

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

***Avaliação da eficácia de um antagonista do
receptor do peptídeo liberador da gastrina em
modelos experimentais de artrite***

Patricia Gnieslaw de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

**Tese de Doutorado
2011**

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

***Avaliação da eficácia de um antagonista do
receptor do peptídeo liberador da gastrina em
modelos experimentais de artrite***

Patricia Gnieslaw de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

**Tese de Doutorado
2011**

OLIVEIRA, Patricia Gnieslaw de

Avaliação da eficácia de um antagonista do receptor do peptídeo liberador da gastrina em modelos experimentais de artrite / Patricia Gnieslaw de Oliveira; orientador Ricardo Machado Xavier. Porto Alegre, 2011.

70 f.

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

1. Artrite Reumatoide 2. Modelo Animal 3. Albumina bovina metilada
4. Colágeno tipo II 5. Peptídeo liberador da gastrina 6. RC-3095.

“Aprenda! Não ter opinião formada, sobre nada, é uma das maneiras de fortalecer o aprendizado. A sabedoria esta na vida daqueles que se consideram eternos aprendizes”.

Legrand

Dedicatória

*Agradeço de modo especial, aos meus **Thierry's**, meu marido e filho lindo, que foram parte principal desta minha realização, meu amor sempre presente em todos os momentos. Pai dedicado, com quem pude partilhar e dividir todos os sonhos. Obrigada por fazerem parte da minha vida.*

Agradecimentos especiais

Ao **Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier**, pelas oportunidades para carreira científica, pela confiança e respeito ao meu trabalho, e dedicação no desenvolvimento deste trabalho. Por compartilhar seus conhecimentos, seu tema de pesquisa e oferecer seus ensinamentos, que vão além da ciência.

Ao **Prof. Dr. Fernando de Queiros Cunha**, pelos valiosos conhecimentos transmitidos, pela oportunidade de convívio, e por suas expressivas contribuições.

Agradecimentos

À Profª Luise Meurer

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 científicos transmitidos, exemplo de simplicidade e pelo privilégio da convivência.

A todos os colegas do Laboratório de Farmacologia da USP - Ribeirão Preto: Renata Grespan, Larissa Garcia Pinto, Thiago Cunha, Henrique Lemos pelo acolhimento, companheirismo, ensinamentos e contribuições na realização deste estudo.

A todas as colegas do Laboratório de Doenças Auto-imune e infecciosas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: Lidiane Isabel Filippin, Vivian Teixeira e Priscila Lora pelo convívio e boas discussões científicas.

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

As **secretarias** do Serviço de Reumatologia: Juliana e Sibeli, pela competência, dedicação, oportunidade de convívio e carinho dispensados.

Ao **secretario** de Centro de Pesquisas Experimentais, Everaldo, 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 Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A **CAPES** e **CNPQ**, pelo auxílio financeiro.

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

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.....	11
Figuras e Tabelas.....	13
Resumo.....	14
Abstract.....	16
1. Introdução.....	17
2. Revisão da Literatura.....	21
2.1 Artrite Reumatoide.....	21
2.1.1 Conceito e Prevalência da AR.....	21
2.1.2 Fisiopatogênese da AR.....	23
2.1.3 Tratamentos da AR.....	26
2.2 Modelos Animais de AR.....	28
2.2.1 Modelos Murinos de Artrite induzida por antígeno albumina bovina serica metilada.....	29
2.2.2 Modelo de Artrite induzida por colágeno do tipo II.....	30
2.3 Neuropeptídeos.....	32
2.4 Bombesina/Peptídeo Liberados da Gastrina.....	33
2.4.1 Bombesina.....	33
2.4.2 Funções do GRP.....	36
2.4.3 Bombesina/GRP e Artropatia Inflamatória.....	38
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 Anti-inflamatório 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.....	55
7. Conclusões.....	66

8. Anexos.....	67
8.1 Anexo I – Fluxograma do procedimento experimental.....	68
8.2 Anexo II – Protocolo para análise histopatológica das	
articulações.....	70

Lista de Abreviaturas

AR – artrite reumatoide

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

CII – colágeno do tipo II

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

COMP – matriz proteica da cartilagem oligomérica

CP – captopril

DCV – doença cardiovascular

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

GAG – glicosaminoglacano

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

LPS – lipopolissacarídeo

LTB – leucotrieno B

MCP-1 – proteína quimioatrativa dos monócitos -1

mBSA – methylated bovine serum albumin

MHC – major histocompatibility complex – complexo maior de histocompatibilidade

Mtb – *Micobacterium tuberculosis*

NK – *natural killer cells* – células assassinas naturais

NPY – neuropeptídeo Y

OM – omeoprazol

PIA – Pristane-induced arthritis – artrite induzida por adjuvante

RNA - *ribonucleic acid* - ácido ribonucléico

SCW – streptococos cell wall – parede celular do streptococos

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

VSG – velocidade de sedimentação globular

Figuras e Tabelas

Figura 1. Caracterização da Artrite Reumatoide.....	22
Figura 2. Imunopatogênese da AR.....	25
Figura 3. Representação esquemática do protocolo experimental de artrite induzida por antígeno.....	30
Figura 4. Representação esquemática do protocolo experimental de artrite induzida por colágeno.....	32
Figura 5. Estrutura da Bombesina e do GRP.....	35
Figura 6. Representação esquemática do receptor murino do GRP.....	35
Tabela 1. Critérios diagnósticos da artrite reumatoide do Colégio Americano de Reumatologia.....	23
Tabela 2. Funções descritas para o Peptídeo liberador da gastrina (GRP).....	37

