

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

***Efeito da administração do antagonista
do receptor da bombesina/peptídeo
liberador da gastrina RC-3095 na Artrite
induzida por CFA em Ratos Wistar***

Patricia Gnieslaw de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

**Dissertação de Mestrado
2008**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

***Efeito da administração do antagonista
do receptor da bombesina/peptídeo
liberador da gastrina RC-3095 na Artrite
induzida por CFA em Ratos Wistar***

Patricia Gnieslaw de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

**Dissertação de Mestrado
2008**

OLIVEIRA, Patricia Gnieslaw de

Efeito da administração do antagonista do receptor da bombesina/peptídeo liberador da gastrina RC-3095 na Artrite induzida por CFA em Ratos Wistar / Patricia Gnieslaw de Oliveira; orientador Ricardo Machado Xavier. Porto Alegre, 2008.

75 f.

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. Área de concentração: Reumatologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina.

1. Modelo Animal 2. Sinovite 3. Adjuvante complete de Freund 4. Peptídeo liberador da gastrina 5. RC-3095.

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto”.

Albert Einstein

Dedicatória

*Agradeço, de modo especial, ao **Thierry**, meu marido, cúmplice e dedicado, com quem pude partilhar e dividir todos os sonhos. O teu equilíbrio e a tua força me tocaram a alma.*

Agradecimentos especiais

*Ao **Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier**, meu orientador e amigo, exemplo de postura profissional e espírito científico aguçado caracterizam-no como um grande mestre. Demonstrando ser incansável na busca de maximizar a qualidade das atividades desenvolvidas, bem como disponível, amável e extremamente atuante na orientação deste trabalho, o meu muito obrigado.*

*Ao meu colega **Dr. Claiton Viegas Brenol**, pela oportunidade de convívio, amizade, e por suas expressivas contribuições através de sua exímia habilidade e conhecimentos em reumatologia.*

*A minha colega **Lidiane Isabel Filippin**, pela oportunidade de convívio, amizade, apoio e inesgotável paciência em todos os momentos da realização deste trabalho.*

Agradecimentos

À Profª Maria Isabel Edelwiess

Pelos valiosos conhecimentos transmitidos, pelo apoio, amizade e convívio alegre no decorrer desta jornada. Pela disponibilidade e incentivo sempre constantes nos caminhos da Patologia.

Ao Prof. João Carlos Tavares Brenol

Pelo espírito entusiasta, por partilhar de forma tão generosa e desprendida os seus conhecimentos. O reconhecimento pela dedicação profissional a todos aqueles que procuram seu auxílio.

Ao Prof. Gilberto Schwartzmann

Por sua inquestionável competência, inteligência e seriedade, me possibilitando contruir o significado dos atos de estudar.

Ao Prof. Rafael Roesler

Pelos valiosos conhecimentos científico transmitidos, exemplo de simplicidade e pelo privilégio da convivência.

Ao meu colega do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: **Dr. Paulo Alencastro**, pela oportunidade de convívio, amizade e apoio em todos os momentos da realização deste trabalho.

A secretária do Serviço de Reumatologia, Juliana Nunes Rios, pela sua competência e dedicação.

Aos **funcionários** do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Vera Susana Ribeiro, Fagner Suel de Moura e Lucas Garcia, pela competência, dedicação, oportunidade de convívio e carinho dispensados.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Ao Fundação de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

À **CAPES**, pelo auxílio financeiro.

Aos meus familiares, pois muito do tempo necessário para elaboração desta atividade foi subtraído deles. Sou grata pelo apoio e compreensão

Aos meus sogros, que sempre estiveram comigo em mais essa etapa da vida me apoiando sempre. Sou grata pela compreensão e convívio.

Aos meus pais, que com amor e dedicação me conduziram pela vida concedendo-me tantas oportunidades.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho e que, involuntariamente, deixaram de ser nominadas.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	10
Figuras e Tabelas.....	12
Resumo.....	13
Abstract.....	15
1. Introdução.....	17
2. Revisão da Literatura.....	19
2.1 Artrite Reumatóide.....	19
2.1.1 Conceito e Prevalência da AR.....	19
2.1.2 Fisiopatogênese da AR.....	21
2.1.3 Tratamentos da AR.....	24
2.2 Modelos Animais de AR.....	26
2.2.1 Modelos Murinos de Artrite induzida por adjuvante.....	28
2.2.2 Modelo de Artrite induzida por adjuvante completo de Freund.....	29
2.3 Neuropeptídeos.....	31
2.4 Bombesina/Peptídeo Liberados da Gastrina.....	32
2.4.1 Bombesina.....	32
2.4.2 Funções do GRP.....	35
2.4.3 Bombesina/GRP e Artropatia Inflamatória.....	37
2.4.4 RC-3095 – um antagonista do receptor do GRP.....	39
2.4.5 Meia-vida e administração do RC-3095.....	39
2.4.6 RC-3095 e Câncer.....	40
2.4.7 Papel Antiinflamatório do RC-3095.....	41
3. Justificativa.....	43
4. Objetivos do Estudo.....	44
4.1 Objetivo geral.....	44
4.2 Objetivos específicos.....	44
5. Referências da Revisão da Literatura.....	45
6. Artigo Científico redigido em Inglês.....	54
7. Conclusões.....	72

8. Anexos	73
8.1 Anexo I – Fluxograma do procedimento experimental	74
8.2 Anexo II – Protocolo para análise histopatológica das articulações	75

Lista de Abreviaturas

AR – artrite reumatóide

BN – bombesin - bombesina

AIA – artrite induzida por adjuvante

ALI – acute lung inflammation – dano pulmonar agudo

BAL – bronco-alveolar

BALF – fluido bronco-alveolar

CFA – complete Freund's adjuvant – adjuvante completo de Freund

CIA – collagen induced arthritis – artrite induzida por colágeno

CLP – cecum ligation and puncture – ligação e perfuração do apêndice cecal

COMP – matriz proteica da cartilagem oligomérica

CP – captopril

DMCD – drogas modificadoras do curso da doença

DNA - *desoxyribonucleic acid* - ácido desoxirribonucléico

EGF – epidermal growth factor – fator de crescimento epidermal

EGFR – receptor do fator de crescimento epidermal

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay – ensaio colorimétrico enzimático

GI – gastro-intestinal

GRP – gastrin-releasin peptide – peptídeo liberador da gastrina

GRPR – receptor do peptídeo liberador da gastrina

IFA – incomplete Freund's adjuvant – adjuvante incomplete de Freund

IFN- α – interferon-alfa

IFN- γ – interferon-gama

IL-10 – interleucina-10

IL-17 – interleucina-17

IL-1 β – interleucina-1-beta

IL-6 – interleucina-6

LTB – leucotrieno B

MHC – major histocompatibility complex – complexo maior de histocompatibilidade

Mtb – *Micobacterium tuberculosis*

NK – *natural killer cells* – células assassinas naturais

NPY – neuropeptídeo Y

PIA – Pristane-induced arthritis – artrite induzida por adjuvante

RNA - *ribonucleic acid* - ácido ribonucléico

SCW – streptococcos cell wall – parede celular do streptococcos

SNC – sistema nervoso central

SNP – sistema nervosa periférico

SP – substância P

Th1 – *T helper 1 lymphocyte* – linfócito T auxiliar do tipo 1

TNF – tumor necrosis factor – fator de necrose tumoral

VIP – vasoactive intestinal peptide – peptídeo intestinal vasoativo

Figuras e Tabelas

Figura 1. Caracterização da Artrite Reumatóide.....	20
Figura 2. Immunopatogênese da AR.....	23
Figura 3. Estrutura da Bombesina e do GRP.....	34
Figura 4. Representação esquemática do receptor murino do GRP.....	34
Tabela 1. Critérios diagnósticos da artrite reumatóide do Colégio Americano de Reumatologia.....	21
Tabela 2. Funções descritas para o Peptídeo liberador da gastrina (GRP).....	37

Resumo

O peptídeo liberador da gastrina (GRP), homólogo mamífero da bombesina (BN), é um neuropeptídeo com múltiplas ações biológicas, incluindo um importante papel na regulação da resposta imunológica e inflamatória. Está presente em altas concentrações no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (AR), paralelamente com os níveis de interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF). RC-3095 é um antagonista sintético do receptor da BN/GRP que demonstrou modular a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-1 β) e diminuir o infiltrado inflamatório em modelos experimentais de sepse. Este estudo avaliou os efeitos do RC-3095 nos parâmetros clínicos, histopatológicos e de mediadores inflamatórios na artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) em ratos.

A artrite foi induzida por uma injeção de CFA junto a superfície subplantar da pata esquerda de ratos machos de Wistar. Os animais foram divididos 4 grupos: grupo controle, controle injetado com veículo, grupo placebo (administrado salina subcutaneamente 50ml/kg, uma vez ao dia por 8 dias após estabelecimento do modelo), grupo tratado (0.3 mg/kg de RC-3095 subcutaneamente, uma vez ao dia por 8 dias após a indução). A avaliação clínica foi acompanhada diariamente, de acordo com um escore do edema para as patas posteriores. Os animais foram sacrificados 15 dias após a indução. As articulações foram analisadas empregando um escore histológico descrito previamente. Níveis séricos de interferon (INF)- γ , Interleucina (IL)-1 β , TNF, IL-6 e interleucina (IL)-10 foram determinados por ELISA.

Os resultados demonstraram significativa inibição na inflamação articular nos achados histológicos no grupo tratado com RC-3095, comparado ao grupo placebo, incluindo infiltrado inflamatório ($p < 0,001$), hiperplasia sinovial ($p = 0,004$), formação de

pannus ($p < 0,001$), fibrose sinovial ($p < 0,001$), angiogênese ($p = 0,033$) e erosão da cartilagem ($p \leq 0,001$) e óssea ($p < 0,001$). Os níveis séricos das citocinas IFN- γ ($p < 0,001$), IL-1 β ($p < 0,001$), TNF ($p = 0,003$), IL-6 ($p = 0,048$) e IL-10 ($p = 0,015$) foram significativamente menores no grupo tratado do que no grupo placebo. Não houve diferença clínica no edema da pata e a inflamação subcutânea entre os grupos tratado e placebo. Dessa forma, o RC-3095 foi efetivo no modelo experimental de artrite, atenuando o dano articular e diminuindo os níveis séricos de IFN- γ , IL-1 β , TNF, IL-6 e IL-10. Estes resultados indicam um papel importante da via do neuropeptídeo GRP no processo inflamatório crônico articular e, portanto, a inibição dessa via é uma potencial estratégia terapêutica para artropatias inflamatórias crônicas, como a AR, que merece ser explorada.

Palavras-chave: Modelo animal, Sinovite, Adjuvante completo de Freund, peptídeo liberador de gastrina, RC-3095.

Abstract

Background: Recently, targeting of neuropeptides has been suggested to have potential therapeutic effects in RA. The gastrin-releasing peptide (GRP) is the homologous mammalian of the bombesin (BN), and its receptor signaling is involved in several functions, including cancer growth, immune cell regulation and inflammatory conditions, and has been found in RA synovial fluid in concentrations that correlate with IL-6 and TNF. RC-3095 is the antagonist of the GRP receptor, and has been demonstrated to modulate the release of proinflammatory cytokines (TNF and IL-1 β) by activated macrophages, leading to decreased inflammatory infiltration. **Objective:** To determine the effects of RC-3095 in clinical and histopathologic parameters and inflammatory mediators on complete Freund's adjuvant-induced arthritis. **Methods:** The arthritis was induced by injection of complete Freund's adjuvant (CFA) into the left hind footpad in males of Wistar rats. The animals were divided into control, vehicle injected control, placebo group (saline subcutaneously 50ml/kg, once daily for 8 days after modeling), treatment group (0.3 mg/kg of RC-3095 subcutaneously, once daily for 8 days after induction). Clinical evaluation was accomplished daily, through scoring of the paw edema. The animals were sacrificed 15 days after induction for collection of hind foot joints for histology. We used a histological scoring system which was previously described, and interferon (INF)- γ , Interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL)-6 and interleukin (IL)-10 were measured by ELISA. Statistical analyses were compared by Student t-test to determine the difference between placebo and treatment groups for histological scores, and cytokines levels were compared using Mann-Whitney test ($p < 0.05$). **Results:** There was significant inhibition of joint histological findings in the RC-3095 treated group, including synovial inflammatory infiltration

($p < 0.001$), synovial hyperplasia ($p = 0.004$), extension of pannus ($p < 0.001$), synovial fibrosis ($p < 0.001$), angiogenesis ($p = 0.033$), cartilage ($p \leq 0.001$) and bone erosion ($p < 0.001$). IFN- γ ($p < 0.001$), IL-1 β ($p < 0.001$), TNF ($p = 0.003$), IL-6 ($p = 0.048$) and IL-10 ($p = 0.015$) serum levels were significantly lower in the treated group. Paw swelling and subcutaneous inflammation, evaluated clinically, were not different between CFA-induced groups. **Conclusions:** RC-3095 was able to improve experimental arthritis, attenuate joint damage and decrease serum levels of IFN- γ , IL-1 β , TNF, IL-6 and IL-10. These data indicate that interference with GRP pathway is a potential new strategy for the treatment of RA that needs further investigational studies.

Key words: Animal Model, Synovitis, Complete Freund's adjuvant, Gastrin-releasing peptide, RC-3095.

1. Introdução

A artrite reumatóide (AR) é uma doença sistêmica inflamatória crônica de natureza auto-imune. Caracteriza-se basicamente por sinovite crônica, simétrica e erosiva, preferencialmente de articulações periféricas, e pela presença de fator reumatóide na maioria dos pacientes [1]. A AR é uma doença bastante heterogênea em termos de gravidade e ritmo de progressão da inflamação articular, presença de manifestações extra-articulares e de resposta ao tratamento farmacológico [2]. Mais recentemente, o uso de inibidores biológicos de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina (IL)-1, foi introduzido com significativo sucesso no controle da atividade inflamatória e da progressão radiológica. Contudo, essas terapias ainda apresentam efeitos adversos significativos e devem ser mantidas por longo prazo, pois não são curativas da doença [3]. Dessa forma, novas formas de terapia devem ser ativamente exploradas.

Modelos experimentais de artrite permitem estudar e avaliar o potencial terapêutico de novas terapias para AR. O modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) em ratos é um modelo bastante empregado na investigação de novas terapias para artropatias inflamatórias crônicas, como a artrite reumatóide [4]. Este modelo permite avaliar parâmetros da resposta inflamatória, bem como da resposta imunológica. Estudos comparativos entre animais artríticos tratados com drogas que interferem mais especificamente sobre a resposta inflamatória ou a resposta imunológica podem auxiliar no entendimento dos mecanismos implicados na evolução da artrite reumatóide [5-7].

