para o ácido nicotínico, não induziu mortalidade. Também, não são encontradas informações na literatura indicando toxicidade da nicotinamida em ensaios pré-clínicos nos quais foram usadas doses semelhantes às aquelas usadas no presente estudo. Assim, em uma análise preliminar, o perfil de segurança da nicotinamida é superior àquele do ácido nicotínico, o que justifica uma

atenção maior ao primeiro composto. Uma vez que a nicotinamida reduziu a alodínia mecânica quando o tratamento prolongado foi iniciado logo após a indução da inflamação articular, em protocolos seguintes foi investigado se esse composto inibe a alodínia mecânica quando a sensibilização já está estabelecida. Entretanto, a administração de nicotinamida, seja em dose única ou em doses repetidas, após o 12º dia da indução da inflamação articular, não induziu efeito antinociceptivo.

No modelo de inflamação articular induzida por CFA em ratas também foi avaliada a atividade do nicorandil. Tendo em vista a disponibilidade reduzida do nicorandil, foi avaliado o efeito induzido por esse composto em administração única após o estabelecimento da inflamação articular (12º dia). Embora tenha sido administrado em doses menores que a nicotinamida e após o estabelecimento da alodínia mecânica, o nicorandil induziu efeito antinociceptivo. Esses resultados, bem como outros resultados do nosso grupo (DUTRA et al., 2013; DUTRA et al., 2015), indicam que o nicorandil apresenta maior potência que a nicotinamida em modelos experimentais de dor e um perfil de maior eficácia, uma vez que induz efeito antinociceptivo mesmo quando a sensibilização já está estabelecida.

O modelo de inflamação articular induzida por CFA em ratas não se mostrou adequado para uma investigação ampla das atividades dos compostos selecionados. A condução dos protocolos é laboriosa, uma vez que avaliação dos parâmetros inflamatórios ocorre durante vários dias. Além do mais, há necessidade de quantidades mais elevadas dos compostos em investigação devido às administrações repetidas e ao uso de um animal experimental de maior porte em relação ao camundongo. Essa segunda limitação inviabilizaria a investigação do composto que inicialmente apresentava-se como o mais promissor, o nicorandil, disponível em quantidade reduzida. Assim, houve uma mudança dos modelos experimentais, que passaram a ser conduzidos em camundongos e envolvendo tratamentos com apenas uma ou duas doses dos compostos em investigação .

A injeção i.a. de CFA, zimozano e MSU induz alterações bioquímicas e celulares que simulam aquelas encontradas na AR, na OA e na AG (AMARAL et al., 2016; GUERRERO et al., 2006; LOPES et al., 2015; TORRES et al., 2009). No presente estudo, a injeção i.a. desses estímulos em camundongos induziu edema articular e alodínia mecânica que durou entre 3 e 72 h, aproximadamente. O tratamento dos animais com ácido nicotínico, nicotinamida ou nicorandil, seja em esquema de dose única ou esquema de dose dupla, variando de acordo com o modelo experimental, não inibiu ou inibiu de forma muito reduzida o edema articular induzido por CFA e MSU. O ácido nicotínico e a nicotinamida, mas não o nicorandil, inibiram em pequena extensão e de forma tardia o edema articular induzido por zimozano. Assim, em uma avaliação geral, a atividade antiedematogênica dos compostos em investigação foi reduzida nos modelos de inflamação articular usados no presente estudo.

Em relação à atividade antinociceptiva, houve diferença marcante entre as atividades dos compostos investigados. O ácido nicotínico, seja em tratamento com dose única ou com dose dupla, não alterou a alodínia mecânica induzida pelo CFA, zimozano e MSU. A nicotinamida, em tratamento com dose dupla, inibiu a alodínia mecânica induzida pelo zimozano e pelo MSU e mesmo em tratamento com dose única inibiu a alodínia mecânica induzida pelo CFA. A duração do efeito antialodínico induzido pela nicotinamida foi de aproximadamente 6 h. Por outro lado, o nicorandil, mesmo em doses menores que aquelas da nicotinamida e em única administração, inibiu de forma marcante e duradoura (até 24 h) a alodínia mecânica induzida pelos três estímulos inflamatórios. Geralmente, fármacos analgésicos não induzem efeito tão prolongado em modelos experimentais de dor (LÓPEZ et al., 2006; KREKELS et al., 2011). O efeito antinociceptivo de longa duração induzido pelo nicorandil nos modelos de inflamação articular também surpreende tendo em vista que tempo de meia-vida de eliminação do nicorandil em camundongos ser de aproximadamente 1,1 h (DUTRA et al., 2012). No entanto, há estudos indicando que outras drogas ou fármacos que apresentam tempo de meia vida de eliminação curto podem induzir efeito antinociceptivo de longa duração, mesmo após a administração de dose única. Ferreira e colaboradores (1990) e Reis & Rocha (2006) demonstraram que a atividade anti-hiperalgésica da dipirona em

modelos experimentais de dor neuropática e hiperalgisia induzida por PGE₂ ou dopamina é de longa duração, mesmo após administração única. Esse efeito de longa duração, de até duas semanas, também foi observado após a infusão regional de dipirona em pacientes com dores crônicas (MARQUEZ & FERREIRA, 1987). Assim como a dipirona, o nicorandil pode promover um efeito antinociceptivo de longa duração, bastante superior ao tempo de meia-vida de eliminação do fármaco, um resultado que justifica investigações adicionais.

Em modelos experimentais de dor e inflamação agudas induzidas pela injeção intraplantar de carragenina ou formaldeído, o ácido nicotínico, a nicotinamida e o nicorandil apresentaram atividades antinociceptiva e antiedemetogênica (DUTRA et al., 2013; GODIN et al., 2011; GODIN et al., 2012), sendo que o nicorandil apresentou maior potência e induziu efeitos marcantes com dose única. Apesar de pequenas diferenças entre os resultados desses estudos e resultados do presente estudo, a análise conjunta dos mesmos indica que o nicorandil apresenta maior potência que a nicotinamida e uma atividade antinociceptiva mais consistente, caracterizada por uma duração maior. O nicorandil, o composto que apresentou atividade mais consistente, é uma molécula cuja estrutura é representada pelo acoplamento de um grupo doador de NO à nicotinamida e teve sua atividade antinociceptiva demonstrada por nosso grupo (DUTRA et al., 2013). A análise conjunta dos resultados também indica, por outro lado, que dos três compostos avaliados, o ácido nicotínico é aquele que apresenta a menor atividade em modelos de inflamação.

A demonstração da atividade antialodínica da nicotinamida e do nicorandil em modelos de inflamação articular é relevante, pois a dor é um componente importante no curso da AR, da OA e da AG, sendo justificada a investigação de novos fármacos analgésicos para tratamento de pacientes acometidos por essas doenças (YU et al., 2002). Essa investigação se insere na estratégia de identificação de novas funções para fármacos conhecidos e em uso (BASTOS & COELHO, 2014; CHONG & SULLIVAN, 2007), uma vez que a nicotinamida é tradicionalmente usada por pacientes com deficiências vitamínicas e apresenta um perfil de segurança positivo (MARCUS &

COULSTON, 2001) e bem estabelecido e o nicorandil é fármaco aprovado em vários países para o tratamento de pacientes com doença cardíaca isquêmica (EL-MOSELBY et al., 2009; FRAMPTON et al., 1992).

Uma vez demonstrada a atividade antinociceptiva da nicotinamida e do nicorandil em modelos de inflamação articular induzida por CFA, zimosano e MSU, foram investigados os mecanismos que poderiam estar envolvidos nessa atividade. Foram avaliados os efeitos induzidos por esses compostos sobre o recrutamento celular, de forma direta ou indireta, a produção de citocinas e quimiocinas e a atividade do sistema opioidérgico endógeno.