Resumo

O peptídeo liberador da gastrina (GRP) é o homólogo mamífero da bombesina (BN). Ambos GRP e seus receptores têm sido encontrados na sinóvia de pacientes com artrite reumatoide. O receptor do peptídeo liberador da gastrina (GRPR) pode ser considerado como um alvo terapêutico para doenças inflamatórias. RC-3095 é um antagonista do receptor de GRP. Este estudo avaliou os efeitos anti-inflamatórios do RC-3095, um antagonista específico do receptor do peptídeo liberador da gastrina, em dois modelos experimentais de artrite: induzida por colágeno do tipo II e induzida por adjuvante (CIA e AIA, respectivamente) e os mecanismos envolvidos.

O RC-3095 foi administrado aos camundongos com CIA ou com AIA provocado por albumina bovina metilada (mBSA), diariamente. A incidência e severidade da doença foram avaliados por escore clínico e achados histológicos. A imunohistoquímica para o receptor do peptídeo liberador da gastrina (GRPR) na CIA. Migração de neutrófilos, determinação de glicosaminoglicanos (GAGs) e ensaio de linfoproliferação usando MTT em AIA. As citocinas: IL-17, IL-1 β e TNF sobre os joelhos em AIA e CIA foram avaliados usando o ensaio imunoenzimático (ELISA). Análise da população de células T regulatórias por citometria de fluxo em AIA.

Os resultados demonstraram que o RC-3095 reduziu a migração de neutrófilos, a hipernocicepção mecânica e a perda de proteoglicanos nos camundongos com AIA. Estes resultados estão associados com a inibição das citocinas pró-inflamatórias (IL-17, IL-1 β e TNF- α) e os níveis de proliferação de linfócitos e aumento do número de células T reguladoras (Treg). No modelo da CIA, o RC-3095 apresentou uma redução significativa nos escores da artrite e gravidade da doença, determinada histologicamente. A Inflamação sinovial, hiperplasia sinovial, formação de pannus e alterações erosivas foram drasticamente reduzidas nos camundongos artríticos tratados com RC-3095. Além disso, o RC-3095 demonstrou redução significativa no conteúdo das citocinas pró-inflamatórias, como IL-17, IL-1 β e TNF- α , e reduziu a expressão de receptores GRP nos animais

doentes. Estes achados sugerem que via GRP tem um papel significativo na artrite crônica, e sua inibição pode ser explorado como uma estratégia terapêutica.

Palavras-chave: Modelo animal, RC-3095, Artrite Reumatoide, neuropeptídeo.

Abstract

Background: The gastrin-releasing peptide (GRP) is the mammalian homolog of bombesin (BN). Both GRP and their receptors have been found in synovium of patients with rheumatoid arthritis. GRPR may be considered as a therapeutic target for inflammatory diseases. RC-3095 is a GRP receptor antagonist. **Objective:** To evaluate the anti-inflammatory effects of RC-3095 in two experimental models of arthritis, collagen and antigen-induced arthritis (CIA and AIA, respectively) and the mechanism involved. **Methods:** RC-3095 was administered daily to mice with CIA or with AIA provoked by methylated bovine serum albumin (mBSA). Disease incidence and severity were assessed by a clinical index and histologic features. Immunohistochemistry for GRPR in CIA. Migration of neutrophils, determination of glycosaminoglycans (GAG's) and Lymphoproliferation assay using MTT in AIA. The cytokines: IL-17, IL-1 β , TNF on his knees in AIA and CIA were evaluated using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Analysis of regulatory T cells by flow cytometry in AIA. **Results:** The RC-3095 reduced neutrophil migration, mechanical hypernociception and the proteoglycan loss in mice with AIA. These findings are associated with the inhibition of proinflammatory cytokines (IL-17, IL-1 β and TNF- α) levels and lymphocyte proliferation and increase of T regulatory cell number. In the CIA model, RC-3095 exhibited significant reduction in arthritic scores and the severity of disease determined histologically. Synovial inflammation, synovial hyperplasia, pannus formation and extensive erosive changes were all dramatically reduced in the arthritic mice treated with RC-3095. Furthermore, the mice treated with RC-3095 showed significant reduction in contents of proinflammatory cytokines, such as IL-17, IL-1 β and TNF- α . **Conclusion:** Moreover RC-3095 diminished the GRP receptor expression in arthritic mice. These findings suggest that GRP pathway has a significant role in chronic arthritis, and its inhibition can be explored as a therapeutic strategy.

Key words: Animal Model, RC-3095, Rheumatoid Arthritis, Neuropeptide

1. Introdução

A Artrite Reumatoide (AR) (1) é uma doença crônica inflamatória das articulações que afeta em torno de 1% da população mundial, acometendo as mulheres duas vezes mais do que os homens. Sua incidência aumenta com a idade e o pico ocorre entre os 30 e 70 anos (2). É uma enfermidade reumática de alta prevalência e morbidade, justificando os esforços na elucidação de sua patogênese, diagnóstico e tratamento (3). No Brasil, um estudo de 2004 mostrou uma prevalência de 0,46% (1). Porém, há a dificuldade de se estudar as fases iniciais da doença devido aos indivíduos afetados serem normalmente diagnosticados em fases mais tardias e crônicas da doença.