A bombesina (BN) é um neuropeptídeo encontrado no sistema nervoso central e periférico de anfíbios (rã bombina, de Bombina) [8]. O neuropeptídeo homólogo em

mamíferos é o peptídeo liberador da gastrina (GRP) [9], com importante papel na regulação imune, inclusive em condições inflamatórias. Está presente em altas concentrações no líquido sinovial da AR, relacionado com as concentrações de IL-6 e TNF [10]. Mais recentemente, o receptor do GRP foi identificado nos tecidos articulares de animais normais e após indução de artrite experimental [11].

O RC-3095 é um antagonista do receptor da bombesina/peptídeo liberador da gastrina (BN/GRP) que bloqueia o efeito estimulador autócrino do BN/GRP em tumores. Por este motivo está sendo desenvolvido para o tratamento de múltiplos tipos de cânceres. O RC-3095 também demonstrou modular a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-1 β), diminuindo o infiltrado inflamatório em modelos animais de sepse [12, 13].

Estudos adicionais com RC-3095 em modelos animais de artrite poderão prover informações sobre a participação deste neuropeptídeo na resposta inflamatória persistente observada na sinóvia reumatóide, incluindo seu efeito sobre a síntese de citocinas pró- e antiinflamatórias.

O objetivo do presente estudo é determinar os efeitos do RC-3095 nos parâmetros clínicos e histopatológicos da artrite induzida por adjuvante completo de Freund em ratos Wistar, bem como sobre a produção sistêmica de citocinas envolvidas na resposta inflamatória.

2. Revisão da Literatura

2.1 Artrite Reumatóide

2.1.1 Conceito e prevalência de artrite reumatóide (AR)

A AR é uma doença sistêmica inflamatória, de natureza auto-imune. Caracteriza-se basicamente por sinovite crônica, simétrica e erosiva preferencialmente de articulações periféricas e a maioria dos pacientes apresenta fator reumatóide positivo (Fig.1) [1]. Tem uma prevalência de aproximadamente 1% na população brasileira [14], que é similar a da literatura mundial [15]. Tem preferência pelo sexo feminino [16], e tende a surgir a partir da quarta década de vida, com pico de incidência na quinta década [17].

Constitui um problema importante em termos de saúde pública com sérias consequências socioeconômicas. Pacientes com AR apresentam maiores morbidade e mortalidade quando comparados com a população normal, estimando-se uma redução de dez anos na expectativa de vida [18]. Atualmente cerca de 50% dos pacientes são considerados incapacitados para o trabalho após dez anos de evolução da doença [19]. As principais causas de morte descritas são infecções, doenças linfoproliferativas, doença cardiovascular (DCV) e cerebrovascular, complicações gastrintestinais e relacionadas à atividade da doença propriamente dita. Dentre os fatores preditivos de mortalidade, estão incluídos idade avançada, incapacidade funcional, número de articulações acometidas, fator reumatóide positivo, nódulos reumatóides e velocidade de sedimentação globular (VSG) elevada [20-22].

A AR é uma doença bastante heterogênea em termos de gravidade e ritmo de progressão da inflamação articular, presença de manifestações extra-articulares e de resposta ao tratamento farmacológico [2]. Para fins de investigação clínica,

convencionou-se realizar seu diagnóstico através da associação de manifestações clínicas, radiológicas e laboratoriais, conforme os critérios diagnósticos propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia (revisados em 1987) (Tab.1) [23].

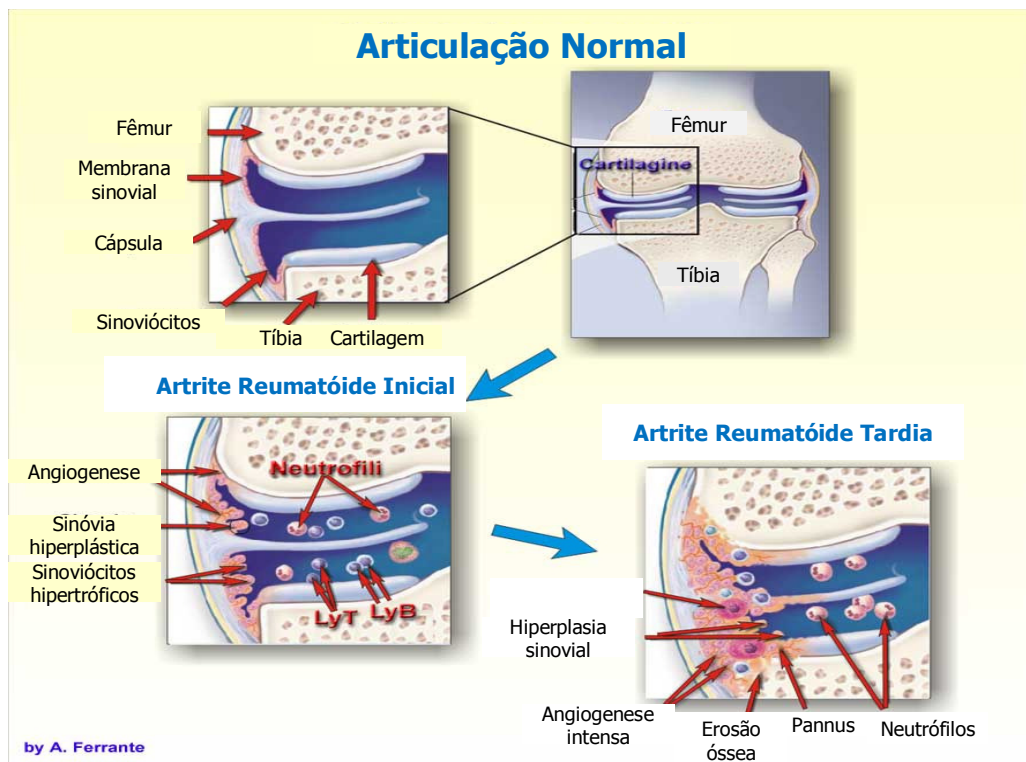


Fig. 1. Caracterização da Artrite Reumatóide. Adaptado de Ferrante.

Tabela 1. Critérios diagnósticos da artrite reumatóide do Colégio Americano de Reumatologia

Critérios Diagnósticos da Artrite Reumatóide:

1. Rigidez articular matinal com duração maior ou igual à 1 hora até a melhora máxima
2. Artrite de 3 ou mais áreas articulares simultaneamente observado pelo médico, dentre as 14 áreas possíveis: interfalangeanas proximais, metacarpofalangenas, punhos, cotovelos, joelhos, tornozelos e metatarsfalangeanas direitas ou esquerdas.
3. Artrite das articulações das mãos em pelo menos 1 área (interfalangeanas proximais, metacarpofalangenas, ou punhos).
4. Artrite simétrica das mesmas áreas articulares em ambos os lados do corpo. Não é necessário simetria absoluta.
5. Presença de nódulos subcutâneos junto a superfícies extensoras, proeminências ósseas ou justa-articulares.
6. Fator reumatóide sérico positivo.
7. Erosões articulares e/ou periarticulares com diminuição da densidade óssea, nas mãos ou punhos, observadas em exames radiológicos.

Para fins de classificação de doença, o(a) paciente deve apresentar ao menos 4 dos 7 critérios. Pacientes com 2 critérios clínicos não são excluídos. Termos como AR clássica, definitiva ou provável não devem ser aplicados [23].

Fisiopatogênese da AR

Apesar dos grandes progressos na compreensão da fisiopatogênese da AR, sua etiologia permanece desconhecida. Há participação de aspectos genéticos e ambientais, os quais levam à quebra da auto-tolerância e desenvolvimento de uma

resposta imune-inflamatória persistente [24]. O evento inicial da doença é o processo inflamatório iniciado na membrana sinovial com infiltrado de linfócitos e macrófagos. Este pode adquirir uma estrutura similar ao de tecidos linfóides terciários com predomínio de linfócitos T CD4+. A hiperplasia das células sinoviais, o infiltrado linfocítico e a neoangiogênese levam à formação de um tecido proliferativo e localmente invasivo conhecido como *pannus*, que atinge o osso subcondral e, em seguida, a cartilagem articular com destruição progressiva [24]. As perdas focais de osso marginal e subcondral contribuem decisivamente para a morbidade da doença pela progressão para deformidades articulares e incapacidade funcional. Estudos em tecidos humanos e provenientes de modelos animais apontam o osteoclasto como a principal célula envolvida neste processo. A ativação e recrutamento de tais células são influenciadas por citocinas e mediadores inflamatórios [25]. Apesar da identificação de mais de 100 diferentes tipos de citocinas, quimiocinas e outros fatores envolvidos na patogênese da AR, o fator de necrose tumoral (TNF – *tumoral necrosis factor*) ocupa lugar de destaque no processo erosivo articular da através da ativação dos osteoclastos [26].

A produção de citocinas com balanço predominante para as citocinas pró-inflamatórias tem papel fundamental na iniciação e perpetuação da inflamação crônica na membrana sinovial. A resposta do linfócito T auxiliar do tipo 1 (Th1) gera a produção de interferon-gama (IFN- γ) que estimula a liberação de TNF, interleucina-1 beta (IL-1 β) e metaloproteinases pelos macrófagos e fibroblastos sinoviais [27]. Mais recentemente, a participação de linfócitos T produtores de IL-17, chamados de Th17, também tem sido descrita como tendo papel importante na resposta inflamatória reumatóide [28].

Atualmente as funções desempenhadas pelos linfócitos B têm sido reconhecidas como significativas na patogênese da AR. A migração de células T e B, a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD 154), e a produção aumentada de interleucina-6 (IL-6)

e 10 (IL-10), que estimulam linfócitos B, são indicadores da hiperatividade destas células na doença (Fig. 2) [29].

Além de células e mediadores do sistema imune inato e adaptado, a inflamação neurogênica tem sido considerada como tendo um papel essencial na fisiopatogênese da AR, em parte por causa do envolvimento simétrico típico dessa doença (reflexo espinal cruzado) e o envolvimento predominante de pequenas articulações de mãos e pés, as quais são altamente inervadas [30]. A membrana sinovial é ricamente inervada. Estresse e o sistema nervoso central parecem modular o curso e desfecho clínico da AR [31]. Inflamação de origem auto-imune pode levar à sensibilização periférica e estimulação, induzindo sensibilização central e amplificação neurogênica da resposta inflamatória e ativação do axis neuroendócrino. Os neuropeptídeos teriam papel central nesse processo, conforme discutido mais adiante.

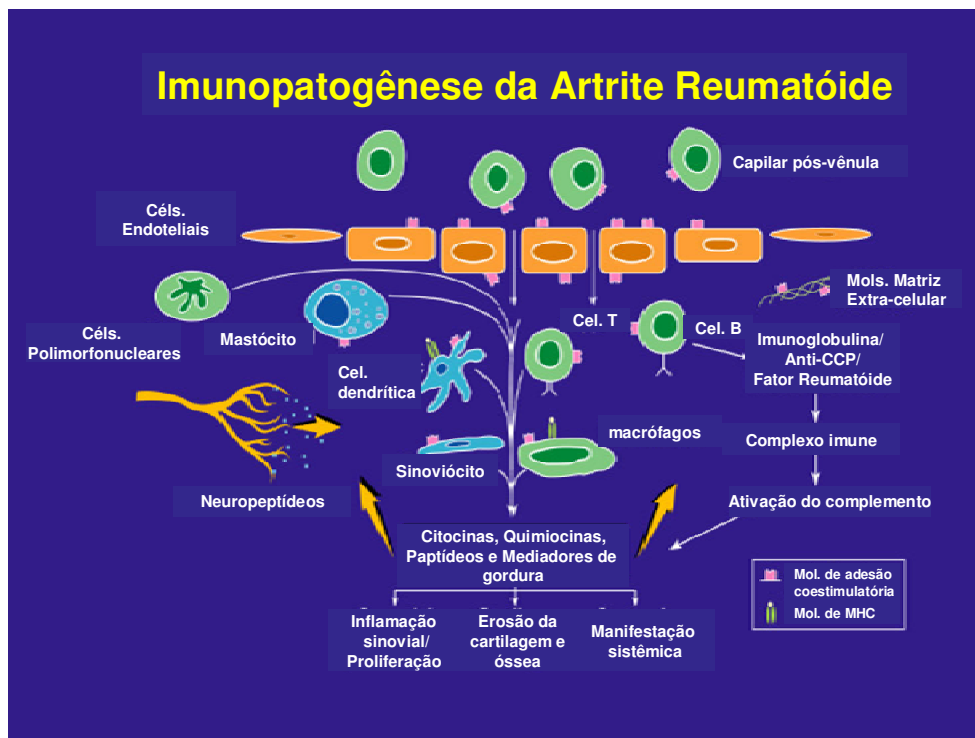


Fig. 2. Imunopatogênese da AR. Adaptado de Kavanaugh.

2.1.3 Tratamentos da AR

As últimas décadas foram marcadas por significativos avanços no entendimento da fisiopatologia da doença, culminando com o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas específicas para a AR.

O tratamento deve ser instituído o mais precocemente possível e tão intensivo quanto necessário para induzir o controle da doença e, preferencialmente, sua remissão [32]. Inúmeros estudos têm demonstrado melhor resposta terapêutica, menor destruição articular e menor perda funcional nos pacientes tratados mais precocemente, no primeiro ano dos sintomas [33, 34].

A remissão da doença é possível e deve ser um objetivo a ser alcançado. Estudos com diferentes estratégias terapêuticas, envolvendo a combinação de drogas, têm apresentado resultados positivos quanto a remissão da doença [35-37].

Metotrexato, um imunossupressor amplamente utilizado a partir dos anos 80, é reconhecido atualmente como a droga de referência para o tratamento da AR. Utilizado como monoterapia, é capaz de controlar as manifestações clínicas, levar a melhora funcional e deter a progressão radiológica [38]. Recentemente foi demonstrada a sua capacidade de intervir com o prognóstico da doença, sendo implicado na redução da mortalidade cardiovascular associada à AR [39].

As novas terapias biológicas aprovadas para o tratamento da AR, produzidas por tecnologia de proteínas recombinantes e desenhadas especificamente para influenciar a resposta imune, podem ser divididas em dois grupos: os agentes anti-TNF, já com aproximadamente 10 anos de experiência de uso, e os mais recentes agentes aprovados para uso comercial no Brasil em 2006-2007, os quais têm diferentes mecanismos de ação [40].

TNF, uma citocina pró-inflamatória, liberada por monócitos ativados, macrófagos, e também por linfócitos T, fibroblastos e células endoteliais, está profundamente envolvido na patogênese da AR. Diferentes inibidores de TNF foram e estão sendo desenvolvidos para o tratamento da AR. Atualmente três estão disponíveis em uso comercial, dois anticorpos monoclonais anti-TNF (um anticorpo quimérico – Infliximabe – e outro um anticorpo totalmente humano - adalimumabe) e um receptor solúvel do TNF (etanercepte – proteína de fusão composta do receptor do TNF ligado a porção Fc de uma imunoglobulina humana) [40].

Estes agentes inibidores do TNF empregados como monoterapia, mas particularmente quando associados com metotrexato, são eficazes, reduzindo os sinais e sintomas da doença e a progressão radiológica [41].