No modelo de inflamação articular induzida por CFA em ratas, o tratamento prolongado com a nicotinamida reduziu a concentração de TNF- α no tecido da pata. Tendo em vista que esse modelo de inflamação articular mostrou-se inadequado para uma investigação ampla das atividades dos compostos selecionados, a investigação dos mecanismos que poderiam mediar a atividade antialodínica da nicotinamida e do nicorandil também foi realizada nos modelos de inflamação induzida pela injeção i.a. de CFA, zimosano ou MSU em camundongos.

A injeção i.a. de zimosano ou MSU induziu recrutamento celular marcante, avaliado de forma direta no lavado articular 6 h após. O recrutamento foi representado majoritariamente por neutrófilos, assim como demonstrado em outros estudos (AMARAL et al., 2016; FRASNELLI et al., 2005; GUERRERO et al., 2006), embora também tenha ocorrido recrutamento de células mononucleares. A atividade da MPO no tecido periarticular, um indicador do recrutamento de neutrófilos para o tecido (KLEBANOFF, 1999; KLEBANOFF et al., 2013; LANZA, 1998) também foi aumentada após a injeção i.a. de zimosano e MSU. Por outro lado, o recrutamento de neutrófilos induzido pelo CFA foi de magnitude muito menor que aquele induzido por zimosano ou MSU. Alguns estudos demonstram que um recrutamento celular mais marcante induzido pelo CFA geralmente ocorre mais tardiamente (KEEBLE et al., 2005). Entretanto, a avaliação do recrutamento na 6ª h após a injeção de CFA foi mantida por

que a nicotinamida e o nicorandil induziram efeito antinociceptivo marcante nesse momento.

O tratamento com dose única de nicorandil ou com dose dupla de nicotinamida inibiu de forma marcante o recrutamento celular no lavado articular, seja de leucócitos totais ou de neutrófilos, induzido por zimozano ou MSU, avaliado na 6^a h após a injeção dos estímulos inflamatórios. A atividade da MPO no tecido periarticular também foi reduzida pelo tratamento com nicorandil ou nicotinamida, um resultado que reforça as observações anteriores. Os resultados indicam que a nicotinamida e o nicorandil induzem efeito marcante sobre o recrutamento celular para a articulação onde ocorre o processo inflamatório, resultando em menor acúmulo de neutrófilos no líquido sinovial e no tecido periarticular.

A inibição do recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório pode representar um mecanismo importante que contribui para a atividade antinociceptiva do nicorandil e da nicotinamida nos modelos de inflamação articular induzida por zimozano e MSU. Resultados obtidos por outros pesquisadores corroboram os resultados do presente estudo. A nicotinamida (CUZZOCREA et al., 1999) e o nicorandil (FERREIRA et al. 2012; MATSUI et al., 2015) inibem a migração de neutrófilos induzida por zimozano, carragenina, IL-8 e leucotrieno B₄ em outros modelos de inflamação. Os neutrófilos são células que têm papel relevante na resposta imune inata, amplificando a inflamação aguda por meio da produção e liberação de múltiplos mediadores inflamatórios. Há demonstração de que a diminuição do número de neutrófilos está associada à redução da duração e da intensidade da resposta inflamatória, como observado em modelo de lesão pulmonar induzida por endotoxina em ratos (NAGAI et al., 1994). Entretanto, deve ser salientado que a inibição do recrutamento de neutrófilos não é um mecanismo essencial para a atividade da nicotinamida e do nicorandil em qualquer modelo de dor. No modelo de inflamação articular induzida por CFA, modelo no qual não houve recrutamento expressivo de neutrófilos no momento analisado, tanto a nicotinamida quanto o nicorandil induziram efeito antinociceptivo.

Também há evidências de que os neutrófilos exercem papel crucial na sensibilização de nociceptores em diferentes modelos de dor. Em modelos de dor neuropática induzida por lesão de nervos, os neutrófilos se acumulam no local da lesão (PERKINS & TRACEY, 2000), bem como no gânglio da raiz dorsal (MORIN et al., 2007). A sensibilização observada nesses modelos é atenuada por meio do bloqueio da migração de neutrófilos (OLIVEIRA et al., 2008) ou por depleção dessas células precedendo a lesão do nervo (PERKINS & TRACEY, 2000). Há evidências do papel de neutrófilos na sensibilização observada em outros modelos de dor. A hiperalgesia mecânica em modelo de dor incisional em ratos é atenuada pela depleção dessas células precedendo a lesão (CARREIRA et al., 2013). Em um modelo de dor articular induzida por zimozano, a hiperalgesia mecânica é atenuada pela administração de anticorpos anti-neutrófilos (GUERRERO et al., 2008). Em um modelo de dor inflamatória induzida por carragenina, a hiperalgesia mecânica é atenuada pelo tratamento prévio com fucoidina, um inibidor da adesão de leucócitos (CUNHA et al., 2008).

Em seguida, foi investigado o efeito induzido pela nicotinamida e pelo nicorandil sobre a produção de citocinas e quimiocinas que têm papel importante na inflamação articular induzida por diferentes estímulos inflamatórios. Muitos mediadores, incluindo incluindo TNF- α , IL-1, IL-6, GM-CSF e CXCL-1 (FUGGLE et al., 2014; TAYLOR et al., 2010) bem como mediadores de natureza lipídica como os eicosanoides, têm suas produções aumentadas durante a inflamação articular. Em conjunto, essas mediadores induzem alodínia e hiperalgesia, promovem a migração celular, edema e destruição tecidual. No presente estudo, foram selecionados os modelos de inflamação articular induzida por zimozano e MSU, uma vez que nesses modelos a inflamação foi associada a um recrutamento celular mais marcante. A injeção i.a. de zimozano induziu um aumento marcante das concentrações de TNF- α e CXCL-1 no tecido periarticular. No modelo de inflamação articular induzida por MSU, houve um aumento marcante das concentrações de IL-1 β e CXCL-1. Esses mediadores foram escolhidos uma vez que outros estudos demonstraram que TNF- α e IL-1 β têm papel importante nas inflamações induzidas por zimozano e MSU, respectivamente, enquanto a quimiocina CXCL-1 tem

papel importante nas inflamações induzidas por ambos os estímulos (AMARAL et al., 2016; GUERRERO et al., 2012).

O tratamento dos animais com a nicotinamida ou o nicorandil, embora não tenha reduzido as concentrações de TNF- α e CXCL-1 no modelo de inflamação articular induzida por zimozano, reduziu de forma marcante as concentrações de IL-1 β e CXCL-1 no modelo de inflamação articular induzida por MSU. Um aspecto inesperado foi o efeito diferencial induzido pela nicotinamida e pelo nicorandil sobre a produção de CXCL-1 nos modelos de inflamação articular induzida por zimozano e MSU. Entretanto, há resultados de outros estudos indicando que outros compostos podem afetar de formas diferentes a produção da mesma citocina quando há variação do estímulo ou da célula/tecido que produz essa citocina (DI SANTO et al., 1997; ROCHFORD et al., 2004; ROCKWELL E QURESHI, 2010; SCHANDENÉ et al., 1992;).