Esta patologia apresenta complicações importantes que podem levar a um comprometimento da capacidade funcional, do trabalho e da qualidade de vida dos pacientes (4). O curso da doença é variado, protocolos de tratamento mais recentes indicam que uma terapia agressiva nos primeiros eventos da doença, como a utilização de drogas anti-reumáticas em monoterapia ou em combinações com outras medicações, podem desacelerar a evolução da doença (4).

A patologia da sinovite reumatóide caracteriza-se fundamentalmente por proliferação da membrana sinovial e erosão subsequente da cartilagem articular e do osso subcondral. Embora se desconheça o evento desencadeador, parece envolver alguma estimulação antigênica específica de linfócitos T suscetíveis que expressam as moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) apropriadas. Isto resulta em proliferação das células T e B, estimulação da proliferação de vasos sanguíneos na membrana sinovial, acúmulo de células inflamatórias, incluindo leucócitos polimorfonucleares, proliferação de células sinoviais e desenvolvimento de um *pannus* invasivo de rápido crescimento. Este último cresce de modo rápido, invade a cartilagem, ativa os condrócitos e libera enzimas proteolíticas que degradam a cartilagem e o osso, resultando por fim em erosões e destruição articular (5).

Portanto, o estudo de modelos animais, em que a indução e progressão da doença são sincronizadas e mais previsíveis, é de fundamental importância para se determinar a contribuição dos tipos celulares específicos e moléculas efetoras nas múltiplas fases de indução e desenvolvimento da artrite a fim de se alcançar alvos terapêuticos mais efetivos (6).

A bombesina (BN) é um peptídeo neurotransmissor endógeno encontrado no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) de anfíbios (7). Seu equivalente em mamíferos é o peptídeo liberador da gastrina ou GRP.

O receptor do peptídeo liberador da gastrina (GRPR) é uma proteína de superfície celular a qual se liga, dependendo da espécie, a bombesina, GRP ou peptídeos intimamente relacionados, com alta-afinidade, desencadeando alterações intracelulares que influenciam o comportamento celular (8).

O GRP está envolvido em um amplo espectro de atividades biológicas, tais como o estímulo do crescimento tecidual (9), modulação da secreção gástrica, pancreática, e funções motoras na musculatura estomacal (10). No pâncreas, estimula a liberação de neurotensina, motilina, peptídeo pancreático, insulina e glucagon (11). No trato respiratório, induz broncoconstrição e vasodilatação (12).

O GRP atua sobre as mudanças no desenvolvimento e regulação imunológica através das células imunes. Linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, mastócitos, e células endoteliais expressam receptor para GRP, indicando um papel deste peptídeo na patogênese de condições inflamatórias (8, 13).

Muitos antagonistas do receptor da BN e GRP (BN/GRP) têm sido sintetizados e experimentados em diversos modelos, testando a habilidade de inibir os efeitos deste peptídeo (14). Os efeitos farmacológicos dos diferentes antagonistas da BN/GRP são complexos, devido aos mecanismos de ação direto e indireto, variando nas diferentes espécies e rotas de administração estudadas (15).

O RC-3095 [D-Tpi⁶, Leu¹³Ψ-(CH₂NH)Leu¹⁴] é um antagonista do receptor da BN/GRP, originalmente sintetizado por Schally et al. pelo método de fase sólida em 1991 (9) com o objetivo de

inibir a ação da BN/GRP. O RC-3095 bloqueia o efeito estimulador autócrino do BN/GRP em tumores e, por este motivo, está sendo desenvolvido para o tratamento de múltiplos tipos de cânceres. Foi testado em estudos clínicos de fase I em tumores sólidos, tendo sido bem tolerado até nos níveis mais elevados de dose, sem efeitos colaterais clínicos pertinentes (16, 17).

Além disso, foi testado em modelos animais de doença inflamatória e demonstrou diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-1 β , sem alterar a citocina anti-inflamatória IL-10, apresentando melhora na sobrevivência dos animais testados (18, 19).

Recentemente nosso grupo demonstrou o efeito do RC-3095 em modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA), sendo o RC-3095 capaz de melhorar a artrite experimental, reduzindo a espessura do tornozelo da pata induzida, atenuando as lesões articulares, diminuindo os níveis séricos das citocinas TNF- α e IL-1 β . Este foi o primeiro estudo do efeito protetor de um antagonista da BN/GRP nestas condições e do possível papel do GRP no desenvolvimento da artrite. Nossos resultados sugerem que o RC-3095 regula a severidade da artrite. Estes dados indicam que uma interferência específica na via do GRP pode representar uma nova estratégia para o tratamento da AR e que necessita estudos adicionais (20).

Novas terapias têm sido recentemente desenvolvidas ou submetidas a ensaios clínicos para AR, como TNF (etanercept, adalimumab e infliximab), IL-1 (anakinra) e IL-6 (MRA). Contudo, existem evidências que as terapias com anti-citocinas são eficientes, mas uma única citocina alvo provavelmente venha beneficiar apenas um subgrupo específico de pacientes com AR. Outros mediadores pró-inflamatórios, como os neuropeptídeos estão envolvidos na AR e sua relação com as citocinas e AR têm recebido pouca atenção. Um grande número de agonistas e antagonistas dos receptores de neuropeptídeos vêm sendo produzidos, podendo ser testados em combinação com terapias pré-existentes (21, 22).