Terapêuticas biológicas que não têm o TNF como alvo terapêutico, como o Rituximabe e Abatacepte, foram recentemente aprovados para o tratamento da AR [42, 43].

O rituximabe, anticorpo monoclonal quimérico anti-CD20, antígeno presente na superfície dos linfócitos B, foi liberado para uso em pacientes com artrite reumatóide refratária aos DMCD tradicionais e aos agentes anti-TNF. Sua eficácia, particularmente nos pacientes com fator reumatóide positivos, destacou o papel do linfócito B na AR, quer como precursor dos plasmócitos produtores de anticorpos e, portanto, capaz de formação de complexos imunes e ativação de complemento, quer como produtor de citocinas, apresentador de antígenos para o linfócito T e capaz de expressar sinais co-estimulatórios [43, 44].

Quanto ao Abatacepte, inibidor de sinais co-estimulatórios para o linfócito T, recentemente liberado no Brasil para pacientes com AR refratários tanto aos DMCD tradicionais como aos agentes anti-TNF, os estudos têm demonstrado sua eficácia no

controle da doença, detendo a progressão radiográfica e um bom perfil de efeitos adversos [42, 45].

Contudo, essas terapias ainda apresentam efeitos adversos significativos e devem ser mantidas por longo prazo, pois não são curativas da doença [3]. Pacientes com AR têm risco aumentado para infecção, incluindo infecções granulomatosas como a tuberculose, particularmente de pulmão, ossos/articulações e pele com o uso de terapias biológicas [46]. Parece haver risco adicional quando administradas em combinação com outras terapias tradicionais para AR [47-50]. Também há risco aumentado de desenvolvimento de linfomas em pacientes com AR tratados com inibidores do TNF, mas ainda não é consenso se esse risco se deve à doença de base em suas formas mais graves ou ao agente anti-TNF propriamente dito [51]. Outros eventos adversos descritos com os agentes anti-TNF incluem descompensação de insuficiência cardíaca, desenvolvimento de auto-anticorpos, como o fator antinuclear e anticorpos anti-DNA, citopenias, elevação de enzimas hepáticas, vasculites cutâneas e síndromes desmielinizantes. Dessa forma, novas formas de terapia necessitam ser exploradas ativamente.

2.2 Modelos animais de AR

Artrite inflamatória aguda e crônica semelhante à AR pode ser induzida experimentalmente em linhagens suscetíveis de ratos, camundongos e, em alguns casos, coelhos, porcos da Guinéa ou macacos. Vários modelos experimentais induzidos em ratos e camundongos de artrite erosiva auto-imune são amplamente utilizados para avaliar os diversos mecanismos fisiopatológicos da AR. Além disso, são extensivamente usados para avaliar potenciais novos agentes terapêuticos [52, 53].

Modelos de artrite erosiva em ratos podem ser classificados em três grandes grupos. O primeiro grupo é induzido por hiperimunização de linhagens de ratos geneticamente suscetíveis a antígenos, como o colágeno tipo II (artrite induzida por colágeno) ou matriz proteica da cartilagem oligomérica (artrite induzida por COMP), em adjuvante incompleto de Freund's (IFA). O segundo grupo é induzido com a administração intradérmica de vários adjuvantes baseados em óleos, incluindo Avridina em IFA (artrite induzida por Avridina), Pristane (artrite induzida por Pristane), e IFA (artrite induzida por óleo). Entretanto o mais amplamente estudado é o de artrite induzida por antígenos do *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) emulsionados em IFA, também conhecido como adjuvante completo de Freund (CFA). O terceiro grupo de modelos de AR em ratos inclui indução empregando diversas formas de antígenos e da parede bacteriana, como artrite induzida por Polissacarídeo-peptidoglicano. O modelo de artrite induzida pela parede celular do *streptococos* (SCW) é o melhor modelo caracterizado do terceiro grupo. Em camundongos, artrite induzida por colágeno (CIA), artrite induzida por pristane (PIA) e artrite induzida por proteoglicanos são os principais modelos. Camundongos são relativamente resistentes a clássica artrite induzida por adjuvante com Mtb e artrite induzida por SCW [53].

Cada um dos modelos de ratos e camundongos tem características que lembram a clínica da AR em seres humanos. Características histológicas de todos os modelos de doenças articulares incluem hiperplasia sinovial com infiltração severa de células inflamatórias, semelhante às anormalidades histológicas de pacientes com AR. Além disso, os fatores genéticos também determinam a expressão da doença em modelos de ratos e camundongos, destacando as semelhanças com AR em seres humanos. Contudo, apesar da importância do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) sobre a expressão da doença seja aparente, genes não relacionados ao MHC também influenciam, podendo-se observar resistência da doença em animais com MHC

“suscetível” ou suscetibilidade da doença nos animais sem um MHC “suscetível” [52-55].

Modelos de ratos e camundongos, no entanto, também diferem entre si e em relação a AR com respeito a: início da doença, gravidade da inflamação articular, padrões das articulações envolvidas e várias outras manifestações clínicas e sistêmicas. Cada um desses modelos pode fornecer pistas sobre a etiopatogenia da AR e/ou doenças inflamatórias crônicas [54, 55]. Uma breve revisão sobre artrite induzida por adjuvante em modelos murinos será apresentada a seguir.

2.2.1 Modelos Murinos de Artrite induzida por adjuvante

Artrite induzida por adjuvante (AIA) foi o primeiro modelo experimental de artrite, descrito em 1956 [56, 57], em um tempo em que as doenças auto-imunes afetavam o sistema nervoso central, sistema nervoso periférico, tireóide e olhos, e a auto-imunidade começou a ser considerada um mecanismo significativo na patogênese da doença inflamatória órgão-específica [58].

A AIA tem sido um modelo experimental amplamente estudado por possuir muitas semelhanças com a artrite reumatóide humana (AR) em termos de histopatologia e respostas a drogas anti-inflamatórias e imunomoduladoras [56]. Embora a etiologia da AIA não seja totalmente conhecida, estudos indicam que os linfócitos T, macrófagos e células sinoviais proliferantes desempenham os principais papéis no desenvolvimento e manutenção da doença [59-61]. O fator de necrose tumoral (TNF), as interleucinas (IL-1 e IL-6) e as prostaglandinas têm sido apontados como os principais mediadores da patogênese da AR por modularem a migração de células, a ativação de células T e B, a proliferação sinovial e a destruição da cartilagem e erosão óssea [62, 63].

A artrite induzida por adjuvante é um processo subagudo desencadeado após uma injeção intradérmica na base da cauda ou na almofada da pata de micobactéria ou organismo similar emulsificado em óleo adjuvante [56, 57]. É uma doença poliarticular aditiva, afetando primeiramente os tornozelos, punhos e pequenas articulações, incluindo as articulações intrafalangeanas terminais, mas raramente a coluna vertebral. A primeira lesão é uma sinovite severa, seguida por periartrite, peritendinite e periostite, formação de *pannus* (tecido sinovial proliferativo com características invasivas locais) com destruição da cartilagem, destruição óssea e, finalmente, fibrose ou anquilose óssea. As lesões são iniciadas por infiltração de linfócitos e histiócitos sobre pequenos vasos, e as mudanças secundárias incluem edema, deposição de fibrina e focos de necrose com a presença de vários granulócitos acompanhados pela proliferação de sinoviócitos e fibroblastos, ativação de osteoblastos e osteoclastos e destruição óssea [64-66].

Assim, o modelo da artrite induzida por adjuvante permite avaliar parâmetros da resposta inflamatória imunomediada. Estudos comparativos entre animais artríticos tratados com drogas que interferem mais especificamente sobre a resposta inflamatória ou a resposta imunológica podem auxiliar no entendimento dos mecanismos implicados na evolução da artrite reumatóide [5-7].

2.2.2 Modelo de Artrite induzida por adjuvante completo de Freund

O modelo de artrite induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA) em ratos é um modelo bastante empregado na investigação de novas terapias para artropatias inflamatórias crônicas, como a artrite reumatóide [4]. Nesse modelo, a artrite é induzida com uma única injeção intraplantar de CFA, um adjuvante com antígeno, *Mycobacterium tuberculosis*, emulsificado com óleo mineral. O CFA atua como estímulo

de respostas imunológicas a antígenos, incluindo imunidade celular e aumento da produção de certas imunoglobulinas, levando ao desenvolvimento de uma reação articular inflamatória intensa dependente de células T. Ocorre aumento persistente da produção local e sistêmica de TNF, IL-1beta e IL-6. O desenvolvimento da artrite induzida por CFA inicia-se de 4 a 7 dias após a injeção. Por demonstrar características inflamatórias, incluindo elevação de citocinas e resposta variável a diferentes drogas imunossupressoras, este modelo tem-se mostrado útil nos estudos de mecanismos imunopatogênicos da artrite reumatóide e no estudo pré-clínico de novas terapias [67]. Por exemplo, Inglis et al. estudaram o efeito do etanercepte, um inibidor do TNF, na respostas da dor avaliadas em monoartrite induzida por CFA em ratos Wistar, e concluíram que a eficácia analgésica dessa terapia atesta a importância do TNF na patogênese da dor na artrite crônica [67]. Em outro estudo, Agha e Mansour demonstraram o efeito do Captopril (CP) na inflamação crônica mediada imunologicamente em dois modelos, artrite induzida por CFA e um tipo de hipersensibilidade mista em ratos Wistar. Foi avaliado o efeito de captopril com base nos parâmetros físicos (edema de pata) e marcadores bioquímicos no sangue e exsudato inflamatório. Os resultados indicaram que o captopril suprimiu a evolução do edema na pata dos animais artríticos induzidos com CFA, durante todas as fases da doença. Durante a fase crônica da inflamação, em qualquer um dos dois modelos, o captopril reduziu o nível elevado de IL-6 e LTB no soro e exsudato inflamatório (local), considerado um mediador inflamatório de neutrófilos ativados. Este estudo concluiu que o tratamento a longo prazo com CP confere uma atividade antiinflamatória efetiva na artrite induzida por CFA, melhoria no estresse oxidativo e na redução do LTB e IL-6 [68].

2.3 Neuropeptídeos

Neuropeptídeos são peptídeos liberados por neurônios que atuam como mensageiros intercelulares, exercendo inúmeras funções modulatórias do sistema nervoso. O espectro de ação dos neuropeptídeos é restrito, de acordo com o tipo de neuropeptídeo e o local de ação [30]. Por exemplo, diversos neuropeptídeos encontrados na membrana sinovial são sintetizados na raiz dorsal de neurônios autonômicos ganglionares e ficam armazenados em grandes vesículas nas terminações nervosas, a partir de onde sua liberação local ocorre mediante despolarização e excitação. Dessa forma, a liberação do neuropeptídeo ocorre após estímulo e em localização muito próxima de seus alvos de ação.

Os neuropeptídeos afetam células efetoras, como mastócitos, linfócitos, fibroblastos, condrócitos, osteoclastos e osteoblastos, através de receptores específicos. Essas células, por sua vez, liberarão outros fatores bioativos, como citocinas, prostaglandinas, óxido nítrico e monóxido de carbono, que são capazes de agir na terminações e fibras nervosas, tendo como consequência a amplificação do efeito dos neuropeptídeos [30].

Neuropeptídeos modulam o extravasamento de plasma, edema, liberação de citocinas e recrutamento e proliferação das células inflamatórias. Por outro lado, eles também exercem influências tróficas sobre os tecidos saudáveis durante a reparação do dano tecidual. Neuropeptídeos têm sido propostos para agir como fatores de crescimento em tecidos inflamados [69].

Os neuropeptídeos têm demonstrado ter significativo efeito na produção e liberação de citocinas como mecanismo de ação na modulação de doenças inflamatórias, assim como, apresentam efeitos pró- e anti-inflamatórios em modelos animais de doenças inflamatórias [10].

A evidência do envolvimento de neuropeptídeos nas doenças inflamatórias têm focado predominantemente o papel pró-inflamatório da substância P (SP) sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-6 e IL-1beta [70-72], o papel imunomodulatório do neuropeptídeo Y (NPY) [73] e o papel anti-inflamatório do peptídeo intestinal vasoativo (VIP), que inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-6 e IL-12 e estimula a produção de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-1Ra [74, 75]. O mecanismo de ação destes neuropeptídeos na modulação das doenças inflamatórias é, em grande parte, pela influência na produção de citocinas.

Nas interações entre os neuropeptídeos e as citocinas [76, 77] têm-se sugerido que vias regulatórias neuroimunes nas articulações constituem um importante mecanismo na modulação da expressão da artropatia inflamatória crônica. Porém, há pouca informação sobre as relações entre neuropeptídeos e citocinas no líquido sinovial e no soro de pacientes com artrite reumatóide (AR). Sabe-se que a membrana sinovial é altamente inervada com neurônios aferentes primários e do sistema autônomo simpático que contém neuropeptídeos, e há evidências indicando que a liberação desses neuropeptídeos influenciam na intensidade da doença inflamatória crônica [10].

2.4 Bombesina/Peptídeo Liberados da Gastrina

2.4.1 Bombesina

A bombesina (BN) é um peptídeo neurotransmissor endógeno de 14 aminoácidos encontrado no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) de anfíbios e, mais recentemente, no intestino de mamíferos e aves. Foi isolada por Anastasi et al. a partir da pele da rã *Bombina bombina* em 1971 [8]. A observação de vários efeitos deste

peptídeo de anfíbios em mamíferos levou à procura de análogos da bombesina que pudessem estar sendo produzidos em mamíferos.

McDonald et al. identificaram e caracterizaram quimicamente em 1978 um peptídeo no trato gastrointestinal de suínos que estimula a secreção de gastrina, o qual recebeu o nome de peptídeo liberador da gastrina (GRP) [9]. Esse peptídeo apresenta 27 aminoácidos e é estruturalmente homólogo à BN de anfíbios, tendo em comum 9 dos 10 aminoácidos da porção carboxiterminal (Fig. 2) [78]. Estes aminoácidos compartilhados são necessários para associação com alta afinidade com o receptor do GRP (GRP-R ou, conforme nova nomenclatura recentemente proposta pela *International Union of Pharmacology*, BB₂) [79].

Estudos têm demonstrado que o GRP está distribuído em vários tecidos de diversas espécies de mamíferos, incluindo: trato gastrintestinal [80], cérebro [81], glândula pituitária [82], medula espinal [83], gânglios simpático e sensorial [84, 85], glândula adrenal [86], pulmão [87], tireóide [88], trato genitourinário [89, 90] e articulações [91].