A inibição da produção de IL-1 β e CXCL-1 pode representar um mecanismo importante que contribui para a atividade antinociceptiva do nicorandil e da nicotinamida no modelo de inflamação articular induzida por MSU. Nesse modelo, a IL-1 β tem papel importante na sensibilização a um estímulo mecânico, uma vez que essa resposta é atenuada em animais deficientes para esta citocina (AMARAL et al., 2012). A IL-1 β também tem papel importante na facilitação da resposta nociceptiva induzida por outros estímulos inflamatórios. Esse papel tem sido demonstrado por meio do uso de anticorpos ou antagonista de receptores para essa citocina, intervenção que inibe a alodínia mecânica em modelos de dor inflamatória (BIANCHI et al., 1998; CUNHA et al., 2000; SCHAFFER, 2003; LI et al., 2007). A inibição da produção de CXCL-1 também pode contribuir para o efeito inibitório induzido pela nicotinamida e pelo nicorandil sobre o recrutamento de neutrófilos no modelo de inflamação articular induzida por MSU. Há estudos demonstrando o papel dessa quimiocina no recrutamento de neutrófilos induzido por diferentes estímulos inflamatórios (AMARAL et al., 2016; GUERRERO et al., 2012). Embora o papel da CXCL-1 na alodínia mecânica não tenha sido demonstrado, é possível que a inibição da produção dessa quimiocina no modelo de inflamação articular contribua para a atividade antinociceptiva da nicotinamida e do

nicorandil. Há evidências de que a CXCL-1 facilita o processamento nociceptivo em modelos de dor neuropática (ZHANG et al., 2013) e também em modelos de dor inflamatória (CAO et al., 2014).

Tendo em vista que o nicorandil foi o composto que apresentou a atividade antinociceptiva mais marcante e também que há resultados indicando que a ativação de mecanismos opioides é relevante para a sua atividade no modelo de resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído (DUTRA et al., 2015), foi investigado se a ativação de mecanismos opioides também mediará a atividade do nicorandil em um modelo de inflamação articular. A base racional para essa investigação deriva da demonstração de que o nicorandil (BARBATO, 2000; KUKOVETZ et al., 1992; SIMPSON & WELLINGTON, 2004; YASUDA et al., 2001), bem como agonistas de diferentes receptores opioides (AMARANTE et al, 2004; DUARTE & FERREIRA, 1991), ativam a guanilato ciclase, enquanto inibidores dessa enzima atenuam a atividade antinociceptiva de analgésicos opioides (DUARTE et al, 1992; FERREIRA et al., 1991) e também do nicorandil (DUTRA et al., 2015).

De forma semelhante ao que foi observado no modelo de resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído, a atividade antinociceptiva do nicorandil no modelo de inflamação articular induzida por zimozano foi atenuada pelo tratamento prévio dos animais com naltrexona, um antagonista opioide não seletivo. Uma revisão da literatura não fornece informações sobre o efeito induzido pelo nicorandil sobre a produção e a liberação de peptídeos opioides endógenos. Embora outros doadores de NO possam estimular a liberação desses peptídeos (JOHNSTON & MORRIS, 1994; ARMSTEAD, 1998), não é possível associar imediatamente esse efeito ao nicorandil. Há evidências de que o nicorandil, apesar de ser um fármaco que libera NO, apresenta muitas diferenças em relação a outros fármacos ou drogas que também liberam NO, particularmente os nitratos orgânicos. A avaliação da atividade antinociceptiva do nicorandil no modelo de resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído indica que o NO não parece ser um mediador absolutamente necessário para essa atividade (DUTRA et al., 2013). Em estudos nos quais se investigou os efeitos induzidos pelo nicorandil sobre o sistema

cardiovascular, foi demonstrado que esse fármaco também apresenta diferenças evidentes em relação aos nitratos orgânicos mais conhecidos (nitroglicerina, nitroprussiato de sódio, mono e dinitrato de isossorbida), possivelmente por sua capacidade de também proporcionar a abertura de canais para potássio, uma atividade que parece estar ligada à porção nicotinamida da molécula do fármaco (EDWARDS & WESTON, 1990; TAIRA, 1987). Esses resultados, analisados de forma conjunta, indicam a complexidade dos mecanismos associados aos efeitos induzidos pelo nicorandil, um fármaco que, apesar de ser um doador de NO, não tem comportamento idêntico àquele dos nitratos orgânicos tradicionais.

Em conclusão, foi observado que a nicotinamida e o nicorandil, principalmente, apresentam atividade antinociceptiva em modelos de inflamação articular induzida por CFA, zimozano e MSU. A atividade antinociceptiva pode estar associada à redução do recrutamento celular e da produção de citocinas e quimiocinas, bem como à ativação de mecanismos opioidérgicos endógenos. Deve ser destacado o efeito antinociceptivo de longa duração induzido por administração única do nicorandil em todos os modelos de inflamação articular, um efeito que não é usualmente observado para outros fármacos analgésicos.

PERSPECTIVAS

Os resultados do presente estudo indicam que a nicotinamida e, principalmente, o nicorandil são fármacos que podem ser investigados visando ao alívio da dor em pacientes com doenças articulares como AR, OA e AG. Embora não tenha sido investigado o efeito induzido por esses fármacos sobre a destruição tecidual e a progressão da inflamação articular, a atividade antinociceptiva marcante, associada a uma redução do recrutamento celular e da produção de citocinas e quimiocinas no modelo de inflamação articular induzida por MSU, levam à sugestão de que a nicotinamida e o nicorandil podem ser particularmente úteis no tratamento de pacientes com AG. Assim, investigações mais amplas das atividades desses fármacos em modelos de AG, incluindo os efeitos sobre as alterações histológicas e a progressão da

doença, são justificadas. Mesmo que não sejam demonstrados efeitos sobre a destruição tecidual e a progressão das doenças, a expectativa de uma analgesia prolongada, como no caso do nicorandil, bem como o bom perfil de segurança desse fármaco, justifica a realização de estudos clínicos em pacientes com AR, OA e AG, tendo em vista que a dor é o sintoma que mais causa desconforto a esses pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELL, J. E.; HOOTMAN, J. M.; ZAC, M. M.; MORIARTY, D.; HELMICK, C. G. Physical activity and health related quality of life among people with arthritis. *J. Epidemiol. Community Health*, London, v. 59, n. 5, p. 380-385, may 2005.
- AGENCY FOR HEALTHCARE RESEARCH AND QUALITY (AHRQ). Management of gout – Comparative effectiveness review. Effective Health Care Program, Santa Monica, n. 176, mar. 2016.
- ALTSCHUL, R.; HOFFER, A.; STEPHEN, J. D. Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v. 54, n.2, p.558-559, feb. 1955.
- 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- α is sufficient for articular inflammation and hypernociception in a mouse model of gout. *Eur. J. Immunol.*, Weinheim, v. 46, n. 1, p.204-211, jan. 2016.
- AMARAL, F. A.; COSTA V. V.; TAVARES, L.D.; SACHS, D.; COELHO, F. M.; FAGUNDES, C. T.; SORIANI, F. M.; SILVEIRA, T. N.; CUNHA, L. D.; ZAMBONI, D. S.; QUESNIAUX, V.; PERES, R. S.; CUNHA, T. M.; CUNHA, F. Q.; RYFFEL, B.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in murine model of gout. *Arthritis Rheumatol.*, Atlanta, v. 64, n. 2, p. 474-484, feb. 2012.
- AMARANTE, L. H.; ALVEZ, D. P.; DUARTE, I. D. Study of the involvement of K⁺ channels in the peripheral antinociception of the kappa-opioid receptor agonist bremazocine. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 494, n. 2-3, p. 155-160, jun. 2004.
- ARMSTEAD, W. M. Nitric oxide contributes to opioid release from glia during hypoxia. *Brain Res.*, Amsterdam, v. 813, n. 2, p. 398-401, dec. 1998.
- ASQUITH, D. L., MILLER, A. M., McINNIS, I. B., LIEW, F. Y. Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.*, Weinheim, v. 39, n. 8, p. 2040-2044, aug. 2009.
- BAGATINI, F.; BLATT, C. R.; MALISKA, G.; TRESPASH, G. V.; PEREIRA, I. A.; ZIMMERMANN, A. F.; STORB, B. H.; FARIAS, M. R. Potential drug interactions in patients with rheumatoid arthritis. *Rev. Bras. Reumatol.*, São Paulo, v. 51, n. 1, p. 20-39, Feb. 2011.
- BARBATO, J.C. Nicorandil – The drug that keeps on giving. *Hypertension*, Cleveland, v. 46, p. 647-648, sep. 2005.
- BARTOK, B.; FIRESTEIN, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *J. Inflamm (Lond)*, London, v. 4, n. 13, p. 233-255, jun. 2007.
- BARTON, N. J.; STEVENS, D. A.; HUGHES, J. P. ROSSI, A. G.; CHESSEL, I. P.; REEVE, A. J.; McQUEEN, D. S. Demonstration of a novel technique to quantitatively assess inflammatory mediators and cells in rat knee joints. *J. Inflamm. (Lond)*, London, v. 4, n. 13, jun.2007.
- BASTOS, L. F. S.; COELHO, M. M. Drug repositioning: playing dirty to kill pain. *CNS Drugs*, Auckland, v. 1, p. 45-61, jan. 2014.
- BAUEROVA, K.; PAULOVICOVA, E.; MIHALOVA, D.; DRAFI, F.; STROSOVA, M.; MASCIA, C.; BIASI, F.; ROVENSKY, J.; KUCHARSKA, J.; GVOZDJAKOVA, A.; PONIST S. Combined methotrexate and coenzyme Q10 therapy in adjuvant-induced arthritis evaluated using parameters of inflammation and oxidative stress. *Acta Biochim. Pol.*, Warszawa, v. 57, n. 1-2, p. 347-354, sep. 2010.