O estudo do antagonista do receptor do BN/GRP RC-3095 em modelos experimentais de artrite poderá fornecer informações relevantes sobre o desenvolvimento da doença e ampliar o conhecimento de novos tratamentos para artrite reumatóide. Os resultados promissores que observamos no modelo de artrite induzida por CFA apontam para a necessidade de se avaliar melhor

a eficácia e potenciais mecanismos de ação em outros modelos. Esses conhecimentos seriam essenciais para a posterior progressão para a fase de estudos clínicos com a droga.

2. Revisão da Literatura

2.1 Artrite Reumatoide

2.1.1 Conceito e prevalência de artrite reumatoide (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 reumatoide positivo (Fig.1) (23). Tem uma prevalência de aproximadamente 1% na população brasileira (24), que é similar a da literatura mundial (25). Tem preferência pelo sexo feminino (26), e tende a surgir a partir da quarta década de vida, com pico de incidência na quinta década (27).

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 (28). Atualmente cerca de 50% dos pacientes são considerados incapacitados para o trabalho após dez anos de evolução da doença (29). 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 reumatoide positivo, nódulos reumatoides e velocidade de sedimentação globular (VSG) elevada (30-32).

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 (33). 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) (34).

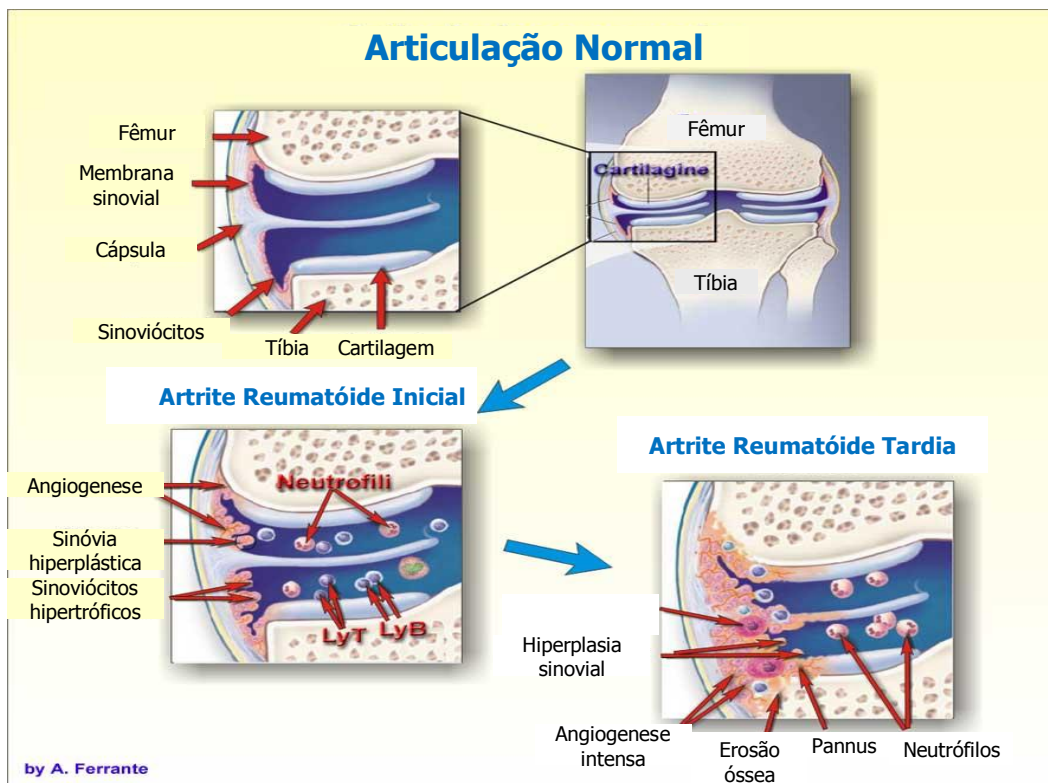


Fig. 1. Caracterização da Artrite Reumatoide. Adaptado de Ferrante.

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

Critérios Diagnósticos da Artrite Reumatoide:

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 reumatoide 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 (34).

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 (35). 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

neovangiogênese 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 (35). 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 (36). 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 (37).

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 (38). 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 reumatoide (39).

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) (40).

Além de células e mediadores do sistema imune inato e adaptativo, 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 invervadas (41). A membrana sinovial é ricamente invervada. Estresse e o sistema nervoso central parecem modular o curso e desfecho clínico da AR (42). 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.