O receptor da GRP é uma proteína de superfície celular ligante com alta-afinidade da BN e GRP, assim como de peptídeos intimamente relacionados, desencadeando alterações intracelulares que influenciam o comportamento celular (Fig. 3) [89]. O GRP-R, clonado no início da década de 1990, interage com proteínas G e ativa a liberação de inositol-trifosfato, com aumento do cálcio iônico intracelular [70]. Esses receptores apresentam uma ampla distribuição no SNC e no tecido periférico, incluindo o trato gastrintestinal (GI) de murinos, suínos, caninos e de seres humanos. São achados em altos níveis no músculo liso (por exemplo, intestino, estômago e bexiga) e em glândulas secretoras (por exemplo, pâncreas). No cérebro, são encontrados em altos níveis no hipotálamo e estão presentes em outras áreas em níveis mais baixos (por exemplo, o trato olfativo, giro dentado e córtex). Também são encontrados em várias linhagens celulares (por exemplo, fibroblastos Swiss 3T3 e carcinoma pulmonar de pequenas

células) [92]. Em estudo recente em tecidos articulares de ratos, foi observada a presença de receptores do GRP em condrócitos que revestem a superfície articular [11].

	Posição dos Amino ácidos													
Peptídeo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Bombesina	Glp	Gln	Arg	Leu	Gli	Asn	Gln	Trp	Ala	Val	Gli	His	Leu	Met – NH ₂
GRP (14-27)	Met	Tir	Pro	Arg	-	-	His	-	-	-	-	-	-	-

Fig. 3. Estrutura da Bombesina e do GRP, o GRP têm 27 amino ácidos e apenas os 14 amino ácidos terminais COOH são apresentados (biologicamente ativos) Adaptado de Tokita et al, 2001[89].

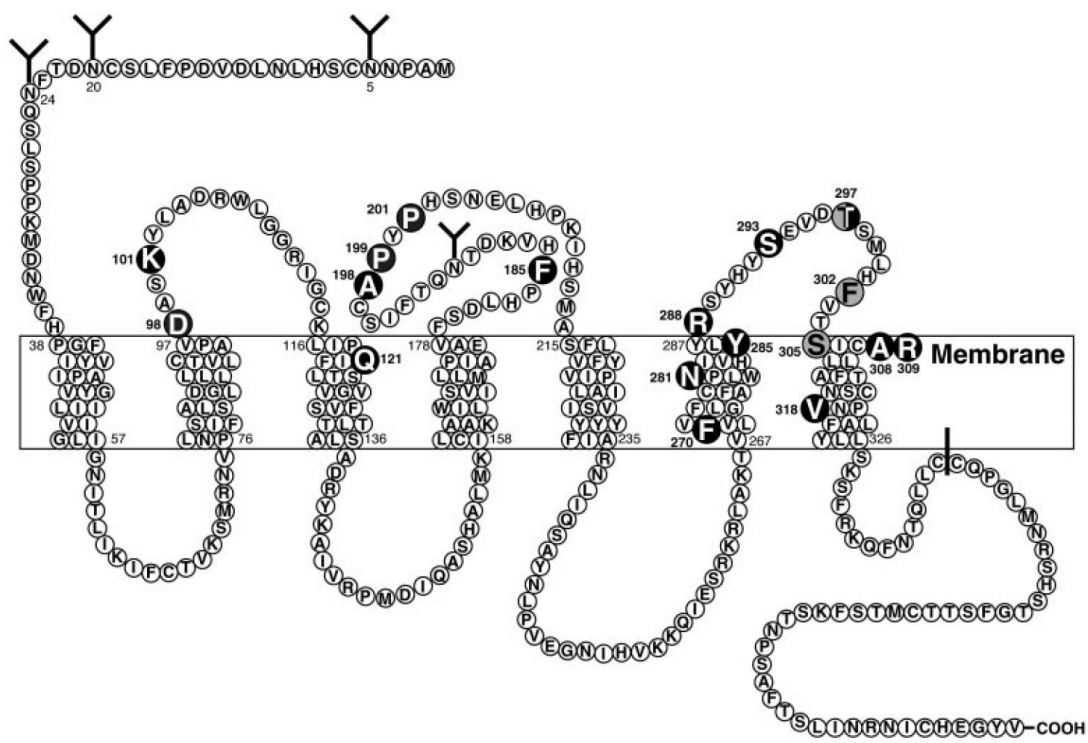


Fig. 4. Representação esquemática do receptor murino do GRP-R (ou BB₂). Os círculos pretos indicam os amino ácidos chaves para a alta afinidade com o GRP (interação ou sinalização) [79].

2.4.2 Funções do GRP

O GRP está envolvido em um amplo espectro de atividades biológicas, tais como o estímulo do crescimento de tecidual [87], modulação do trato gastrointestinal (GI), SNC, trato respiratório e resposta imune.

No crescimento celular do tecido normal e neoplásico, os efeitos tróficos foram estabelecidos na mucosa intestinal normal [93], pâncreas [94], neoplasias do pulmão [95], estômago [96, 97], cólon [98], mama [99] e próstata [100, 101] através da mediação dos receptores de membrana específicos nas células-alvo [102]. Demonstrou ser um mitógeno potente, sendo investigado extensivamente *in vitro* em camundogos Swiss 3T3 [103] e em cultura de células normais do epitélio brônquico [104]. O carcinoma pulmonar de pequena células secreta GRP e expressa GRP-R com alta afinidade, estabelecendo assim o crescimento autócrino envolvido no crescimento anormal desses tumores [105].

No trato GI, o GRP modula a secreção gástrica e pancreática através da ativação das células G e consequente liberação de colecistocinina e gastrina, regulando a secreção do ácido gástrico e funções motoras na musculatura estomacal [106]. No pâncreas, estimula a liberação de neurotensina, motilina, peptídeo pancreático, insulina e glucagon [107].

No SNC, o GRP tem sido envolvido na modulação da saciedade [108], termorregulação [109], homeostase, ritmo circadiano [110] e metabolismo [111]. Roesler et al. conduziram vários estudos sobre a potencial participação do GRP em desordens psiquiátricas e neurológicas e nos efeitos do antagonista do GRP-R (o RC-3095) nestas patologias. Os achados destes estudos, usando modelos animais, têm indicado que a BN/GRP e o GRP-R são distribuídos amplamente no SNC e desempenham um papel

neuromodulatório importante na patogenia da ansiedade, depressão, esquizofrenia, autismo e demência [112, 113].

No trato respiratório, o GRP tem ação no desenvolvimento de doenças pulmonares, causando broncoconstrição e vasodilatação [114].

O GRP atua sobre o desenvolvimento e regulação da resposta imune através de ações diretas sobre as células do sistema imunológico. Linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, mastócitos e células endoteliais expressam receptor para GRP [89, 102]. A ativação do receptor do GRP têm efeitos imunológicos, incluindo quimioatração de macrófagos peritonais, monócitos e linfócitos, que é mediada pela ativação da proteína C quinase [115, 116]; estímulo a proliferação de linfócitos [117]; ativação de células natural killer (NK) e citotoxicidade celular dependente de anticorpos [118]. Além disso, induz a proliferação de mastócitos e quimiotaxia *in vitro*, sendo implicado na patogenia de doenças pulmonares [119] e artrite reumatóide (AR) [10].

Entretanto, não existem evidências sobre a capacidade do GRP afetar diretamente a liberação de citocinas anti- e pró-inflamatórias. Dal-Pizzol et al. demonstraram recentemente que um antagonista seletivo do GRP-R, o RC-3095 diminui níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias *in vitro* e *in vivo*, aumentando a sobrevida em modelo experimental de sepse e injúria pulmonar aguda (Tab 2.) [12].

Tabela 2. Funções descritas para o Peptídeo liberador da gastrina (GRP)

Trato Gastrointestinal	<ul style="list-style-type: none">• Ativação das células G• Modulação da secreção gástrica e pancreática (liberação de colecistocinina e gastrina)• Motilidade da musculatura estomacal• Liberação de neurotensina, motilina, peptídeos pancreáticos, insulina e glucagon
Sistema Nervoso Central	<ul style="list-style-type: none">• Modulação da saciedade, termorregulação, homeostase, ritmo circadiano e no metabolismo
Trato Respiratório	<ul style="list-style-type: none">• Aumenta a broncoconstrição e vasodilatação• Desenvolvimento pulmonar fetal
Sistema Imunológico	<ul style="list-style-type: none">• Vasodilatação e extravasamento de plasma• Inflamação neurogênica• Estimula ou inibe as funções dos linfócitos, fagócitos e células natural killer (NK)• Proliferação e quimiotaxia de mastócitos

2.4.3 Bombesina/GRP e Artropatia Inflamatória

Westermarck et al. comprovou a existência de uma forte correlação entre os níveis de BN/GRP e o número de leucócitos no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide inicial. Esta observação mostrou que peptídeos como a BN/GRP estão presentes no fluido sinovial das articulações afetadas pela AR e sua presença está relacionada ao processo inicial do envolvimento articular na artropatia inflamatória crônica [91].

Grimsholm et al. demonstrou a relação entre vários neuropeptídeos e citocinas no líquido sinovial e soro de pacientes com AR inicial ou tardia. Entre os neuropeptídeos estudados, o maior achado foi que a BN/GRP e a SP são altamente correlacionadas com as citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1beta, IL-6 e com a atividade da doença,

sendo a BN/GRP o neuropeptídeo com maior grau de correlação. Essas observações sugerem que o aumento na liberação deste peptídeo estimula a produção destas citocinas pelas células imunocompetentes na doença inflamatória crônica articular [10, 120]. Não está claro se a BN/GRP está presente na inervação articular, ou como a liberação deste peptídeo no líquido sinovial ocorre. Uma observação interessante é que a BN/GRP foi detectada em condrócitos humanos e, em animais artríticos, ocorre a diminuição da expressão destes receptores nos condrócitos e o aparecimento destes receptores nas células do infiltrado inflamatório [10, 11]. Existem evidências que os neuropeptídeos como a SP, a NPY e a VIP podem modificar diretamente a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células imunocompetentes, incluindo células do sangue periférico de pacientes com AR [10], mas não existem estudos sobre o efeito direto da BN/GRP. Os mesmos autores recentemente analisaram por imunohistoquímica tecidos articulares de ratos artríticos e observaram que a expressão de receptores de GRP em condrócitos que revestem a superfície articular de animais controles está claramente diminuída durante a artrite grave. Eles também observaram a presença da BN/GRP na fibras nervosas em associação com o infiltrado inflamatório e de GRP-R em células do infiltrado. Este estudo mostrou que a BN/GRP pode ser acrescentado à lista de neuropeptídeos presentes na inervação articular, especialmente em associação com infiltrado inflamatório [11]. Estas observações, juntamente com a correlação entre as citocinas e a BN/GRP no líquido sinovial e soro de pacientes com AR, indicam que a BN/GRP é um neuropeptídeo com potencial importância na fisiopatologia dessa doença.

Estudos adicionais com antagonistas seletivos do receptor da BN/GRP, em modelos animais de AR, poderão prover informações sobre a relação deste neuropeptídeo e das citocinas pró- e antiinflamatórias em relação a AR.

2.4.4 RC-3095 – um antagonista do receptor do GRP

Os antagonistas sintéticos são produzidos para uma ligação de alta afinidade com os receptores, sem ativá-los e inibindo a ligação do agonista, bloqueando as vias de sinalização. Muitos antagonistas da BN/GRP têm sido sintetizados e experimentados em diversos modelos, testando a habilidade de inibir os efeitos deste peptídeo [121].

Os efeitos farmacológicos dos diferentes antagonistas da BN/GRP são complexos, devido aos mecanismos de ação diretos e indiretos, variando nas diferentes espécies e vias de administração estudadas [122].

O RC-3095, [D-Tpi⁶, Leu¹³Ψ-(CH₂NH)Leu¹⁴] bombesina₆₋₁₄, é um pseudonapeptídeo sintético com ação antagonista do receptor da BN/GRP. Foi originalmente sintetizado por Schally et al. (Universidade de Tulane, New Orleans) pelo método de fase sólida em 1991 [122], com o objetivo de inibir a ação da BN/GRP.

2.4.5 Meia-vida e administração do RC-3095

Diversas pesquisas mostraram que a meia-vida de peptídeos relacionados a BN, como o GRP, é muito curta na circulação, devido a sua rápida metabolização. Assim, os efeitos de BN/GRP e seus antagonistas aparecem rapidamente, mas são relativamente de curta duração. A meia-vida de vários antagonistas da BN/GRP estão entre 154 e 1.388 minutos em um estudo *in vitro* [123]. Experimentos em modelos animais demonstraram que o RC-3095, em nível sanguíneo, decresce rapidamente após injeção intravenosa ou subcutânea. Seu pico é detectado 2 minutos após administração intravenosa ou 15 minutos após administração subcutânea, decaindo rapidamente e tornando-se indetectável após 3-5 horas [124]. Quando o RC-3095 é administrado pela via subcutânea, os efeitos máximos são obtidos em 15-30 minutos após a injeção,

terminando em poucas horas. Observa-se inibição significativa da liberação da gastrina, diminuindo a elevação de glicose no plasma, causada pelo GRP [125, 126].

Em relação ao perfil de segurança, estudos clínicos de fase I em pacientes com diferentes tipos de câncer em estágio avançado não têm demonstrado nenhum efeito colateral significativo, mesmo em doses mais elevadas, que variaram entre 8-96 ug/kg [127]. Entretanto, estudos com maior número de pacientes são necessários para melhor definição do perfil de segurança do RC-3095.

As ações dos antagonistas da BN/GRP não estão limitadas apenas aos receptores, inibindo a ligação do ligante natural ao seu receptor, mas iniciam mudanças intracelulares semelhantes ou diferentes à gastrina. Podem induzir algum sinal intracelular que bloqueia os efeitos metabólicos e mitogênicos da BN/GRP, interferindo nas rotas do receptor do fator de crescimento epidermal (Epidermal Growth Factor, EGF), resultando na inibição do crescimento de diversos tipos de cânceres dependentes do sistema EGF-receptor de EGF [122].

2.4.6 RC-3095 e Câncer

O RC-3095 mostra ser um potente inibidor de crescimento tumoral em vários modelos experimentais de câncer: câncer pancreático em hamsters induzido por nitrosamina [128, 129], câncer mamário em ratos MTX [130], câncer de próstata em ratos Dunning [131], como também em tumores humanos, como câncer pancreático SW-1990 [132], câncer de mama MCF-7MIII [133], tumor gástrico MKN-45 [134], câncer de cólon HT-29 [135], vários carcinomas pulmonares de pequenas células [136], e câncer de próstata em PC-82 e PC-3 em camundongos *nude* [121, 137].

Schally et al. conduziu inúmeros estudos com RC-3940-II e RC-3095, demonstrando que estes antagonistas inibiam a proliferação celular da linhagem PC-3 de câncer de

próstata, *in vivo* [13]. O uso de RC-3940-II e RC-3095 em câncer de mama humano estrógeno-independente na linhagem celular MDA-MB-231 de camundongo *nude* mostrou uma diminuição no volume final do tumor de 72,4% e 57,7%, respectivamente [138]. Além disso, o RC-3095 e o RC-3940-II também inibem o crescimento de células MDA-MB-468 e MDA-MB-435 de camundongos *nude* [139]. Os autores encontraram uma redução substancial na expressão do RNAmensageiro e dos níveis do receptor da família das proteínas ErbB/HER, como também uma diminuição na expressão dos oncogenes c-jun e c-fos [140].