- BAXTER, T. Pyridoxine-dependent seizures: a clinical and biochemical conundrum. *Biochem. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 1647, n. 1-2, p. 36-41, apr. 2003.
- BENNET, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 87-107, apr. 1988.
- BERNATSKY S.; HUDSON, M.; SUISSA, S. Anti-rheumatic drug use and risk of serious infections in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, Montreal, v. 46, n. 7, p. 1157-1160, may 2007.
- BERTOLO M. B.; BRENOL C. V.; SCHAIMBERG G. C.; NEUBARTH F.; LIMA F. A. C. D.; LAURINDO I. M. Atualização do consenso brasileiro no diagnóstico e tratamento da Artrite Reumatoide, *Rev. Bras. Reumatol.*, São Paulo, v. 47, p.151-159, 2007.
- BIANCHI, M.; DIB, B.; PANERAI, A. E. Interleukin-1 and nociception in the rat. *J. Neurosci. Res.*, New York, v. 53, n. 6, p. 645-650, sep. 1998.
- BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's Adjuvant in experimental models of autoimmune disease. *J. Leukoc. Biol.*, New York, v. 70, n. 6, p. 846-860, dec. 2001.
- BLUMBERG, S. N.; FOX, D. A. Rheumatoid Arthritis: guidelines of emerging therapies. *Am. J. Manag. Care*. Plainsboro, v.7, n.6, p. 617-626, jun. 2001.
- BOEHNKE, C.; REUTER, U.; FLACH, U.; SCHUH-HOFER, S.; EINHÄUPL, K. M.; ARNOLD, G. High-dose riboflavin treatment is efficacious in migraine prophylaxis: an open study in a tertiary care centre. *Eur. J. Neurol.*, Oxford, v. 11, n. 7, p. 475-477, jul.2004.
- BRANDÃO L., FERRAZ, M. B., ZERBINI, C. A. F. Evaluation of quality of life in rheumatoid arthritis. *Rev. Bras. Reumatol.*, São Paulo, v. 37, n. 5, p. 275-281, oct.1997.
- BRENOL, C. V., MONTICIELO O. A., XAVIER R. M., BRENOL J. C. T. Artrite Reumatoide e Aterosclerose. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, Porto Alegre, v. 53, n. 5, p. 465-470, 2007.
- CAI, X.; WONG, Y. F.; ZHOU, H.; LIU, Z. Q.; XIE, Y.; JIANG, Z. H.; BIAN, Z. X.; XU, H. X.; LIU, L. Manipulation of the induction of adjuvant arthritis in Sprague-Dawley rats. *Inflamm. Res.*, Basel, v. 55, p.368-377, 2006.
- CAO, D. L.; ZHANG, Z. J.; XIE, R. G.; JIANG, R. R.; GAO, Y. J. Chemokine CXCL1 enhances inflammatory pain and decreases NMDA receptor activity and COX-2 expression in spinal cord neurons via CXCR2. *Exp. Neurol.*, Orlando, v. 216, p. 328-336, nov. 2014.
- CANNON, G. W.; WOODS M. L.; CLAYTON, F.; GRIFFITHS, M. M. Induction of arthritis in DA rats by Incomplete Freund's Adjuvant. *J. Rheumatol.*, Toronto, v. 20, n.7, 1993.
- CARREIRA, E. U.; CARREGARO, V.; TEIXEIRA, M. M.; MORICONI, A.; ARAMINI, A.; VERRI, W. A. Jr; FERREIRA S. H.; CUNHA, F. Q.; CUNHA, T. M. Neutrophils recruited by CXCR1/2 signalling mediate post-incisional pain. *Eur. J. Pain*, London, v. 17, n. 5, p. 654-663, may 2013.
- CARVALHO, M. R. P.; SALLES, C. A. F.; TEBEXERINI, A. S.; BARROS NETO, T. L.; CONFESSOR, Y. Q.; NATOUR, J. Artrite reumatóide: treinamento cardiovascular. *Rev. Bras. Reumatol.*, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 77-80, apr.2000.
- CHOI, H. K.; HERNAN, M. A.; SEEGER, J. D.; ROBINS, J. M.; WOLFE, F. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Lancet*, London, v. 359, n. 9313, p. 1173-1177, apr. 2002.

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

CLEMENTZ, G. L.; HOLMES, A. W. Nicotinic acid induced fulminant hepatic failure. *J. Clin. Gastroenterol.*, New York, v. 9, n. 5, p. 582-584, oct. 1987.

COIMBRA, I. B.; PASTOR, E. H.; GREVE, J. M. D.; PUCCINELLI, M. C.; FULLER, R.; CAVALCANTI, F. S.; MACIEL, F. M. B.; HONDA, E. Consenso brasileiro para tratamento de osteoartrite (artrose). *Rev. Bras. Reumatol.*, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 371-374, nov. 2002.

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

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

COSTELLO, J. C.; HALVERSON, P. B. A new era in rheumatoid arthritis treatment. *W.M.J.*, Madison, v. 102, n. 7, p. 29-33, 2003.

CUNHA, J. M.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 130, n. 6, p. 1418-1424, jul. 2000.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. Jr; VALÉRIO, D. A.; GUERRERO, A. T.; NOGUEIRA, L. G.; VIEIRA, S. M.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Role of cytokines in mediating mechanical hypernociception in a model of delayed-type hypersensitivity in mice. *Eur. J. Pain*, London, v. 12, n. 8, p. 1059-1068, nov. 2008.

CUZZOCREA, S.; SAUTEBIN, L.; COSTANTINO, G.; ROMBOLÀ, L., EMANUELA, M.; CAPUTI, A. P. Regulation of prostaglandin production by inhibition of poly (ADP-ribose) synthase in carrageenan-induced pleurisy. *Life Sci.*, Oxford, v. 65, n. 12, p. 1297-1304, oct. 1999.

DALBETH, N.; MERRIMA, T. R.; STAMP, L. K. Gout. *Lancet*, London, S0140-6736(16)00346-9. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00346-9. [Epub ahead of print]. apr., 2016.