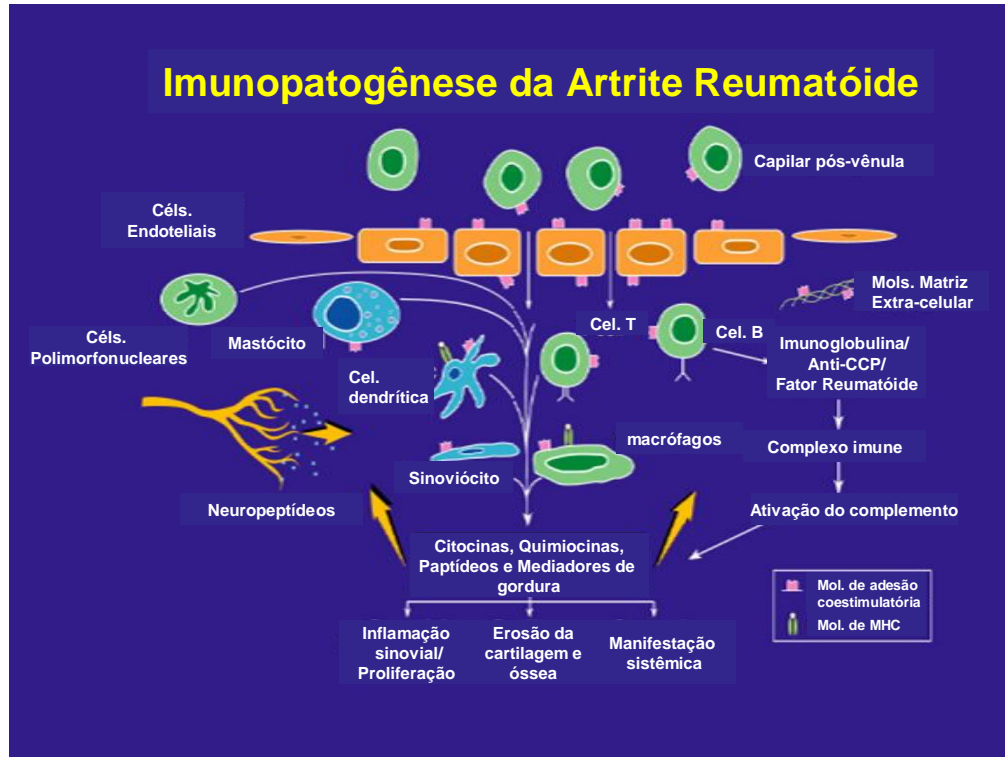


Fig. 2. Imunopatogênese da AR. Adaptado de Kavanaugh.

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 (43). Inúmeros estudos têm demonstrado melhor resposta terapêutica, menor destruição articular e menor perda funcional nos pacientes tratados mais precocemente, no primeiro ano dos sintomas (44, 45).

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 positivo quanto a remissão da doença (46-48).

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 (49). Recentemente foi demonstrada a sua capacidade de intervir com o prognóstico da doença, sendo implicado na redução da mortalidade cardiovascular associada à AR (50).

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 (51).

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) (51).

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 (52).

Terapêuticas biológicas que não têm o TNF como alvo terapêutico, como o Rituximabe e Abatacepte, foram recentemente aprovados para o tratamento da AR (53, 54).

O rituximabe, anticorpo monoclonal quimérico anti-CD20, antígeno presente na superfície dos linfócitos B, foi liberado para uso em pacientes com artrite reumatoide refratária as drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) tradicionais e aos agentes anti-TNF. Sua eficácia, particularmente nos pacientes com fator reumatoide 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 (54, 55).

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 (53, 56).

Contudo, essas terapias ainda apresentam efeitos adversos significativos e devem ser mantidas por longo prazo, pois não são curativas da doença (57). Pacientes com AR têm risco aumentado para infecção, incluindo infecções granulomatosas como a tuberculose, particularmente de pulmão, óssos/articulações e pele com o uso de terapias biológicas (58). Parece haver risco adicional quando administradas em combinação com outras terapias tradicionais para AR (59-62). 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 (63). 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. (64, 65). Além disso, modelos animais para AR constituem paradigmas de sucesso para o desenvolvimento pré-clínico de novos agentes terapêuticos, com base na identificação do alvo e validação *in vivo*, como os agentes biológicos já utilizados na clínica, desenvolvidos em modelos animais e mostrando-se altamente eficazes (66).

Modelos de artrite erosiva em murinos podem ser classificados em três grandes grupos. O primeiro grupo é induzido por hiperimunização de linhagens de murinos geneticamente suscetíveis a antígenos, como o colágeno tipo II (artrite induzida por colágeno - CIA) ou matriz proteica da cartilagem oligomérica (artrite induzida por COMP), em adjuvante completo de Freund's (CFA) ou albumina sérica bovina metilada (mBSA). 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 adjuvante incompleto de Freund's (artrite induzida por óleo). O terceiro grupo de modelos de AR em murinos 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, existe ainda artrite por proteoglicanos. Além disso camundongos são relativamente resistentes a clássica artrite induzida por adjuvante com *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) e artrite induzida por SCW, sendo considerada esta, dependendo da imunização, monartrite (65).

Cada um dos modelos 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” (64, 65, 67, 68).

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 (67, 68). Uma breve revisão sobre artrite induzida por albumina sérica bovina metilada (mBSA) e por colágeno do tipo II (CIA) em modelos murinos serão apresentadas a seguir.

2.2.1 Modelo murino de Artrite induzida por antígeno albumina sérica bovina metilada (mBSA)

Artrite induzida por antígeno (AIA) é um modelo animal de artrite que foi inicialmente desenvolvido em coelhos e, em seguida, aplicado em camundongos e ratos. O antígeno indutor é a albumina bovina sérica metilada (mBSA), que, após a imunização sistêmica (com injeções subcutâneas ou intradérmicas), é injetada na articulação. AIA é uma inflamação articular imunomediada (dependente de células T), cuja histopatologia mostra muitas semelhanças com a AR em humanos (69).