A inibição do crescimento de tumores causada pelo antagonista RC-3095 é mediada pelo mecanismo da baixa regulação dos receptores do fator de crescimento epidermal (EGFR). Uma única administração *in vivo* de RC-3095 reduz os níveis e a expressão de RNAmensageiro e de EGFR em cânceres mamários de ratos MTX [141].

2.4.7 Papel Antiinflamatório do RC-3095

Os efeitos do antagonista seletivo do receptor da BN/GRP RC-3095 foram demonstrados em modelo experimental bem estabelecido de sepse por ligação e perfuração do apêndice cecal ("cecum ligation and puncture", CLP) e dano pulmonar agudo ("acute lung inflammation", ALI) [12].

No modelo de CLP, os animais foram divididos em quatro grupos: (1) *sham* operado; (2) CLP; (3) CLP mais "suporte básico" (administrada salina após o CLP), e (4) idêntico ao grupo 3, mas com administração subcutânea de RC-3095 a 0.3 mg/kg, uma vez por dia durante 2 dias, começando 6 horas depois do CLP. O sangue foi coletado, 12 e 24 h após o CLP para determinar os marcadores plasmáticos sobre o dano do órgão e as citocinas.

A administração de RC-3095 (0.3 mg/kg) 6 horas após a indução da sepse melhorou a sobrevivência no modelo de CLP. Doses mais altas de RC-3095 não aumentam seus efeitos, e doses mais baixas apresentaram um impacto na mortalidade menos significativo. A administração de RC-3095 melhorou a sobrevivência significativamente, em torno de 50%.

O modelo de ALI consistiu na inalação intratraqueal de lipopolissacarídeo (LPS). Após este procedimento os animais eram sacrificados, sendo feita uma lavagem bronco-alveolar (BAL). Este fluido bronco-alveolar (BALF) foi coletado e analisado por vários parâmetros bioquímicos. Os animais foram divididos em três grupos: (1) inalação de salina isotônica; (2) ALI tratado com salina; (3) ALI tratado com RC-3095 (0.3 mg/kg, administrado subcutaneamente 3 horas após a indução de ALI). O antagonista atenuou o infiltrado inflamatório alveolar e o exudato alveolar induzido pela inalação de LPS. Assim, a administração de RC-3095 reduz o conteúdo total de células inflamatórias do BALF, exudato proteico, TNF e IL-1 β .

Portanto, o RC-3095 melhorou as taxas de mortalidade, melhorando a sobrevivência nestes modelos, reduzindo a insuficiência do órgão e o infiltrado inflamatório. Além disso, modulou a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-1beta) por macrófagos ativados, bloqueando diversos processos associados com a progressão da sepse.

De forma interessante, o RC-3095 não modula a liberação de IL-10 anti-inflamatória, sugerindo que os caminhos intracelulares modulados pela BN/GRP é seletivo para citocinas pró-inflamatórias. Assim, o RC-3095 pode representar um possível alvo farmacológico para controle da resposta inflamatória local e sistêmica [12].

3. Justificativa

A justificativa do presente estudo é advinda da necessidade de novas estratégias terapêuticas para artrite reumatóide (AR) com vistas à remissão ou prevenção da evolução da doença. O antagonista do receptor da bombesina/peptídeo liberador da gastrina, RC-3095, é um potencial agente terapêutico para o controle da doença. A importância da busca por novas estratégias terapêuticas para as artropatias inflamatórias, visando o controle das diferentes vias imunopatogênicas da AR, é evidente, diante da necessidade de estratégias que permitam a otimização do manejo da doença.

4. Objetivos do Estudo:

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do RC-3095 sobre a resposta inflamatória e dano articular nos modelos experimentais de artrite induzida por adjuvante completo de Freund em ratos Wistar.

4.2 Objetivos específicos

- A) Avaliar o efeito do tratamento com RC-3095 através do escore clínico do edema entre o grupo tratado e o placebo.
- B) Avaliar o efeito do tratamento com RC-3095 através da análise histopatológica das articulações afetadas.
- C) Avaliar o efeito do RC-3095 sobre a produção sistêmica das citocinas: IFN- γ , IL-1 β , TNF, IL-6 e IL-10.

5. Referências da Revisão da Literatura:

1. Kelley, W.N., Ruddy, S., Sledge, C.B., *Textbook of Rheumatology*. 1997, Philadelphia: WB Saunders.
2. Worthington, J., *Investigating the genetic basis of susceptibility to rheumatoid arthritis*. *J Autoimmun*, 2005. **25 Suppl**: p. 16-20.
3. *Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(2): p. 328-46.
4. Joe, B. and R.L. Wilder, *Animal models of rheumatoid arthritis*. *Mol Med Today*, 1999. **5**(8): p. 367-9.
5. Granada, M., et al., *Anti-inflammatory effect of the ghrelin agonist growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in arthritic rats*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005. **288**(3): p. E486-92.
6. Caparroz-Assef, S.M., et al., *The metabolic changes caused by dexamethasone in the adjuvant-induced arthritic rat*. *Mol Cell Biochem*, 2007. **302**(1-2): p. 87-98.
7. Yue, L., et al., *Anti-adjuvant arthritis of recombinant human endostatin in rats via inhibition of angiogenesis and proinflammatory factors*. *Acta Pharmacol Sin*, 2004. **25**(9): p. 1182-5.
8. Anastasi, A., V. Erspamer, and M. Bucci, *Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombina and Alytes*. *Experientia*, 1971. **27**(2): p. 166-7.
9. McDonald, T.J., et al., *A gastrin releasing peptide from the porcine nonantral gastric tissue*. *Gut*, 1978. **19**(9): p. 767-74.
10. Grimsholm, O., S. Rantapaa-Dahlqvist, and S. Forsgren, *Levels of gastrin-releasing peptide and substance P in synovial fluid and serum correlate with levels of cytokines in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2005. **7**(3): p. R416-26.
11. Grimsholm, O., et al., *Are neuropeptides important in arthritis? Studies on the importance of bombesin/GRP and substance P in a murine arthritis model*. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. **1110**: p. 525-38.
12. Dal-Pizzol, F., et al., *Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. **173**(1): p. 84-90.
13. Jungwirth, A., et al., *Luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix (SB-75) and bombesin antagonist RC-3940-II inhibit the growth of androgen-independent PC-3 prostate cancer in nude mice*. *Prostate*, 1997. **32**(3): p. 164-72.
14. Marques Neto, J.F., *Estudo multicêntrico da prevalência da Artrite Reumatóide do adulto em amostras da população brasileira*. *Revista Brasileira de Reumatologia* 1983. **33**: p. 169-173.
15. Wolfe, A.M., *The epidemiology of rheumatoid arthritis: a review. I. Surveys*. *Bull Rheum Dis*, 1968. **19**(2): p. 518-23.
16. Marsden, P.A., et al., *Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(23): p. 17478-88.

17. Alamanos, Y. and A.A. Drosos, *Epidemiology of adult rheumatoid arthritis*. *Autoimmun Rev*, 2005. **4**(3): p. 130-6.
18. Pincus, T., R.H. Brooks, and L.F. Callahan, *Prediction of long-term mortality in patients with rheumatoid arthritis according to simple questionnaire and joint count measures*. *Ann Intern Med*, 1994. **120**(1): p. 26-34.
19. Young, A., et al., *Mortality in rheumatoid arthritis. Increased in the early course of disease, in ischaemic heart disease and in pulmonary fibrosis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2007. **46**(2): p. 350-7.
20. Symmons, D.P., et al., *Longterm mortality outcome in patients with rheumatoid arthritis: early presenters continue to do well*. *J Rheumatol*, 1998. **25**(6): p. 1072-7.
21. Prior, P., et al., *Cause of death in rheumatoid arthritis*. *Br J Rheumatol*, 1984. **23**(2): p. 92-9.
22. Navarro-Cano, G., et al., *Association of mortality with disease severity in rheumatoid arthritis, independent of comorbidity*. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(9): p. 2425-33.
23. Arnett, F.C., et al., *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1988. **31**(3): p. 315-24.
24. Harris, E.D., *Rheumatoid Arthritis*. 1997, Philadelphia WB Saunders.
25. Goldring, S.R., *Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis*. *Curr Opin Rheumatol*, 2002. **14**(4): p. 406-10.
26. Miossec, P., *An update on the cytokine network in rheumatoid arthritis*. *Curr Opin Rheumatol*, 2004. **16**(3): p. 218-22.
27. Klimiuk, P.A., et al., *Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent*. *Clin Immunol*, 1999. **90**(1): p. 65-78.
28. McInnes, I.B. and G. Schett, *Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(6): p. 429-42.
29. Dorner, T. and G.R. Burmester, *The role of B cells in rheumatoid arthritis: mechanisms and therapeutic targets*. *Curr Opin Rheumatol*, 2003. **15**(3): p. 246-52.
30. Niissalo, S., et al., *Neuropeptides in experimental and degenerative arthritis*. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **966**: p. 384-99.
31. Baker, G.H., *Life events before the onset of rheumatoid arthritis*. *Psychother Psychosom*, 1982. **38**(1): p. 173-7.
32. Fries, J.F., et al., *Reduction in long-term disability in patients with rheumatoid arthritis by disease-modifying antirheumatic drug-based treatment strategies*. *Arthritis Rheum*, 1996. **39**(4): p. 616-22.
33. Emery, P., *The Roche Rheumatology Prize Lecture. The optimal management of early rheumatoid disease: the key to preventing disability*. *Br J Rheumatol*, 1994. **33**(8): p. 765-8.
34. van der Horst-Bruinsma, I.E., et al., *Diagnosis and course of early-onset arthritis: results of a special early arthritis clinic compared to routine patient care*. *Br J Rheumatol*, 1998. **37**(10): p. 1084-8.

35. Albers, J.M., et al., *Treatment strategy, disease activity, and outcome in four cohorts of patients with early rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2001. **60**(5): p. 453-8.
36. Roberts, L.J., et al., *Early combination disease modifying antirheumatic drug treatment for rheumatoid arthritis*. *Med J Aust*, 2006. **184**(3): p. 122-5.
37. O'Dell, J.R., *Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(25): p. 2591-602.
38. Choi, H.K., et al., *Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study*. *Lancet*, 2002. **359**(9313): p. 1173-7.
39. Carette, S., *All patients with rheumatoid arthritis should receive corticosteroids as part of their management*. *J Rheumatol*, 2007. **34**(4): p. 656-60.
40. Olsen, N.J. and C.M. Stein, *New drugs for rheumatoid arthritis*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(21): p. 2167-79.
41. Hochberg, M.C., et al., *Comparison of the efficacy of the tumour necrosis factor alpha blocking agents adalimumab, etanercept, and infliximab when added to methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2003. **62 Suppl 2**: p. ii13-6.
42. Kremer, J.M., et al., *Effects of abatacept in patients with methotrexate-resistant active rheumatoid arthritis: a randomized trial*. *Ann Intern Med*, 2006. **144**(12): p. 865-76.
43. Edwards, J.C., et al., *Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(25): p. 2572-81.
44. Cohen, S.B., et al., *Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(9): p. 2793-806.
45. Genovese, M.C., et al., *Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(11): p. 1114-23.
46. Doran, M.F., et al., *Predictors of infection in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(9): p. 2294-300.
47. Genovese, M.C., et al., *Combination therapy with etanercept and anakinra in the treatment of patients with rheumatoid arthritis who have been treated unsuccessfully with methotrexate*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(5): p. 1412-9.
48. Listing, J., et al., *Infections in patients with rheumatoid arthritis treated with biologic agents*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(11): p. 3403-12.
49. Fleischmann, R.M., et al., *Safety of extended treatment with anakinra in patients with rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2006. **65**(8): p. 1006-12.
50. Bathon, J.M., et al., *A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(22): p. 1586-93.
51. Desai, S.B. and D.E. Furst, *Problems encountered during anti-tumour necrosis factor therapy*. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2006. **20**(4): p. 757-90.
52. Crofford, L.J.a.W., R.L., *Arthritis and autoimmunity in animals, in Arthritis and Allied Conditions*. Williams and Wilkins. ed. 1997: Koopman, W. 565-583.
53. Wilder, R.L., et al., *Genetic factors regulating experimental arthritis in mice and rats*. *Curr Dir Autoimmun*, 1999. **1**: p. 121-65.

54. William, R.O., *Rodents models of arthritis: relevance for human disease*. Clin. Exp. Immunol., 1998. **114**: p. 330-332.
55. Bendele, A., et al., *Animal models of arthritis: relevance to human disease*. Toxicol Pathol, 1999. **27**(1): p. 134-42.
56. Pearson, C.M., *Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants*. Proc Soc Exp Biol Med, 1956. **91**(1): p. 95-101.
57. Pearson, C.M., *Studies of polyarthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant. I. General clinical and pathologic characteristics and some modifying factors*. Arthritis and Rheumatism, 1959. **2**: p. 440-459.
58. Waksman, B.H., *Auto-immunization and the lesions of autoimmunity*. Medicine (Baltimore), 1962. **41**: p. 93-141.
59. Taurog, J.D., *Studies of the cellular basis of adjuvant arthritis in the rat*. Adv Inflamm Res, 1984. **7**: p. 161-169.
60. Konttinen, Y.T., et al., *Characterization of the immunocompetent cells of rheumatoid synovium from tissue sections and eluates*. Arthritis Rheum, 1981. **24**(1): p. 71-9.
61. Bersani-Amado, C.A., J.A. Barbuto, and S. Jancar, *Comparative study of adjuvant induced arthritis in susceptible and resistant strains of rats. I. Effect of cyclophosphamide*. J Rheumatol, 1990. **17**(2): p. 149-52.
62. Choy, E.H. and G.S. Panayi, *Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 2001. **344**(12): p. 907-16.
63. Anderson, G.D., et al., *Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis*. J Clin Invest, 1996. **97**(11): p. 2672-9.
64. van Eden, W., et al., *Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to Mycobacterium tuberculosis and to cartilage proteoglycans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(15): p. 5117-20.
65. Holoshitz, J., et al., *Lines of T lymphocytes induce or vaccinate against autoimmune arthritis*. Science, 1983. **219**(4580): p. 56-8.
66. Cohen, I.R., et al., *T lymphocyte clones illuminate pathogenesis and affect therapy of experimental arthritis*. Arthritis Rheum, 1985. **28**(8): p. 841-5.
67. Inglis, J.J., et al., *The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation*. Arthritis Res Ther, 2005. **7**(4): p. R807-16.
68. Agha, A.M. and M. Mansour, *Effects of captopril on interleukin-6, leukotriene B(4), and oxidative stress markers in serum and inflammatory exudate of arthritic rats: evidence of antiinflammatory activity*. Toxicol Appl Pharmacol, 2000. **168**(2): p. 123-30.
69. Dalsgaard, C.J., et al., *Neuropeptides as growth factors. Possible roles in human diseases*. Regul Pept, 1989. **25**(1): p. 1-9.
70. Battey, J.F., et al., *Molecular cloning of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(2): p. 395-9.
71. Weber, H.C., et al., *Structure and chromosomal localization of the mouse bombesin receptor subtype 3 gene*. Gene, 1998. **211**(1): p. 125-31.