DAVIES, N. M.; ROSETH, A. G.; APPLEVAR, C. B.; McKNIGHT, W.; DEL SOLDATO, P.; CALIGNANO, A.; CIRINO, G.; WALLACE, J. L. NO-naproxen vs. naproxen: ulcerogenic and anti-inflammatory effects. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, Oxford, v. 11, n1, p. 69-79, feb. 1997.

DEKKER, J.; VAN DIJK, G. M.; VEENHOF, C. Risk factors for functional decline in osteoarthritis of the hip or knee. *Curr. Opin. Rheumatol.*, Philadelphia, v. 21, n. 5, p. 520-524, sep. 2009.

DI SANTO, E.; ALONZI, T.; POLI, V.; FATTORI, E.; TONIATTI, C.; SIRONI, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; GHEZZI, P. Differential effects of IL-6 on systemic and central production of TNF: a study with IL-6 deficient mice. *Cytokine*, Philadelphia, v. 9, n. 5, p. 300-306, may 1997.

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

DUARTE, I. D.; DOS SANTOS, I. R.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 217, n. 2-3, p. 225-227, jul. 1992.

DUARTE, I. D.; FERREIRA S. H. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 221, n. 1, p. 171-174, oct. 1992.

DUTRA, M. M. G. B. Atividade antinociceptiva do nicorandil e seus possíveis mecanismos de ação. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas/UFMG, Belo Horizonte, 2012. 75 p.

DUTRA, M. M. G. B., GODIN, A. M., CÉSAR, I. C., NASCIMENTO Jr., E. B., MENEZES, R. R., FERREIRA, W., SOARES, D. G., SENIUK, J. G. T., ARAÚJO, D. P., BASTOS, L. F. S., PIANETTI, G. A., DE FÁTIMA, A., MACHADO, R. R., COELHO, M. M. Activity of nicorandil, a nicotinamide derivative with a nitrate group, in the experimental model of pain induced by formaldehyde in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Phoenix, v. 106, p. 85-90, may 2013.

DUTRA, M. M. G. B.; NASCIMENTO JUNIOR, E. B.; GODIN, A. M.; BRITO, A. M. S.; MELO, I. S.; AUGUSTO, P. S.; RODRIGUES, F. F.; ARAUJO, D. P.; DE FÁTIMA, A.; COELHO, M. M.; MACHADO, R. R. Opioid pathways activation of nicorandil mediates the activity of nicorandil in experimental models of nociceptive and inflammatory pain. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 768, p. 160-164, dec. 2015.

EDWARDS, G.; WESTON, A. H. Structure-activity relationships of K⁺ channel openers. *Trends Pharmacol. Sci.*, Amsterdam, v. 11, n. 10, p. 417-422, oct. 1990.

ELLIS, J.M.; FOLKERS, K.; LEVY, M.; SHIZUKUISHI, S.; LEWANDOWSKI, J.; NISHII, S.; SCHUBERT, H.A.; ULRICH, R. Response of vitamin-B6 deficiency and the carpal tunnel syndrome to pyridoxine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, v. 79, n. 4, p. 7494-7498, apr. 1982.

EL-MOSELBY, M. A.; ABDEL-HAMID, N. M.; ABDEL-RAHEIM, S. R. Gastroprotective effect in indomethacin and alcohol-induced acute ulcers. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, New York, v. 152, n. 3, p. 449-459, mar 2009.

EPINAT, J. C.; GILMORE, T. D. Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF-kappaB signal transduction pathway. *Oncogene*, Basingstoke, v. 18, n. 49, p. 6896-6909, nov. 1999.

FERREIRA, R. G.; MATSUI, T. C.; GODIN, A. M.; GOMIDES, L. F.; PEREIRA-SILVA, P.E.; DUARTE, I. D.; MENEZES, G. B.; COELHO, M. M.; KLEIN, A. Neutrophil recruitment is inhibited by nicotinamide in experimental pleurisy in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 685, n. 1-3, p. 198-204, jun. 2015.

FERREIRA, S. H.; DUARTE, I. D.; LORENZETTI, B. B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 201, n. 1, p. 121-122, aug. 1991.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; DE CAMPOS, D. I. Induction, blockade and restoration of a persistente hypersensitive state. *Pain*, Amsterdam, v. 42, n. 3, p. 365-371, sep. 1990.

FINGER, E.; SCHEINBERG M. A. Rituximab (Mabthera), a new approach for the treatment of rheumatoid arthritis. A systematic review. *Einstein*, São Paulo, v. 5, n. 4, p. 378-386, Out. 2007.

FOLKERS, K.; WOLANIUK, A.; VADHANAVIKIT, S. Enzymology of the response of the carpal tunnel syndrome to riboflavin and to combined riboflavin and pyridoxine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, v. 81, n. 22, p. 7076-7078, nov. 1984.

FONSECA, M. D.; CUNHA, F. C.; KASHFI, K.; CUNHA, T. C. NOSH-aspirin (NBS-1120), a dual nitric oxide and hydrogen sulfide-releasing hybrid, reduces inflammatory pain. *Pharmacol. Res. Perspect.*, Hoboken, v. 3, n. 3, e00133, p. 1-12, jun. 2015.

FORTI N. Tratamento medicamentoso das dislipidemias primárias. *Rev. SOCESP*, São Paulo, v. 10, n. 6, p. 780-789, 2000.

FOX D. A. Etiology and Pathogenesis. *Arthritis and Allied conditions: a textbook of rheumatology*. 14th ed. Lippincott: Williams & Wilkins, Philadelphia, p.1085-1102. 2001.

FRAMPTON, J.; BUCKLEY, M. M.; FITTON, A. Nicorandil: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in angina pectoris. *Drugs*, Auckland, v. 44, n. 4, p. 625-655, oct. 1992.

FRASNELLI, M. E., TARUSSIO, D., CHOBAN-PÉCLAT, V., BUSSO, N., SO, A. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. *Arthritis Res. Ther.*, London, v. 7, n. 2, R370-379, jan. 2005.

FUGGLE, N. R., HOWE, F. A., SOFAT, N. New insights into the impact of neuro-inflammation in rheumatoid arthritis. *Front Neurosci.*, Lausanne, v. 6, n. 8, p. 357, nov. 2014.

FURNERI, G.; MANTOVANI, L. G.; BELISARI, A.; MOSCA, M.; CRITIANI, M.; BELLELLI, S.; CORTESI, P. A.; TURCHETTI, G. Systematic literature review on economic implications and pharmacoeconomic issues of rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, v. 4, suppl. 73 (S72-S84), jul-ago. 2012..

GALE, E. A.; BINGLEY, P. J.; EMMETT, C. L.; COLLIER, T.; EUROPEAN NICOTINAMIDE DIABETES INTERVENTION TRIAL (ENDIT) GROUP. European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT): a randomized controlled trial of intervention before the onset of type 1 diabetes. *Lancet*, London, v. 363, n. 9413, p. 925-931, mar. 2004.

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

GODIN, A. M.; FERREIRA, W. C.; ROCHA, L. T.; FERREIRA, R. G.; PAIVA, A. L.; MERLO, L. A.; NASCIMENTO E. B. Jr; BASTOS, L. F.; COELHO, M. M. Nicotinic acid induces antinociceptive and anti-inflammatory effects in different experimental models. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Phoenix, v. 101, n. 3, p. 496-498, may, 2012.

GODIN, A. M.; FERREIRA, W. C.; SENIUK, J. G.; PAIVA, A. L.; MERLO, L. A.; NASCIMENTO JUNIOR, E. B.; BASTOS, L. F.; COELHO, M. M. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of nicotinamide and its isomers in different experimental models. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Phoenix, v. 99, n. 4, p. 782-788, oct. 2011.