Resumidamente, os murinos são imunizados em duas etapas com mBSA, em adjuvante completo de Freund's, e 3 semanas após a primeira imunização (21º dia) o mBSA é injetado na articulação fêmur-tibial (joelho) (Fig. 3). A articulação injetada desenvolve uma inflamação aguda

dentro de poucas horas (caracterizada por infiltração maciça dos granulócitos e exsudato de fibrina), e dentro de 7 dias a inflamação progride para a fase crônica (caracterizada pela infiltração de leucócitos mononucleares na articulação, hiperplasia sinovial, fibrose periarticular, destruição da cartilagem e do osso). Para a experimentação, o modelo AIA tem a vantagem de que a duração da inflamação é muito reprodutível e que a incidência está próxima á 100%. Do ponto de vista comportamental, os murinos mostram acentuada hiperalgesia mecânica no joelho inflamado durante todas as 4 semanas, claudicação, e por fim hiperalgesia térmica na pata. No estágio mais agudo deste modelo pode-se observar sinais de hiperalgesia mecânica leve do joelho contralateral, não inflamado (70).



Fig. 3. Representação esquemática do protocolo experimental de artrite induzida por antígeno. IM- imunização, i.a – intraarticular.

2.2.2 Modelo de Artrite induzida por colágeno do tipo II (CIA)

O modelo experimental de artrite mais utilizado atualmente é o modelo de artrite induzida por colágeno do tipo II (CIA) (71). A CIA pode ser induzida em ratos (Wistar, Sprague-Dawley e Wistar-Lewis) e camundongos (DBA/1J e C57BL/6). Ele compartilha várias características patológicas com a doença, como o colágeno tipo II (CII), principal proteína da cartilagem e um dos potenciais autoantígenos da AR. No modelo de CIA o CII leva a artrite experimental autoimune, com inflamação

da sinovia articular, destruição óssea e da cartilagem semelhante ao acometimento articular humano (72).

A CIA tem sido amplamente utilizada para identificar potenciais mecanismos patogênicos da autoimunidade, incluindo o papel dos diferentes tipos celulares, de forma individual, no início e na progressão da doença, bem como para testar e desenvolver novas terapias. Este modelo é estabelecido em linhagens geneticamente suscetíveis através da imunização com o CII emulsionado em adjuvante completo de Freund (CFA) usando uma variedade de metodologias, incluindo imunização na base da cauda no dia 0 e uma re-imunização no 18º dia, sendo o aparecimento da doença em aproximadamente 35 dias após a primeira imunização (Fig. 4). A doença que se desenvolve não é simétrica e não existe uma combinação de patas/articulações afetadas. As características histopatológicas do modelo se assemelham as da patologia da AR, incluindo hiperplasia sinovial, infiltrado de células mononucleares, formação do *pannus*, degradação da cartilagem e óssea. Assim como na AR, a suscetibilidade do modelo está ligada à expressão de genes específicos de MHC de classe II. As diferenças mais notáveis entre este modelo experimental e a AR são: ausência de fator reumatoide e predileção por sexo, e a doença experimental geralmente é monofásica. A imunopatogênese da CIA envolve tanto células T e células B específicas, em resposta ao CII (73).

Resumidamente a CIA é induzida com uma imunização intradérmica na base da cauda no dia 0, com uma emulsão de CFA e CII, resultando em uma reação inflamatória moderada no local da injeção que dura de 1-2 semanas. No 18º dia após a imunização, realiza-se um *booster* com uma emulsão de IFA e CII, um pouco abaixo do local primeiramente injetado (Fig. 4). Para a maioria das linhagens CIA-sensíveis, o primeiro sinal clínico do desenvolvimento da artrite, tornam-se visíveis entre os dias 25 e 35 após a imunização. A incidência de artrite em linhagens de camundongos suscetíveis é geralmente muito elevado, chegando a 80-100%, em sua maioria (73).