72. von Schrenck, T., et al., *Potent bombesin receptor antagonists distinguish receptor subtypes*. Am J Physiol, 1990. **259**(3 Pt 1): p. G468-73.
73. Von Schrenck, T., et al., *Neuromedin B receptor in esophagus: evidence for subtypes of bombesin receptors*. Am J Physiol, 1989. **256**(4 Pt 1): p. G747-58.
74. Wada, E., et al., *cDNA cloning, characterization, and brain region-specific expression of a neuromedin-B-preferring bombesin receptor*. Neuron, 1991. **6**(3): p. 421-30.
75. Wu, J.M., et al., *Discovery of high affinity bombesin receptor subtype 3 agonists*. Mol Pharmacol, 1996. **50**(5): p. 1355-63.
76. Lotz, M., J.H. Vaughan, and D.A. Carson, *Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes*. Science, 1988. **241**(4870): p. 1218-21.
77. Cuesta, M.C., et al., *Substance P and calcitonin gene-related peptide increase IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from human peripheral blood mononuclear cells*. Neurochem Int, 2002. **40**(4): p. 301-6.
78. McDonald, T.J., et al., *Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue*. Biochem Biophys Res Commun, 1979. **90**(1): p. 227-33.
79. Jensen, R.T., et al., *International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian Bombesin Receptors: Nomenclature, Distribution, Pharmacology, Signaling, and Functions in Normal and Disease States*. Pharmacol Rev, 2007.
80. Bjornskov-Bartholdy, L., M. Bersani, and J.J. Holst, *Identification, characterization and release of GRP gene-associated peptides from the normal porcine and human gastro-intestinal tract*. Regul Pept, 1991. **34**(3): p. 197-209.
81. Hernanz, A., *Characterization and distribution of bombesin-like peptides in the rat brain and gastrointestinal tract*. Biochem Cell Biol, 1990. **68**(9): p. 1142-5.
82. Larsen, P.J., et al., *Gastrin releasing peptide (GRP) is present in a GRP(1-27) form in anterior pituitary cells of the guinea pig*. Peptides, 1989. **10**(4): p. 815-8.
83. Fuxe, K., et al., *Immunohistochemical indications of gastrin releasing peptide--bombesin-like immunoreactivity in the nervous system of the rat. Codistribution with substance P-like immunoreactive nerve terminal systems and coexistence with substance P-like immunoreactivity in dorsal root ganglion cell bodies*. Neurosci Lett, 1983. **37**(1): p. 17-22.
84. Helen, P., et al., *Location of substance P-, bombesin-gastrin-releasing peptide, [Met5]enkephalin- and [Met5]enkephalin-Arg6-Phe7-like immunoreactivities in adult human sympathetic ganglia*. Neuroscience, 1984. **12**(3): p. 907-16.
85. Panula, P., et al., *Immunohistochemical localization of bombesin/gastrin-releasing peptide and substance P in primary sensory neurons*. J Neurosci, 1983. **3**(10): p. 2021-9.
86. Lemaire, S., et al., *Bombesin-like immunoreactivity in bovine adrenal medulla*. Regul Pept, 1986. **13**(2): p. 133-46.
87. McKillop, J.M., et al., *Gastrin-releasing peptide in normal and neoplastic human lung: measurement and biochemical characterization*. Int J Cancer, 1990. **46**(4): p. 591-61.

88. Conlon, J.M., et al., *Molecular forms of katacalcin, calcitonin gene-related peptide and gastrin-releasing peptide, in a human medullary thyroid carcinoma.* Cancer Res, 1988. **48**(9): p. 2412-6.
89. Tokita, K., et al., *Molecular basis for selectivity of high affinity peptide antagonists for the gastrin-releasing peptide receptor.* J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36652-63.
90. Xiao, Q., et al., *Gastrin-releasing peptide-like immunoreactivity is present in human maternal and fetal placental membranes.* J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(10): p. 3766-73.
91. Westermarck, T., et al., *Increased content of bombesin/GRP in human synovial fluid in early arthritis: different pattern compared with substance P.* Clin Exp Rheumatol, 2001. **19**(6): p. 715-20.
92. Watson, S., *Bombesin. The G-protein Linked Receptor.* Factsbook ed. 1994.
93. Chu, K.U., et al., *Role of bombesin on gut mucosal growth.* Ann Surg, 1995. **222**(1): p. 94-100.
94. Parekh, D., et al., *Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion.* Pancreas, 1994. **9**(1): p. 83-90.
95. Alexander, R.W., et al., *Effects of bombesin on growth of human small cell lung carcinoma in vivo.* Cancer Res, 1988. **48**(6): p. 1439-41.
96. Bold, R.J., et al., *A human gastric cancer cell line possesses a functional receptor for gastrin-releasing peptide.* Cancer Invest, 1998. **16**(1): p. 12-7.
97. Kim, H.J., et al., *Bombesin-mediated AP-1 activation in a human gastric cancer (SIIA).* Surgery, 1996. **120**(2): p. 130-6; discussion 136-7.
98. Narayan, S., et al., *Specific binding and growth effects of bombesin-related peptides on mouse colon cancer cells in vitro.* Cancer Res, 1990. **50**(21): p. 6772-8.
99. Burns, D.M., et al., *Breast cancer cell-associated endopeptidase EC 24.11 modulates proliferative response to bombesin.* Br J Cancer, 1999. **79**(2): p. 214-20.
100. Bologna, M., et al., *Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro.* Cancer, 1989. **63**(9): p. 1714-20.
101. Logothetis, C. and N. Hoosein, *The inhibition of the paracrine progression of prostate cancer as an approach to early therapy of prostatic carcinoma.* J Cell Biochem Suppl, 1992. **16H**: p. 128-34.
102. Sunday, M.E., et al., *Gastrin-releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease.* Lab Invest, 1988. **59**(1): p. 5-24.
103. Rozengurt, E. and J. Sinnott-Smith, *Bombesin stimulation of DNA synthesis and cell division in cultures of Swiss 3T3 cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(10): p. 2936-40.
104. Willey, J.C., J.F. Lechner, and C.C. Harris, *Bombesin and the C-terminal tetradecapeptide of gastrin-releasing peptide are growth factors for normal human bronchial epithelial cells.* Exp Cell Res, 1984. **153**(1): p. 245-8.
105. Cuttitta, F., et al., *Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer.* Nature, 1985. **316**(6031): p. 823-6.

106. Ghatei, M.A., et al., *Bombesin: action on gut hormones and calcium in man.* J Clin Endocrinol Metab, 1982. **54**(5): p. 980-5.
107. Minamino, N., K. Kangawa, and H. Matsuo, *Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord.* Biochem Biophys Res Commun, 1983. **114**(2): p. 541-8.
108. McCoy, J.G. and D.D. Avery, *Bombesin: potential integrative peptide for feeding and satiety.* Peptides, 1990. **11**(3): p. 595-607.
109. Brown, M.R., K. Carver, and L.A. Fisher, *Bombesin: central nervous system actions to affect the autonomic nervous system.* Ann N Y Acad Sci, 1988. **547**: p. 174-82.
110. Albers, H.E., et al., *Interaction of colocalized neuropeptides: functional significance in the circadian timing system.* J Neurosci, 1991. **11**(3): p. 846-51.
111. Hill, D.J. and T.J. McDonald, *Mitogenic action of gastrin-releasing polypeptide on isolated epiphyseal growth plate chondrocytes from the ovine fetus.* Endocrinology, 1992. **130**(5): p. 2811-9.
112. Roesler, R., J.A. Henriques, and G. Schwartzmann, *Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders.* CNS Neurol Disord Drug Targets, 2006. **5**(2): p. 197-204.
113. Roesler, R., et al., *Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus.* Neuropharmacology, 2006. **51**(2): p. 350-7.
114. Uddman, R., E. Moghimzadeh, and F. Sundler, *Occurrence and distribution of GRP-immunoreactive nerve fibres in the respiratory tract.* Arch Otorhinolaryngol, 1984. **239**(2): p. 145-51.
115. Medina, S., et al., *Changes with age in the modulation of natural killer activity of murine leukocytes by gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y and sulfated cholecystinin octapeptide.* Neuropeptides, 1998. **32**(6): p. 549-55.
116. Del Rio, M., A. Hernanz, and M. de la Fuente, *Bombesin, gastrin-releasing peptide, and neuromedin C modulate murine lymphocyte proliferation through adherent accessory cells and activate protein kinase C.* Peptides, 1994. **15**(1): p. 15-22.
117. Del Rio, M. and M. De la Fuente, *Chemoattractant capacity of bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C is mediated through PKC activation in murine peritoneal leukocytes.* Regul Pept, 1994. **49**(3): p. 185-93.
118. De la Fuente, M., M. Del Rio, and A. Hernanz, *Stimulation of natural killer and antibody-dependent cellular cytotoxicity activities in mouse leukocytes by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C: involvement of cyclic AMP, inositol 1,4,5-trisphosphate and protein kinase C.* J Neuroimmunol, 1993. **48**(2): p. 143-50.
119. Subramaniam, M., et al., *Bombesin-like peptides and mast cell responses: relevance to bronchopulmonary dysplasia?* Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(5): p. 601-11.
120. Green, P.G., *Gastrin-releasing peptide, substance P and cytokines in rheumatoid arthritis.* Arthritis Res Ther, 2005. **7**(3): p. 111-3.
121. Schally, A.V., *Cancer Medicine.* 1997, Baltimore: Williams and Wilkins. 1067-1085.

122. Radulovic, S., et al., *Biological effects and receptor binding affinities of new pseudonapeptide bombesin/GRP receptor antagonists with N-terminal D-Trp or D-Tpi*. Int J Pept Protein Res, 1991. **38**(6): p. 593-600.
123. Davis, T.P., et al., *Metabolic stability and tumor inhibition of bombesin/GRP receptor antagonists*. Peptides, 1992. **13**(2): p. 401-7.
124. Groot, K., et al., *Development of a radioimmunoassay for a pseudonapeptide bombesin/GRP antagonist with antitumor activity*. Int J Pept Protein Res, 1995. **45**(6): p. 561-6.
125. Pinski, J., et al., *Endocrine effects of new bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists in rats*. Am J Physiol, 1992. **263**(4 Pt 1): p. E712-7.
126. Pinski, J., et al., *High potency of a new bombesin antagonist (RC-3095) in inhibiting serum gastrin levels; comparison of different routes of administration*. Regul Pept, 1992. **41**(3): p. 185-93.
127. Schwartzmann, G., et al., *A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies*. Invest New Drugs, 2006. **24**(5): p. 403-12.
128. Szepeshazi, K., et al., *Inhibitory effect of bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 and high dose of somatostatin analogue RC-160 on nitrosamine-induced pancreatic cancers in hamsters*. Cancer Res, 1991. **51**(21): p. 5980-6.
129. Szepeshazi, K., et al., *Effect of bombesin, gastrin-releasing peptide (GRP)(14-27) and bombesin/GRP receptor antagonist RC-3095 on growth of nitrosamine-induced pancreatic cancers in hamsters*. Int J Cancer, 1993. **54**(2): p. 282-9.
130. Szepeshazi, K., et al., *Growth inhibition of estrogen-dependent and estrogen-independent MXT mammary cancers in mice by the bombesin and gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095*. J Natl Cancer Inst, 1992. **84**(24): p. 1915-22.
131. Pinski, J., et al., *Antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptides as adjuncts to agonists of luteinizing hormone-releasing hormone in the treatment of experimental prostate cancer*. Cancer, 1993. **72**(11): p. 3263-70.
132. Qin, Y., et al., *Antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptide inhibit growth of SW-1990 human pancreatic adenocarcinoma and production of cyclic AMP*. Int J Cancer, 1995. **63**(2): p. 257-62.
133. Shirahige, Y., et al., *Inhibitory effect of bombesin/gastrin-releasing peptide (GRP) antagonists RC-3950-II and RC-3095 on MCF-7 MIII human breast cancer xenografts in nude mice*. Biomed Pharmacother, 1994. **48**(10): p. 465-72.
134. Pinski, J., et al., *Inhibition of growth of MKN45 human gastric-carcinoma xenografts in nude mice by treatment with bombesin/gastrin-releasing-peptide antagonist (RC-3095) and somatostatin analogue RC-160*. Int J Cancer, 1994. **57**(4): p. 574-80.
135. Radulovic, S., et al., *Inhibitory effects of antagonists of bombesin/gastrin releasing peptide (GRP) and somatostatin analog (RC-160) on growth of HT-29 human colon cancers in nude mice*. Acta Oncol, 1994. **33**(6): p. 693-701.
136. Halmos, G. and A.V. Schally, *Reduction in receptors for bombesin and epidermal growth factor in xenografts of human small-cell lung cancer after treatment with bombesin antagonist RC-3095*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(3): p. 956-60.

137. Pinski, J., et al., *Effect of somatostatin analog RC-160 and bombesin/gastrin releasing peptide antagonist RC-3095 on growth of PC-3 human prostate-cancer xenografts in nude mice*. Int J Cancer, 1993. **55**(6): p. 963-7.
138. Miyazaki, M., et al., *Inhibition of growth of MDA-MB-231 human breast cancer xenografts in nude mice by bombesin/gastrin-releasing peptide (GRP) antagonists RC-3940-II and RC-3095*. Eur J Cancer, 1998. **34**(5): p. 710-7.
139. Kahan, Z., et al., *Inhibition of growth of MDA-MB-468 estrogen-independent human breast carcinoma by bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists RC-3095 and RC-3940-II*. Cancer, 2000. **88**(6): p. 1384-92.
140. Bajo, A.M., et al., *Bombesin antagonists inhibit growth of MDA-MB-435 estrogen-independent breast cancers and decrease the expression of the ErbB-2/HER-2 oncoprotein and c-jun and c-fos oncogenes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3836-41.
141. Szepeshazi, K., et al., *A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10913-8.

6. Artigo Científico Redigido em Inglês

Effects of an antagonist of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats.

Oliveira, P.G.1, Brenol C.V. 2, Edelweiss, M.I. 3, Brenol J.C.T. 4, Petronilho, F. 5,
Roesler R. 6, Dal-Pizzol F. 7, Schwartzmann G. 8, Xavier R.M. 9

This work was partially supported by FIPE (Fundação de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre) and by Zentaris GmbH.

1 Postgraduate student: Medical Sciences; Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

2 MD, MSc, Division of Rheumatology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3 PhD, Assistant Professor of the Pathology Department, UFRGS.

4 PhD, Assistant Professor of the Internal Medicine Department, UFRGS.

5 Postgraduate student: Biochemical; Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).

6 PhD, Assistant Professor of the Institute for Basic Health Sciences, Departments of Biochemistry and Pharmacology, UFRGS.