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

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

GRILLI, M.; PIZZI, M.; MEMO, M.; SPANO, P. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-kappaB activation. *Science*, New York, v. 274, n. 5291, p. 1383-1385, nov. 1996.

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

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 zymosan-induced joint hypernociception in mice: participation of TNF- α , IL-1 β and CXCL1/KC. *Eur. J. Pharmacol.*, London, v. 674, n. 1, p. 51-57, jan. 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 tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Phoenix, v. 84, n. 2, p.244-251, jun. 2006.

GUERRERO, A. T. G.; VERRI JR., W. A.; CUNHA, T. M.; SILVA, T. A.; SCHIVO, I.R.; DAL-SECCO, D.; CANETTI, C.; ROCHA, F.A.; PARADA, C. A.; CUNHA F. Q.; FERREIRA, S. H. Involvement of LTB4 in zymozan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE2. *J. Leukoc. Biol.*, New York, v. 83, n. 1, p. 122-130, jan 2008.

GRANGE, P. A.; RAINGEAUD, J.; CALVEZ, V.; DUPIN, N. Nicotinamide inhibits *Propionibacterium acnes*-induced IL-8 production in keratinocytes through the NF-kappaB and MAPK pathways. *J. Dermatol. Sci.*, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 106-112, nov. 2009.

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

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

HOCHBERG, M. C.; ALTMAN, R. D.; APRIL, K. T.; BENKHALTI, M.; GUYATT, G.; MCGOWAN, J.; TOWHEED, T.; WELCH, V.; WELLS, G.; AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip and knee. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, Hoboken, v. 64, n. 4, p. 465-474, apr. 2012.

HOFFER, A. Treatment of arthritis by nicotinic acid and nicotinamide. *Can. Med. Assoc. J.*, Toronto, v. 81, p. 235-238, aug, 1959.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE- Censo demográfico 2010: Características da população e dos domicílios – Resultados do Universo. Disponível em: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/93/cd_2010_caracteristicas_populacao_domicilios.pdf Acesso em: 09 de março de 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE- Indicadores sociodemográficos e de saúde no Brasil. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/indic_sociosaude/2009/indicosaude.pdf. Acesso em: 09 de março de 2012.

IONA STUDY GROUP, THE – Trial to show the impact of nicorandil in angina (IONA): Design, methodology and management. *Lancet*, London v. 359, n. 9314, p. 1269-1275, apr. 2002.

JOHNSTON, H. M.; MORRIS, B. J. Nitric oxide alters proenkephalin and prodynorphin gene expression in hippocampal granule cells. *Neuroscience*, New York, v. 61, n. 3, p. 435-439, aug. 1994.

JONAS, W. B.; RAPOZA, C. P.; BLAIR, W. F. The effect of niacinamide on osteoarthritis: a pilot study. *Inflamm. Res.*, Basel, v. 45, n. 7, p. 330-334, jul. 1996.

KALUNIAN, K.C. Clinical manifestations of osteoarthritis. UpToDate. Disponível em: http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-of-osteoarthritis?source=see_link . Jun., 2013. Acesso em 2 de maio de 2016.

KASAMA, T.; ISOZAKI, T.; TAKAHASHI, R.; MIWA, Y. Clinical effects of tocilizumab on cytokines and immunological factors in patients with rheumatoid arthritis. *Int. Immunopharmacol.* Amsterdam, v. 35, p. 301-306, jun. 2016.

KEEBLE, J.; BLADES, M.; PITZALIS, C.; CASTRO DA ROCHA F., A.; BRAIN, S.D. The role of substance P in microvascular responses in murine joint inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 144, n. 8, p. 1059-1066, apr. 2005.

KEEBLE, J.E.; MOORE, P.K. Pharmacology and potential therapeutic applications of nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory and related nitric oxide-donating drugs. *Br. J. Pharmacol.*, London, v.137, n. 3, p.295-310, oct. 2002.

KREKELS, E. H.; ANGESJO, M.; SJOGREN, I.; MOLLER, K. A.; BERGE, O. G.; VISSER, S. A. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of inhibitory effects of naproxen on the time-courses of inflammatory pain. *Pharm. Res.*, New York, v. 28, n. 7, p. 1561-1576, jul. 2011.

KUKOVETZ, W. R.; HOLZMANN, S.; PÖCH, G. Molecular mechanism of action of nicorandil. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, New York, v. 20, suppl. 3, feb.1992.

KEENE, D., PRICE, C., SHUN-SHIN, M. J., FRANCIS D. P. Effect on cardiovascular risk of high density lipoprotein targeted drug treatments **niacin**, fibrates, and CETP inhibitors: meta-analysis of randomised controlled trials including 117,411 patients. *BMJ*, London, v. 349, g4379, jul 2014.

KHANNA, D.; FITZGERALD, J. D.; KHANNA, P. P.; BAE, S.; SINGH, M. K.; NEOGI, T.; PILLINGER, M. H.; MERILL, J.; LEE, S.; PRAKASH, S.; KALDAS, M.; GOGIA, M.; PEREZ-RUIZ, F.; TAYLOR, W.; LIOTE, F.; CHOI, H.; SINGH, J. A.; DALBETH, N.; KAPLAN, S.; NIYYAR, V.; JONES, D.; YAROW, S. A.; ROESSLER, B.; KERR, G.; KING, C.; LEVY, G.; FURST, D. E.; EDWARDS, N. L.; MANDELL, B.; SCHUMACHER, H. R.; ROBBINS, M.; WENGER, N.; TERKELTAUB, R. 2012 American College of Rheumatology – Guidelines for management of gout: Systematic nonpharmacologic and pharmacologic approaches to hyperuricemia. *Arthritis Care Research*, LOCAL, v. 64, n. 10, p. 1431-1446, 2012.

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

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, Cambridge, v. 111, n. 5, p. 383-389, sep. 1999.

KLEBANOFF, S. J.; KETTLE, A., J.; ROSEN, H.; WINTERBOURN, C. C.; NAUSEEF, W. M.. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J. Leukoc. Biol.*, New York, v. 93, n. 2, p. 185-198, feb. 2013.

KNOOP, R. H. Clinical profiles of plain versus sustained-release niacin (Niaspan) and the physiologic rationale for nighttime dosing. *Am. J. Cardiol.*, New York, v. 82, n. 12A, p. 24U-28U, dec. 1998.

KOIKE, H.; IJIMA, M.; MORI, K.; HATTORI, N.; ITO, H.; HIRAYAMA, M.; SOBUE, G. Postgastrectomy polyneuropathy with thiamine deficiency is identical to beriberi neuropathy. *Nutrition*, Burbank, v. 20, n. 11-12, p.961-966, dec. 2004.

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

KURKÓ, J, BESENYEI, T., LAKI, J., GLANT T. T., MIKECZ, K., SZEKANECZ, Z. Genetics of rheumatoid arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol*, Totowa, v. 45, n. 2, p. 170-179, oct. 2013.

LABSYNTH. Ficha de informação sobre segurança de produtos químicos – Ácido nicotínico. 2016. Disponível em: <http://downloads.labsynth.com.br/FISPQ/rv2012/FISPQ-%20Acido%20Nicotinico.pdf>. Acesso em 01 de maio de 2016.

LANE, N. E.; BRANDT, K.; HAWKER, G.; PEEVA, E.; SCHREYER, E.; TSUJI, W.; HOCHBERG, M.C. OARSI-FDA initiative: defining the disease state of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. London, v. 19, n. 5, p. 478-482, may 2011.

LANZA, F. Clinical manifestations of myeloperoxidase deficiency. *J. Mol. Med. (Berl)*, Berlin, v. 76, n. 10, p. 676-681, sep. 1998.