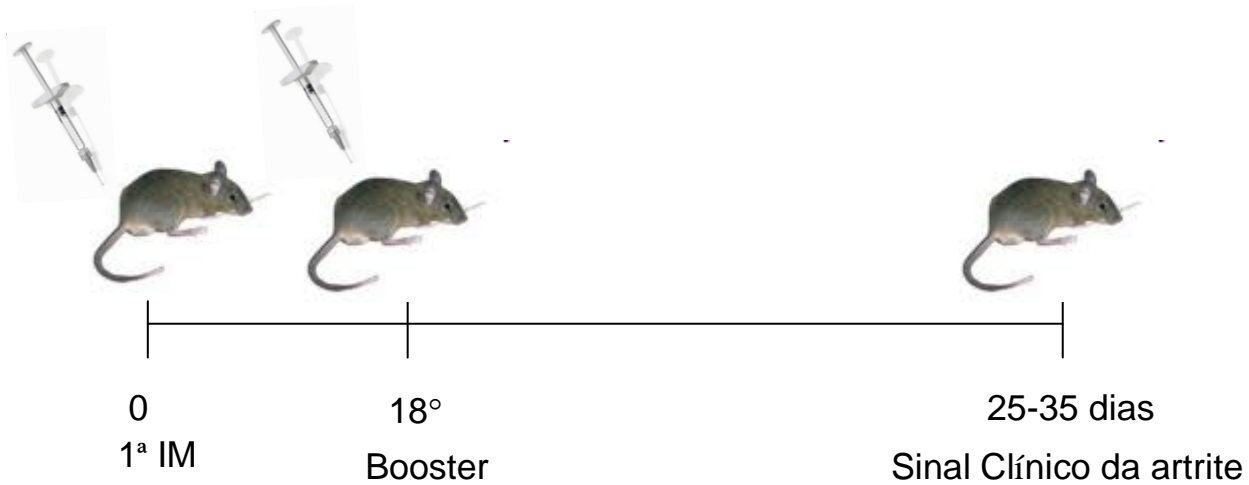


Fig. 4. Representação esquemática do protocolo experimental de artrite induzida por colágeno.

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 (41). 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 (41).

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 (74).

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 (75).

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 (76-78), o papel imunomodulatório do neuropeptídeo Y (NPY) (79) 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 (80, 81). 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 (82, 83) 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 innervada 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 (75).

2.4 Bombesina/Peptídeo Liberador 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

(7). 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) (84). Esse peptídeo apresenta 27 aminoácidos e é estruturalmente homólogo à BN de anfíbios, tendo em comum 9 dos 10 aminoácidos da porção carboxiterminal (Fig. 5) (85). 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) (86).

Estudos têm demonstrado que o GRP está distribuído em vários tecidos de diversas espécies de mamíferos, incluindo: trato gastrintestinal (87), cérebro (88), glândula pituitária (89), medula espinal (90), gânglios simpático e sensorial (14, 91), glândula adrenal (15), pulmão (9), tireóide (92), trato genitourinário (8, 93) e articulações (94).

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. 6) (8). 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 (76). 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) (95). Em estudo recente em tecidos articulares de ratos, foi observada a presença de receptores do GRP em condrócitos que revestem a superfície articular (96).

Posição dos Amino ácidos

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Glp	Gln	Arg	Leu	Gli	Asn	Gln	Trp	Ala	Val	Gli	His	Leu	Met – NH ₂
Met	Tir	Pro	Arg	-	-	His	-	-	-	-	-	-	-

Fig. 5. 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 (8).

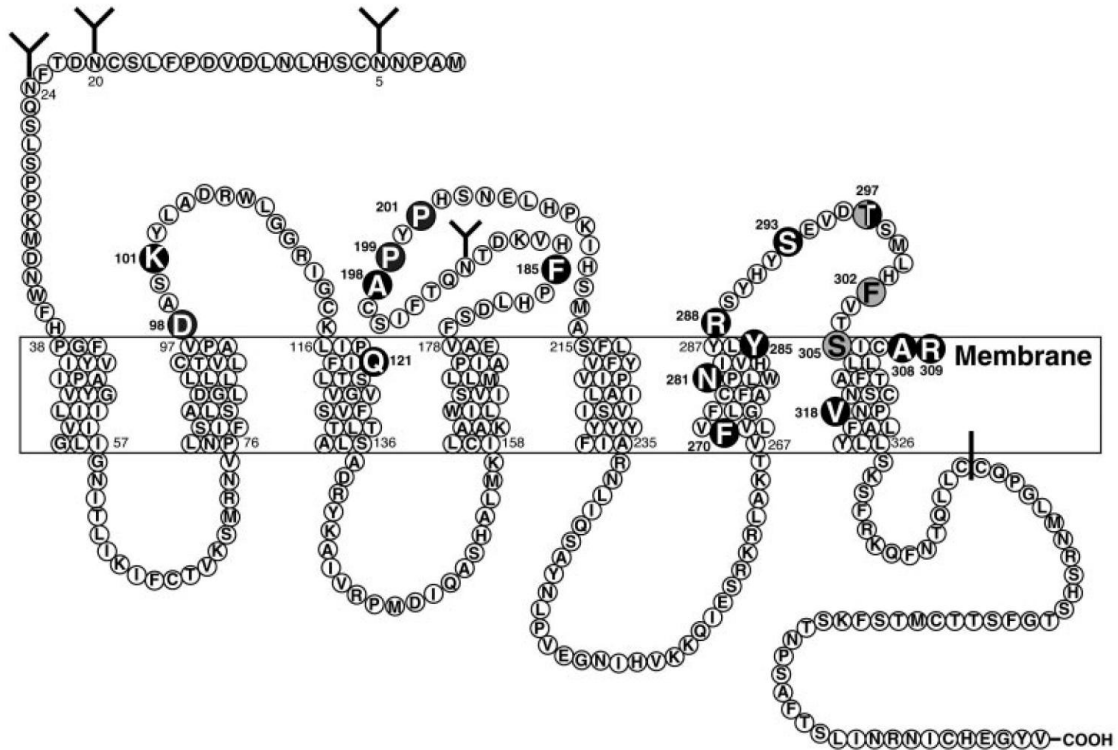


Fig. 6. Representação esquemática do receptor murino do GRP-R (ou BB₂). Os círculos pretos indicam os amino ácidos chaves para a alta afinidade com o GRP (interação ou sinalização) (86).