7 PhD, Assistant Professor of the Biochemistry Department, UNESC.

8 PhD, Assistant Professor of the Internal Medicine Department, UFRGS.

9 PhD, Assistant Professor of the Internal Medicine Department, UFRGS.

Correspondence to:

Ricardo Machado Xavier, PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
Serviço de Reumatologia, Rua Ramiro Barcellos, 2350, sala 645
Zip code 90035-003 - Porto Alegre, Brasil.

Fone: 55-51-21018340

Fax: 55-51-33313834

Abstract

Background: Recently, targeting of neuropeptides has been suggested to have potential therapeutic effects in RA. The gastrin-releasing peptide (GRP) is the homologous mammalian of the bombesin (BN), and its receptor signaling is involved in several functions, including cancer growth, immune cell regulation and inflammatory conditions, and has been found in RA synovial fluid in concentrations that correlate with IL-6 and TNF. RC-3095 is the antagonist of the GRP receptor, and has been demonstrated to modulate the release of proinflammatory cytokines (TNF and IL-1 β) by activated macrophages, leading to decreased inflammatory infiltration. **Objective:** To determine the effects of RC-3095 in clinical and histopathologic parameters and inflammatory mediators on complete Freund's adjuvant-induced arthritis. **Methods:** The arthritis was induced by injection of complete Freund's adjuvant (CFA) into the left hind footpad in males of Wistar rats. The animals were divided into control, vehicle injected control, placebo group (saline subcutaneously 50ml/kg, once daily for 8 days after modeling), treatment group (0.3 mg/kg of RC-3095 subcutaneously, once daily for 8 days after induction). Clinical evaluation was accomplished daily, through scoring of the paw edema. The animals were sacrificed 15 days after induction for collection of hind foot joints for histology. We used a histological scoring system which was previously described, and interferon (INF)- γ , Interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL)-6 and interleukin (IL)-10 were measured by ELISA. Statistical analyses were compared by Student t-test to determine the difference between placebo and treatment groups for histological scores, and cytokines levels were compared using Mann-Whitney test ($p < 0.05$). **Results:** There was significant inhibition of joint histological findings in the RC-3095 treated group, including synovial inflammatory infiltration ($p < 0.001$), synovial hyperplasia ($p = 0.004$), extension of pannus ($p < 0.001$), synovial fibrosis ($p < 0.001$), angiogenesis ($p = 0.033$), cartilage ($p \leq 0.001$) and bone erosion

($p < 0.001$). IFN- γ ($p < 0.001$), IL-1 β ($p < 0.001$), TNF ($p = 0.003$), IL-6 ($p = 0.048$) and IL-10 ($p = 0.015$) serum levels were significantly lower in the treated group. Paw swelling and subcutaneous inflammation, evaluated clinically, were not different between CFA-induced groups. **Conclusions:** RC-3095 was able to improve experimental arthritis, attenuate joint damage and decrease serum levels of IFN- γ , IL-1 β , TNF, IL-6 and IL-10. These data indicate that interference with GRP pathway is a potential new strategy for the treatment of RA that needs further investigational studies.

Key words: Animal Model, Synovitis, Complete Freund's adjuvant, Gastrin-releasing peptide, RC-3095.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease associated with multiple inflammatory mediators that leads to joint damage, synovial inflammation and cartilage and bone damage. The chronic nature of this disease results in a progressive joint destruction, which leads to severe functional disability and deteriorated quality of life. The prevalence of RA varies worldwide between 0.5-1% (1). Despite important advances in our understanding of its pathophysiology, the environmental and genetic etiologic factors remain poorly understood. The increased secretion of proinflammatory mediators, such as interleukin-1 (IL-1 β) and tumor necrosis factor (TNF), by activated synovial cells is thought to be a crucial process in maintaining chronic inflammation and progression of cartilage and bone lesions. These cytokines, interacting with additional growth factors, stimulate the overgrowth of synovial cells to form a mass of synovial tissue with exuberant new blood vessels, called pannus, which invades the cartilage and bone via osteoclast activation and protease production (2). Several new therapeutic strategies aiming at modulation of cytokine function have been found to be highly effective for the treatment of RA (3). However, not all patients respond well with these therapies, and new treatment strategies are needed.

The possible role of neuropeptides, including the vasoactive intestinal peptide (VIP), substance P (SP) and neuropeptide Y (NPY), in the mechanisms of joint inflammation has been investigated in RA (4). Another neuropeptide that has been studied is the gastrin-releasing peptide (GRP), which is the mammalian homologue of bombesin (BN), a tetradecapeptide originally isolated from frog skin (5). GRP affects several systems in mammals, including neuroendocrine regulation, gastrointestinal secretion and cell proliferation. Its presence in increased concentrations has been demonstrated in the joint fluid of RA patients (6), in correlation with the erythrocyte sedimentation rate and with proinflammatory cytokine levels, such as TNF, interleukin-6 (IL-6) and monocyte

chemoattractant protein, suggesting that this neuropeptide could be involved in modulation of the inflammatory process. Moreover, recently the presence of GRP receptors in articular chondrocytes and inflammatory infiltrates from mouse arthritic models has been reported. Therefore, it has been suggested that this neuropeptide could be an interesting target for new therapeutic strategies in RA (7).

Using a specific antagonist of the GRP receptor, RC-3095, we have demonstrated that GRP receptor inhibition could induce a decrease of TNF and IL-1 β release from activated macrophages in an experimental model of sepsis, indicating that GRP could represent a possible pharmacologic target for the control of systemic inflammation (8). Notably, RC-3095 was also shown to possess impressive anti-tumor activity against murine and human tumor in laboratory models, while no significant toxic effects were documented (9). Based on these results, our group has conducted a Phase I trial in patients with advanced malignancies, confirming its anti-tumor effects and the absence of significant adverse systemic side-effects (10). Thus, we hypothesized that RC-3095, a prototype of a synthetic BN/GRP antagonist, could be an attractive and safe candidate compound for future trials in TNF and/or IL-1-dependent chronic inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis. In this paper, we evaluated the effects of the administration of RC-3095 in rats with complete Freund's adjuvant-induced arthritis.

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats weighing 180-240g were used. The animals were caged at 22°C, with 12 hours light-dark cycle and free access to food and water until the time of experiments. All experimental procedures involving animals were performed in accordance with the

National Institutes of Health (Bethesda, MD) Guide for Care and Use of Animals and with the approval of our institutional Ethics Committee.

Experimental animals were first randomly divided into four groups (n=39) named as: **(1)** Control (not manipulated); **(2)** Vehicle injected control (intraplantar injection 150µl of mineral oil, vehicle of CFA); **(3)** Placebo (saline administered subcutaneously 50ml/kg, once a day for 8 days starting after 7th day of CFA induction); **(4)** Treatment (0.3 mg/kg of RC-3095 administered subcutaneously once a day for 8 days starting after 7th day of CFA induction) (8). Inflammation was induced on day 0 by a single intraplantar injection 150µl of complete Freund's adjuvant (CFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, MO) into the left hind footpad of each animal, after the rats had been anesthetized with ketamine chlorhydrate (Ketalar, Parke Davis, 50 mg/kg) and xilazine 2% (Rompun, Bayer, 20 mg/kg) cocktail intraperitoneally. The animals were monitored for 15 days and killed on the 15th day after the induction of arthritis, by anesthetic overdose. Blood was drawn by heart puncture in order to determine serum cytokine levels, and hind paws were collected for histology analysis. Clinical evaluation was accomplished daily, through standardized scoring of the edema (ANEXO I).

Drug

GRP receptor antagonist RC-3095, originally synthesized in the Schally laboratory by solid-phase methods (11), was donated by Zentaris (Frankfurt am Main, Germany).

Edema scoring

We used the following edema scoring to evaluate the degree of swelling and redness of the paws: 0 - normal, 1 – mild swelling and redness, 2 – moderate swelling and redness, 3 – severe swelling and redness. The CFA-injected animals presented an extensive periarticular soft tissue edema that hampered the clinical scoring of arthritis. As a matter

of fact, we have previously reported that these animals develop a severe panniculitis with striking similarity with erythema induratum (12).

Histology and histologic scoring

At the end of the arthritis observation period (15 days), the hind paws were excised and fixed in 10% buffered formalin for 7 days. Paws were then decalcified with nitric acid 10% for 27 hours. Tissues were sectioned, embedded in paraffin, and slides prepared and stained with hematoxylin and eosin. We used a described comprehensive histologic scoring system. Briefly, tibiotalar, talus-calcaneal, and midfoot joints were histologically scored for the following parameters: **synovial inflammation:** five high-power magnification fields (HMF) were scored for the percentage of infiltrating mononuclear cells as follows: 0- absent, 1-mild (1-10%), 2-moderate (11-50%), 3- severe (51-100%); **synovial hyperplasia:** 0- absent, 1- mild (5-10 layers), 2- moderate (11-50 layers), 3- severe (>20 layers); **extension of pannus formation based on the reader's impression:** 0- absent, 1- mild, 2- moderate, 3- severe; **synovial fibrosis:** 0- absent, 1- mild (1-10%), 2- moderate (11-50%), 3- severe (51-100%); **synovial vascularity (angiogenesis):** The number of vessels was counted in five HMF of synovial tissue and the mean used for analyses; **cartilage erosion:** Percentage of the cartilage surface that was eroded: 0- absent, 1- mild (1-10%), 2- moderate (11-50%), 3- severe (51-100%); **bone erosion:** 0- none, 1- minor erosion(s) observed only at HMF, 2- moderate erosion(s) observed at low magnification, 3- severe transcortical erosion(s) (ANEXO II) (1).

Assay for serum cytokines dosage

The concentrations of Interferon (INF)- γ , IL-1 β , TNF, interleukin-6 (IL-6) and interleukin (IL)-10 in serum were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (R&D

Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer instructions. The analytic sensitivity for these assays was 10 pg/ml.

Statistical Analysis

Results are expressed as mean±SD, median (interquartile ranges). Significance was accepted at $p < 0,05$ levels. Differences between placebo and treatment groups for histological scores were determined by Student t-test, and cytokines levels were compared using Mann-Whitney test. All statistical analyses were performed using the statistical package SPSS 13.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL).

Results

Clinical observations

The weights of the rats remained unchanged over the period of study with no significant differences between placebo and treated groups. After 7 days of CFA-induction all animals had developed a severe arthritis in the injected paw, while there were no changes in the non-manipulated control and the vehicle injected control groups (Fig.1A and B). There was no difference in the edema score of the injected paws between the placebo and the RC-3095 treated animals (mean 3.0 ± 0.0 in the placebo and 2.9 ± 0.3 in the treated groups, $p = 0.845$).

RC-3095 treatment inhibited histological damage

The histological findings for each group are shown in Figure 2 and the histological scorings are detailed on Table I. The placebo group presented a highly abnormal histology of the joint, with pronounced synovial inflammation, synovial hyperplasia, pannus formation and extensive erosive changes in the cartilage and bone (Figure 2A). These arthritic changes could also be observed in the contralateral paw (Fig. 2B),

confirming the immunologic nature of these lesions. In contrast, the RC-3095 treated group had a remarkable inhibition of all histological findings of arthritis, presenting only mild inflammatory infiltration and nearly normal joint architecture of the injected paw, and no changes in the contralateral paw (Figure 2C and D).

Effects of RC-3095 on the cytokine serum levels

The serum levels of cytokines on day 15 after CFA injection were measured by ELISA. Concentrations of INF- γ , IL-1 β , IL-10, TNF and IL-6 in serum are presented in Table 2. The placebo group had significantly higher serum levels of all the analyzed cytokines compared to the RC-3095 treated group. In fact, treatment with RC-3095 nearly normalized all cytokines levels, which were similar to the levels found in the control group.

Discussion

New biological therapeutic agents have greatly contributed to improve disease control in rheumatoid arthritis (3), yet remission is rarely achieved. Therefore, the identification of novel pathogenic pathways and molecular targets for new and effective treatments is important to address this unmet need.

In the present study, we report on the beneficial effects of the selective bombesin/GRP receptor antagonist, RC-3095, leading to a decrease of the inflammatory infiltration and articular damage in a well-established model for experimental arthritis. This is the first report on the effectiveness of a strategy aiming at inhibition of GRP in arthritis model.

In addition to evaluating clinical arthritis severity during a 15 days observation period, comprehensive histologic analyses that evaluated several different parameters and the quantification of INF- γ , IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-10 in serum were conducted. These

analyses revealed association of RC-3095 therapy with the preservation of the joint architecture, significant reduction in synovial hyperplasia and pannus formation, reduction of the synovial inflammatory infiltration and number of synovial vessels (angiogenesis). This effect could be observed both in the injected paw and the contralateral paw. Remarkably, serum levels of all cytokines tested were brought down to levels similar to the control (non-injected) rats. These findings demonstrate that, besides blocking several processes associated with articular damage, RC-3095 inhibits the release of proinflammatory cytokines, indicating a systemic inhibitory effect of the innate and specific immune response.

The CFA-injected animals presented an extensive periarticular soft tissue edema and histological panniculitis, as we have recently reported (12). Interestingly, there was little clinical improvement of this edema with RC-3095 administration, in contrast with the marked articular effects. We can only speculate on the mechanisms of these different responses. We have shown that CFA-induced panniculitis involves a predominant cellular immune response, and it is possible that the inflammatory cytokine inhibition induced by GRP-receptor suppression would not be so relevant for this process, or that still higher doses of the compound would be required. Further exploration of this issue would help to clarify the mechanisms of inflammatory modulation of RC-3095.

Little is known about the physiologic effects of GRP on immune function. Receptors for GRP have been detected in various cells of the gastrointestinal system; pancreas; smooth muscles of the digestive tract, bladder, and uterus; the neuronal elements of the myenteric plexus; and in the nervous system (13). Lymphocytes, neutrophils, eosinophils, macrophages, mast cells and endothelial cells express receptor for GRP. The expression of GRP receptors depends on cell differentiation, and GRP can stimulate or inhibit responses, depending on the maturity and state of activation of the target cell (14). Previous work had shown that GRP seems to exert a significant effect on different

aspects of immune regulation in arthritic joints, and that BN/GRP-like peptide is clearly detectable in the synovial fluid of patients with RA but not in control subjects, in correlation with inflammatory cytokine levels and erythrocyte sedimentation rate (6). The same authors have recently performed immunohistochemical analysis of joint tissues from arthritic rats, and observed the expression of GRP-receptors in chondrocytes lining the articular surface in control animals, which clearly decreases during severe arthritis. They also observed frequent BN/GRP immunoreactive varicose nerve fibers in association with the inflammatory infiltrate, and the presence of GRP-receptor in some cells in the infiltrate. This study, thus, shows that BN/GRP can be added to the list of neuropeptides present in joint innervations, especially in association with the inflammatory infiltrates (15).

In conclusion, RC-3095 was able to attenuate damage and to improve arthritis in a relevant animal model of arthritis. This is the first report of a protective effect of a bombesin/GRP antagonist in these conditions and of the possible role of GRP in the development of arthritis. Our data suggest that RC-3095 regulates the arthritis severity. Therefore, these data indicate that interference with GRP pathway is a potential new strategy for the treatment of RA that needs further investigational studies.