LAURINDO, I. M. M., XIMENES, A. C., LIMA, F. A. C., PINHEIRO, G. R. C., BATISTELLA, L. R., ALENCAR, P., XAVIER, R. M., GIORGI, R. D. N., CICONELLI, R. M., RADOMINSKI, S. C. Artrite Reumatoide: diagnóstico e tratamento. *Soc. Bras. Reumatol.*, São Paulo, v. 1, 2002.

LI, A.; LAO, L.; WANG, Y.; ZHANG, H.; REN, K.; BERMAN, B. M.; ZHANG, R. Interleukin-1ra inhibits FOS expression and hyperalgesia in rats. *Neuroreport*, London, v. 18, n. 5, p. 495-498, mar. 2007.

LISTING, J., STRANGFELD, A., KARY, S., RAU, R., HINUEBER, U. V., STOYANOVA-SCHOLZ M., GROMNICA-IHLE E., ANTONI, C., HERZER, P., KEKOW, J., SCHNEIDER, M., ZINK, A. Infections in Patients with rheumatoid arthritis treated with biologic agents. *Arthritis Rheum.*, Atlanta, v. 52, n. 11, p. 3403-3412, nov. 2005.

LIU, J. F.; ZHANG, S. W.; JAMIESON G. G.; ZHU, G. J.; WU, T. TC.; ZHU, T. N.; SHAN, B. E.; DREW, P. A. The effects of a COX-2 inhibitor meloxicam on squamous cell carcinoma of the esophagus in vivo. *Int. J. Cancer*, New York, v. 22, n. 7, p. 1639-1644, apr. 2008.

LOESER, R. F.; GOLDRING, S. R.; SCANZELLO, C. R.; GOLDRING, M. B. Osteoarthritis: a disease of a joint as an organ. *Arthritis Rheumatol*, Atlanta, v. 64, n. 6, p. 1697-1707, jun. 2012.

LOPES, F.; GRAEPEL, R.; REYES, J. L.; WANG, A.; MCDOUGALL, J. J.; SHARKEY, K. A.; MCKAY, D. M. Involvement of mast cells in a $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist-exacerbation of complete Freund's adjuvant-induced mono-arthritis in mice. *Arthritis Rheumatol.*, Malden, v. 68, n. 2, p. 542-552, feb. 2016.

LÓPEZ, J. R.; Domínguez-Ramirez, A., M.; COOK, H. J.; BRAVO, G.; DÍAZ-REVAL, M. I.; DÉCIGA-CAMPOS, M.; LÓPEZ-MUÑOZ, F. J. Enhancement of antinociception by co-administration of ibuprofen and caffeine in arthritic rats. *Eur J Pharmacol.*, Amsterdam, v. 544, n. 1-3, p. 31-38, aug. 2008.

LOVELESS, M. S.; FRY, A. L. Pharmacologic therapies in musculoskeletal conditions. *Med. Clin. North Am.*, Philadelphia, v. 100, n. 4, p. 87-90, jul. 2016.

LUNARDELLI, A., CAMARGO, M. D., OLIVEIRA, J. R. Ação da frutose-1,6-bisfosfato sobre a toxicidade aguda do ácido nicotínico. *R.B.A.C.*, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, p. 87-90, 2004.

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

MARQUEZ, J. O.; FERREIRA, S. H. Regional dipyrone nociceptor blockade: a pilot study. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.20, p.441-444, 1987.

MASIELLO, P.; NOVELLI, M.; FIERABRACCI, V.; BERGAMINI, E. Protection by 3-aminobenzamide and nicotinamide against streptozotocin-induced beta cell toxicity in vivo and in vitro. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, Westbury, v. 69, n. 1, p. 17-32, jul. 1990.

MATSUI, T. C.; COURA, G. M.; MELO, I. S.; BATISTA, C. R.; AUGUSTO, P. S.; GODIN, A. M.; ARAÚJO, D. P.; CÉSAR, I. C.; RIBEIRO, L. S.; SOUZA, D. G. ; KLEIN, A.; DE FÁTIMA, A.; MACHADO, R. R.; COELHO, M. M. Nicorandil inhibits neutrophil recruitment in carrageenan-induced experimental pleurisy in mice. *Eur. J. Pharmacol*, Amsterdam, v. 769, p. 306-312, dec. 2015.

McINNES, I., B.; BUCKLEY, C. D.; ISAAC, J. D. Cytokines in rheumatoid arthritis – shaping the immunological landscape. *Nat. Rev. Rheumatol.*, New York, v. 12, n. 1, p. 63-68, jan. 2016.

McINNES, I. B.; SCHETT, G. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med*, Boston, v. 365, n. 23, p. 2209-2219, dec. 2011.

MIESEL R.; KURPISZ M.; KRÖGER H. Modulation of inflammatory arthritis by inhibition of poly (ADP-ribose)polymerase. *Inflammation*, New York, v. 19, n. 3, p. 379-387, jun. 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Relação nacional de medicamentos essenciais – RENAME*. 9ª ed., 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. PTC 03/2012: Eficácia e segurança de tocilizumabe no tratamento da artrite reumatoide. Brasília, abril 2012.

MORIN, N.; OWOLABI, S. A.; HARTY, M. W.; PAPA, E. F.; TRACY, T. F. Jr; SHAW, S. K.; KIM, M.; SAAB, C. Y. Neutrophils invade lumbar dorsal root ganglia after chronic constriction injury of the sciotic nerve. *J. Neuroimmunol.*, Amsterdam, v. 184, n. 1-2, p. 164-171, mar. 2007.

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

MURATA, T.; OMATA, N.; FUJIBAYASHI, Y.; WAKI, A.; SADATO, N.; YOSHIMOTO, M.; OMORI, M.; ISAKI, K.; YONEKURA, Y. Dynamic changes in glucose metabolism induced by thiamine deficiency and its replenishment as revealed by a positron autoradiography technique using rat living brain slices. *J. Neurol. Sci.*, Amsterdam, v. 164, n. 1, p. 29-36, mar.1999.

NAGAI, A.; YASUI, S.; OZAWA, Y.; UNO, H.; KONNO, K. Niacin attenuates acute lung injury by lipopolysaccharide in the hamster. *Eur. Respir. J.*, Copenhagen, v. 7, n. 6, p. 1125-1130, jun. 1994.

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

NANDAKISHORE, R.; YALAVARTHI, P.R.; KIRAN, Y. R.; RAJAPRANATHI, M. Selective cyclooxygenase inhibitors: current status. *Curr. Drug Discov. Technol.*, San Francisco, v. 11, n. 2, p. 127-132, jun. 2014.

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

PALAYOOR, S. T.; BUMP, E. A.; CALDERWOOD, S. K., BARTOL, S.; COLEMAN, C. N. Combined antitumor effect of radiation and ibuprofen in human prostate carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.*, Denville, v. 4, n. 3, p. 763-771, mar. 1998.

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

PERKINS, N. M.; TRACEY, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. *Neuroscience*, New York, v. 101, n. 3, p. 745-757, nov. 2000.

PERO, R. W.; AXELSSON, B.; SIEMANN, D.; CHAPLIN, D.; DOUGHERTY, G. Newly discovered anti-inflammatory properties of the benzamides and nicotinamides. *Mol. Cell. Biochem.*, The Hague, v. 193, n. 1-2, p. 119-125, mar. 1999.

PISETSKY, D. S.; ST CLAIR, E. W. Progress in the treatment of rheumatoid arthritis. *JAMA*, Chicago, v. 286, n. 22, p. 2787-90, dec. 2001.

REIS, F.J.; ROCHA, N. P. Efeito analgésico de longa duração da dipirona sobre a hiperalgesia persistente induzida pela constrição do nervo ciático em ratos: participação do óxido nítrico. *Rev. Bras. Ciên. Farm.*, v. 42, n. 4, 513-522, dez. 2006.