Conflict of Interest Statement: R.R. and G.S. are inventors in a provisional patent application for the therapeutic use of gastrin-releasing peptide receptor antagonists in the treatment of inflammatory conditions. The other authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Percio Gulko and Dr. Max Brenner for the assistance with the histopathologic analyses.

Bibliography

1. Brenner M, Meng HC, Yarlett NC, Joe B, Griffiths MM, Remmers EF, et al. The non-MHC quantitative trait locus Cia5 contains three major arthritis genes that differentially regulate disease severity, pannus formation, and joint damage in collagen- and pristane-induced arthritis. *J Immunol* 2005;174:7894-903.
2. Klimiuk PA, Yang H, Goronzy JJ, Weyand CM. Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent. *Clin Immunol* 1999;90:65-78.
3. Siddiqui MA. The efficacy and tolerability of newer biologics in rheumatoid arthritis: best current evidence. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19:308-13.
4. Larsson J, Ekblom A, Henriksson K, Lundeberg T, Theodorsson E. Concentration of substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in synovial fluid from knee joints in patients suffering from rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1991;20:326-35.
5. McDonald TJ, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, Mutt V. A gastrin releasing peptide from the porcine nonantral gastric tissue. *Gut* 1978;19:767-74.
6. Grimsholm O, Rantapaa-Dahlqvist S, Forsgren S. Levels of gastrin-releasing peptide and substance P in synovial fluid and serum correlate with levels of cytokines in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R416-26.
7. Keeble JE, Brain SD. A role for substance P in arthritis? *Neurosci Lett* 2004;361:176-9.
8. Dal-Pizzol F, Di Leone LP, Ritter C, Martins MR, Reinke A, Pens Gelain D, et al. Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:84-90.
9. Cornelio D, Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann Oncol* 2007;18:1457-66.
10. Schwartzmann G, DiLeone LP, Horowitz M, Schunemann D, Cancelli A, Pereira AS, et al. A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies. *Invest New Drugs* 2006;24:403-12.
11. Szepeshazi K, Halmos G, Groot K, Schally AV. Combination treatment of nitrosamine-induced pancreatic cancers in hamsters with analogs of LH-RH and a bombesin/GRP antagonist. *Int J Pancreatol* 1994;16:141-9.
12. Oliveira PG, Brenol CV, Edelweiss MI, Meurer L, Brenol JCT, Xavier RM. The subcutaneous inflammation (panniculitis) in tibio-tarsal joint of rats inoculated with complete Freund's adjuvant (CFA). *Clin Exp Med*. 2007;(in press).
13. Ohki-Hamazaki H, Iwabuchi M, Maekawa F. Development and function of bombesin-like peptides and their receptors. *Int J Dev Biol* 2005;49:293-300.
14. Furness JB, Kunze WA, Clerc N. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. *Am J Physiol* 1999;277:G922-8.
15. Grimsholm O, Guo Y, Ny T, Rantapaa-Dahlqvist S, Forsgren S. Are neuropeptides important in arthritis? Studies on the importance of bombesin/GRP and substance P in a murine arthritis model. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1110:525-38.

Table 1. Synovial histologic scoring of left ankles collected 15 days after CFA injection and treatment with RC-3095

	Control (n=4)	Vehicle injected control (n=4)	Placebo (n=12)	Treated (n=11)	P (Treated x Placebo)
Synovial Inflammation (0-3)	0,0±0,0	0,8±0,5	2,7±0,5	1,5±0,5	p<0,001
Synovial hyperplasia (0-3)	0,0±0,0	0,0±0,0	1,1±0,5	0,4±0,5	p=0,004
Extension of Pannus (0-3)	0,0±0,0	0,0±0,0	2,4±0,7	1,3±0,5	p<0,001
Synovial fibrosis (0-3)	0,0±0,0	0,0±0,0	1,6±0,5	0,5±0,5	p<0,001
Number of vessels/HMF	0,0±0,0	0,0±0,0	15±5	11±4	p=0,033
Cartilage erosions (0-3)	0,0±0,0	0,0±0,0	2,1±0,7	1,1±0,5	p≤0,001
Bone erosions (0-3)	0,0±0,0	0,0±0,0	1,4±0,7	0,3±0,5	p<0,001

Value are means±SD. CFA, complete Freund's adjuvant; Ankles specimens were obtained on day 15 postinjection of CFA; HMF, high power magnification field. Test t of Student for compares the treated and placebo groups. P<0.05 was considered significant.

Table 2. Effects of RC-3095 on serum cytokines 15 days after CFA injection

	Control	Placebo	Treated	P* (Treated x Placebo)
INF- γ (pg/ml)	19,87 (12,6 – 21,7)	396,9 (265,4 - 480,2)	46,2 (26,6 - 73,6)	p<0,001
IL-1 β (pg/ml)	32,8 (26,4 - 51,1)	315,9 (232,4 - 633,5)	41,6 (32,0 - 49,3)	p<0,001
IL-10 (pg/ml)	29,2 (22,9 - 34,6)	85,3 (44,6 - 153,6)	29,3 (19,9 - 54,5)	p=0,015
TNF- α (pg/ml)	54,9 (27,5 – 148,0)	478,0 (174,3 - 841,9)	96,8 (35,1 – 148,0)	p=0,003
IL-6 (pg/ml)	45,8 (37,9 – 60,4)	48,9 (37,6 – 64,9)	33,9 (28,1 – 41,8)	p=0,048

Value is in median (interquartile range). n= 5-8 animals per group. CFA, complete Freund's adjuvant; *Mann-Whitney test for comparison of the treated and placebo groups. P<0,05 was considered significant.



Figure 1. Hind limbs of rats with CFA. A) Initial arthritis with moderate midfoot swelling and erythema after 7 days after CFA-induction; B) Acute arthritis with pronounced ankle, midfoot and fingers swelling and erythema, in the contralateral paw developed arthritis affecting metatarsophalangeal and phalangeans joints 15 days after CFA-induction.

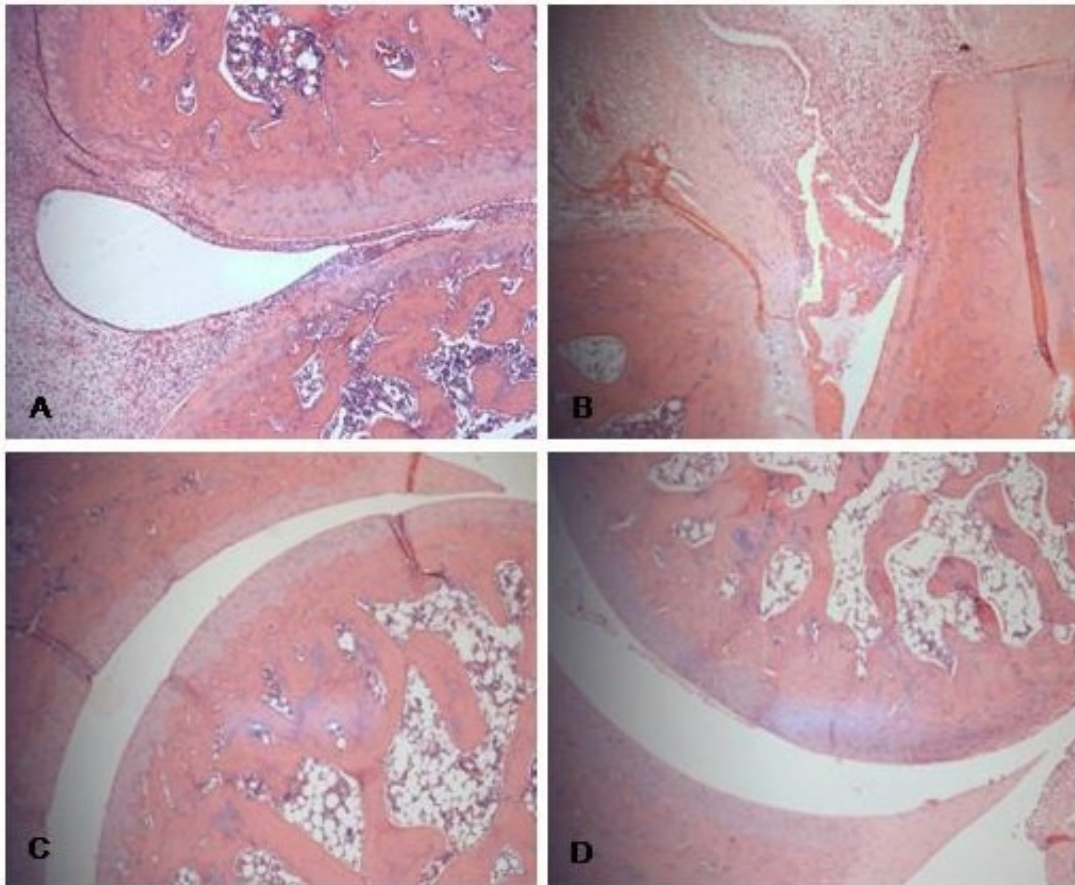


Figure 2. Ankle histologic characteristics (15 days post CFA-injection). A and B) Placebo - left and right ankle, severe articular damage with increased synovial inflammation, cartilage- and bone-infiltrating pannus; C) Treated - left ankle, decrease of the articular inflammation with mild synovial inflammation; D) Treated - right ankle, without articular alteration. Stained with hematoxylin and eosin. Original magnification X 10.

7. Conclusões

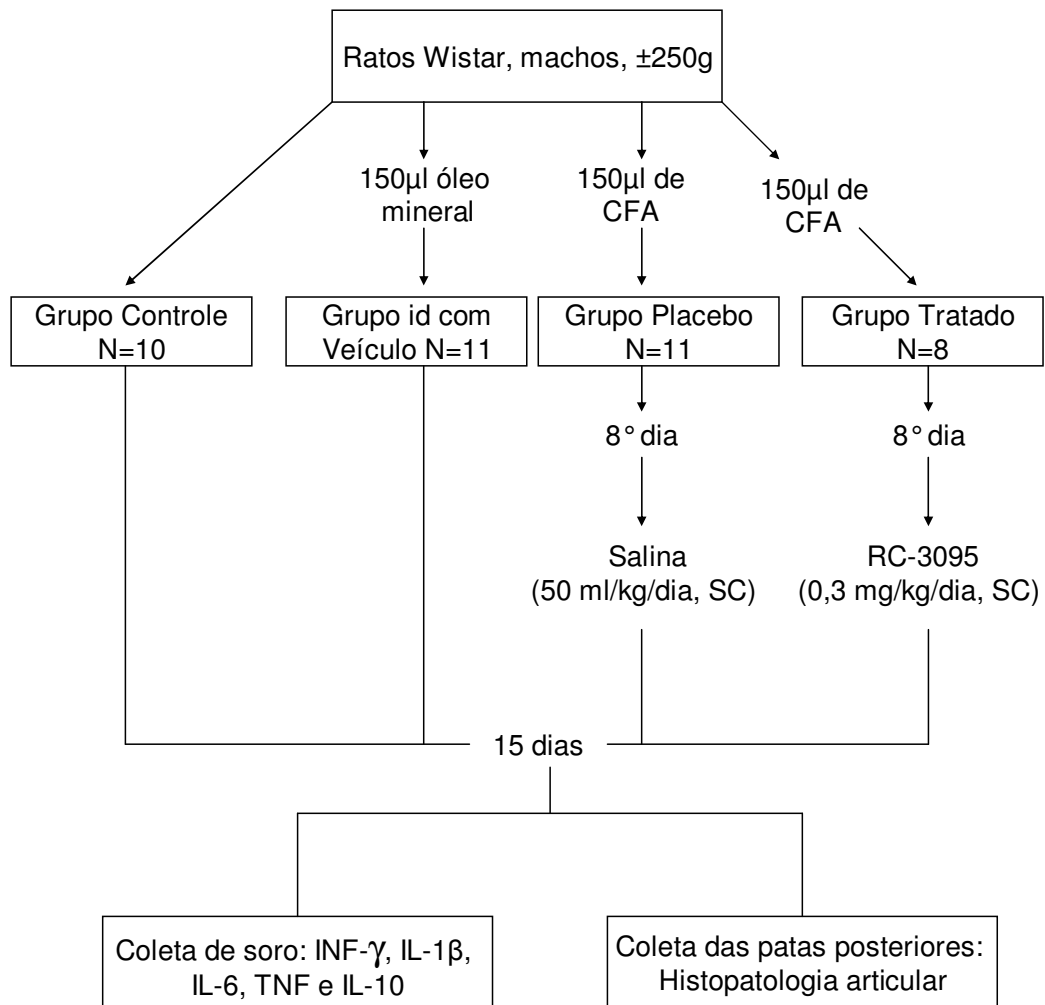
De acordo com os métodos utilizados neste estudo e os resultados obtidos no mesmo, podem ser enunciadas as seguintes conclusões:

- 1) Não foram encontradas diferenças significativas na análise clínica visual quanto ao edema nos grupos placebo e tratado;
- 2) O dano articular nas articulações tibio-társica posteriores foi significativamente maior no grupo placebo em comparação com os outros grupos. O grupo tratado apresentou apenas um infiltrado inflamatório leve, apresentando arquitetura articular normal na pata contralateral.
- 3) Houve uma diminuição significativa nos níveis séricos das citocinas no grupo tratado com RC-3095 que assemelhou-se aos níveis encontrados no grupo controle. Enquanto o grupo placebo apresentou níveis significativamente elevados.
- 4) O RC-3095 foi capaz de regular a gravidade da artrite, atenuando os danos no modelo experimental de artrite, tornando-se uma potencial terapia para o tratamento da artrite reumatóide.

8. Anexos

8.1 ANEXO I – Fluxograma do Procedimento Experimental

Fluxograma do Procedimento Experimental



8.2 ANEXO II – Protocolo para análise histopatológica das articulações (Brenner et al, 2005)

Histopatologia da Articulação – Protocolo de Interpretação

Código do animal: _____

Infiltrado Inflammatory mononuclear

0 ausente 1 leve (1-10%) 2 moderado (11-50%) 3 severo (51-100%)

Hiperplasia Sinovial

0 ausente 1 leve (5-10cam.) 2 moderado (11-20cam.) 3 severo (20cam.)

Extensão da Formação de Pannus

0 ausente 1 leve 2 moderado 3 severo

Fibrose Sinovial

0 ausente 1 leve (1-10%) 2 moderado (11-50%) 3 severo (51-100%)

Angiogenesis Sinovial

Contagem do número de vasos nos 5 campos de alto-poder (5HPF)

a.[] b.[] c.[] d.[] e.[] = media []

Erosão da Cartilagem

0 ausente 1 leve (1-10%) 2 moderado (11-50%) 3 severo (51-100%)

Erosão Óssea

0 ausente 1 leve (5HPF) 2 moderado (>aumento) 3 severo (erosão transcortical, invade medula óssea, neoformação óssea cortical)