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

RODRIGUES, C. R. F.; BÓ, S. D.; TEIXEIRA, R. M. Diagnosing rheumatoid arthritis early. *R.B.A.C.*, Rio de Janeiro, v. 37, n. 4, p. 201-204, jan. 2005.

ROCHFORD, R.; RIGGS, J. E.; CLAVO, A.; EMST, D. N.; HOBBS, M. V. Differential effects of CD28 costimulation upon cytokine production by CD4+ and CD8+ T cells. *Immunobiology*, New York, v. 209, n. 7, p. 513-522, 2004.

ROCKWELL, C. E.; QURESHI, N. Differential effects of lactacystin on cytokine production in active ted Jurkat cells and murine splenocytes. *Cytokine*, Philadelphia, v. 51, n. 1, p. 12-17, jul. 2010.

SCHANDENÉ, L.; VANDENBUSSCHE, P.; CRUSIAUX, A.; ALÈGRE, M. L.; ABRAMOWICZ, D.; DUPONT, E.; CONTENT, J.; GOLDMAN, M. Differential effects of pentoxifylline on the production of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) by monocytes and T cells. *Immunology*, v. 76, n. 1, p. 30-34, may 1992.

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

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

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

SHAFER, M. Cytokines and peripheral analgesia. *Adv. Exp. Med. Biol.*, New York, v. 521, p. 40-50, 2003.

SIMPSON D., WELLINGTON K. Nicorandil: a review of its use in the management of stable angina pectoris, including high-risk patients. *Drugs*, Auckland, v. 64, n. 17, p. 1941-1955, sep. 2004.

SINGH, J. A.; SAAG, K. G.; BRIDGES JR, S. L.; AKL, E.A.; BANNURU, R. R.; SULLIVAN, M. C.; VAYSBROT, E.; McNAUGHTON, C.; OSANI, M.; SHMERLING, R. H.; CURTIS, J. R.; FURST, D. E.; PARKS, D.; KAVANAUGH, A.; O'DELL, J.; KING, C.; LEONG, A.; MATTESON, E. L.; SCHOUBOE, J. T.; DREVLOW, B.; GINSBERG, S.; GROEBER, J.; ST CLAIR, E. W.; TINDALL, E.; MILLER, A. S.; McALINDON, T. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*, Malden, v. 68, n. 1, p. 1-26, jan. 2016.

SMITH, S. R.; DESHPANDE, B. R.; COLLINS, J. E.; KATZ, J. N., LOSINA, E. Comparative pain reduction of non-steroidal anti-inflammatory drugs and opioids for knee osteoarthritis: systematic analytic review. *Osteoarthritis Cartilage*, London, v. 24, n. 6, p. 962-972, jun. 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. Gota – cartilha aos pacientes. Disponível em: <http://www.reumatologia.com.br/PDFs/gota.pdf>. Acesso em 13 de maio de 2016.

- TAIRA, N. Similarity and dissimilarity in the mode and mechanism of action between nicorandil and classical nitrates: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, New York, v. 10, suppl. 8, p. 1-9, 1987.
- TAYLOR, P. C., MEHTA, P., TULL, T. Aetiopathology of rheumatoid arthritis. *Medicine*, Baltimore, v. 34, n. 8, p. 163-166, apr. 2010.
- TORIGOE, D. Y; LAURINDO, I. M. M. Artrite reumatoide e doenças cardiovasculares. *Rev. Bras. Reumatol.*, São Paulo, v. 46, supl.1, p. 60-66, apr. 2006.
- 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. *Ann. Rheu. Dis.*, London, v. 68, n. 10, p. 1602-1608, oct. 2009.
- TURIEL, M., TOMASONI, L., SITIA, S., CICALA, S., GIANTURCO, L., RICCI, C., ATZENI, F., DE GENNARO COLONNA, V., LONGHI, M., SARZI-PUTTINI, P. Effects of long-term disease-modifying antirheumatic drugson endothelial function in patients with early rheumatoid arthritis. *Cardiovasc. Ther.*, Oxford, v. 28, n. 5, e. 53-64, oct. 2010.
- UNGERSTEDT, J. S.; BLOMBACK, M, SODERSTROM, T. Nicotinamide is a potent inhibitor of proinflammatory cytokines. *Clin, Exp. Immunol.*, Oxford, v. 131, n. 1, p. 48-52, jan. 2003.
- VAN PALM, V. P., NURMOHAMED, M. T., TWISK, J. W., DIJKMANS, B. A., VOSKUYL, A. E. Disease-modifying antirheumatic drugs are associated with a reduced risk for cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: case-control study. *Art. Res. Ther.*, London, v. 8, n. 5, R 151, sep. 2006.
- VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin- like drugs. *Nat. New. Biol.*, London, v. 231, n. 25, p. 232-235, jun. 1971.
- VASSILOPOULOS D.; CALABRESE, L. H. Risks of immunosuppressive therapies including biologic agents in patients with rheumatic disease and coexisting chronic viral infections. *Curr. Opin. Rheumatol.*, Philadelphia , v. 19, n. 19, p. 619-625, nov. 2007.
- 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 Rheumatol.*, Malden, v. 67, n. 6, p. 1646-1656, jun. 2015.
- VINGSBO, C.; SAHLSTRAND, P.; BRUN, J. G.; JONSSON, R.; SAXNE, T.; HOLMDAHL, R. Pristane-induced arthritis with a chronic disease course influenced by both major histocompatibly complex genes. *Am. J. Pathol.* Philadelphia, v. 149. n. 5, p. 1675-1683, nov. 1996.
- VITALI, P.; PANELLA, A.; SCILIMATI, A.; PERRONE, M. G. COX-1 inhibitors: Beyond structure toward therapy. *Med. Res. Rev.*, New York, v. 36, n. 4, p. 641-671, jul. 2016.
- WALLACE, J. L.; REUTER, B.; CICALA, C.; McKNIGHT, W.; GRISHAM, M.; CIRINO, G. A diclofenac derivative without ulcerogenic properties. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 275, n. 3, p. 249-255, may, 1994.
- WALSH, D. A., McWILLIAMS, D. F. Mechanisms, impact and management of pain in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, New York, v. 10, n. 10, p. 581-592, oct. 2010.
- WANG, C.; SCHMID, C. H.; HIBBERD, P. L.; KALISH, R.; ROUBENOFF, R.; RONES, R.; MCALINDON, T. Tai chi is effective in treating knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Arthritis Rheumatol.*, Malden, v. 15, n. 16, p. 1545-1553, nov. 2009.

WAUBEN, M., WAGENAAR-HILERS, J. P. A., WAN EBEN, W. Adjuvant arthritis. In: COHEN, B; MILLER, A. (Eds) *Autoimmune diseases models: guide book*. San Diego, Chap. 13, p. 211-216, 1994.

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

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO Model List. Essential Medicines*. 19th edition. Disponível em: http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML2015_8-May-15.pdf. Acessado em 01 de fevereiro de 2016.

YASUDA, T.; HASHIMURA, K.; MATSU-URA, Y.; KATO, Y.; UEDA, T.; MORI, I.; KIJIMA, Y. Nicorandil, a hybrid between nitrate and ATP-sensitive potassium channel opener, preconditions human heart to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Jpn. Circ. J.*, Osaka, v. 65: p. 526-530, jun 2001.

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

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

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

ZHANG, Z. J.; CAO, D. L.; ZHANG, X.; JI, R. R.; GAO, Y. J. Chemokine contribution to neuropathic pain: respective induction of CXCL1 and CXR2 in spinal cord astrocytes and neurons. *Pain*, Amsterdam, v. 154, n. 10, p. 2185-2197, oct. 2013.

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

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