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 (9), 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 (97), pâncreas (98), neoplasias do pulmão (99), estômago (100, 101), cólon (102), mama (103) e próstata (104, 105) através da mediação dos receptores de membrana específicos nas células-alvo (13). Demonstrou ser um mitógeno potente, sendo investigado extensivamente *in vitro* em camundogos Swiss 3T3 (106) e em cultura de células normais do epitélio brônquico (107). 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 (108).

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 (10). No pâncreas, estimula a liberação de neurotensina, motilina, peptídeo pancreático, insulina e glucagon (11).

No SNC, o GRP tem sido envolvido na modulação da saciedade (109), termorregulação (110), homeostase, ritmo circadiano (111) e metabolismo (112). 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 (17, 113).

No trato respiratório, o GRP tem ação no desenvolvimento de doenças pulmonares, causando broncoconstrição e vasodilatação (12).

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 (8, 13). 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 (114, 115); estímulo a proliferação de linfócitos (116); ativação de células natural killer (NK) e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (117). Além disso, induz a proliferação de mastócitos e quimiotaxia *in vitro*, sendo implicado na patogenia de doenças pulmonares (118) e artrite reumatoide (AR) (75).

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 sobrevivência em modelo experimental de sepse e injúria pulmonar aguda (Tab 2.) (19).

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 reumatoide 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 (94).

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 (75, 119). 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 (75, 96). Existem evidências que os neuropeptídeos como a substância P (SP), o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) podem modificar diretamente a secreção de citocinas próinflamatórias pelas células imunocompetentes, incluindo células do sangue periférico de pacientes com AR (75), mas não existem estudos sobre o efeito direto da BN/GRP. Os mesmos autores 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 nas 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 (96). 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 (120).

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 (121).

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 (121), 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* (122). 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 (123). 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 (124, 125).

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 (16). 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 (121).

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 (126, 127), câncer mamário em ratos MTX (128), câncer de próstata em ratos Dunning (129), como também em linhagens celulares de tumores humanos, como câncer pancreático SW-1990 (130), câncer de mama MCF-7MIII (131), tumor gástrico MKN-45 (132), câncer de cólon HT-29 (133), vários carcinomas pulmonares de pequenas células (134), câncer de próstata em células PC-82 e PC-3 em camundongos *nude* (120, 135) e em PC-3 e LNCaP de humanos (136).

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* (137). 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 RNAmenssageiro 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 RNAmenssageiro e de EGFR em cânceres mamários de ratos MTX (141).

2.4.7 Papel Anti-inflamatório do RC-3095

Os efeitos do antagonista seletivo do receptor da BN/GRP RC-3095 vem sendo demonstrados em modelos experimentais bem estabelecidos, o primeiro estudo do papel anti-inflamatório do RC-3095 foi em sepse por ligação e perfuração do apêndice cecal (“cecum ligation and puncture”, CLP) e por dano pulmonar agudo (“acute lung inflammation”, ALI) (19).

No modelo de CLP, a administração de RC-3095 (0.3 mg/kg) 6 horas após a indução da sepse melhorou a sobrevida deste modelo. Doses mais altas de RC-3095 não aumentaram seus efeitos, e doses mais baixas apresentaram um impacto na mortalidade menos significativo. A administração de RC-3095 melhorou a sobrevida 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. O RC-3095 atenuou o infiltrado inflamatório alveolar e o exudato alveolar induzido pela inalação de LPS. Assim, a administração do antagonista do GRPR reduziu 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. Além disso, de forma interessante, o RC-3095 não modulou a liberação de IL-10, anti-inflamatória, sugerindo que os caminhos intracelulares modulados pela BN/GRP pode ser seletivo para citocinas pró-inflamatórias.

Em um modelo animal de uveíte, o RC-3095 demonstrou importantes ações contra danos oxidativos e papel anti-inflamatório, com diminuição da atividade da mieloperoxidase e dos níveis de TNF e das proteínas quimioatrativas dos monócitos -1 (MCP-1), mesmo quando comparado com a dexametasona (142). Em um modelo animal de úlcera gástrica o RC-3095, sozinho e em associação com omeprazol (OM), foi efetivo na inibição da secreção gástrica, além de apresentar efeito protetor exercido pela redução do dano oxidativo gástrico (143). Finalmente, em um modelo animal de colite ulcerativa o RC-3095 reduziu a gravidade da doença inflamatória do intestino, e sua atividade anti-inflamatória foi associada com uma redução na expressão do TNF-alfa colônico (144).

Recentemente nosso grupo demonstrou o efeito do RC-3095 em modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA), sendo o RC-3095 capaz de melhorar a artrite experimental, reduzindo a espessura do tornozelo da pata induzida, atenuando as lesões articulares, diminuindo os níveis séricos das citocinas. Este foi o primeiro estudo do efeito protetor de um antagonista da BN/GRP nestas condições e do possível papel do GRP no desenvolvimento da artrite (20), contudo este modelo apresenta diversas limitações e é menos representativo nos processos da AR (145). Nossos resultados sugerem que o RC-3095 regula a severidade da artrite. Estes dados indicam que uma interferência específica na via do GRP pode representar uma nova estratégia para o tratamento da AR e que necessita estudos adicionais

Assim, o RC-3095 pode representar um possível alvo farmacológico para controle da resposta inflamatória local e sistêmica (19).

3. Justificativa

A justificativa do presente estudo é advinda da necessidade de novas estratégias terapêuticas para artrite reumatoide (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 a eficácia do RC-3095, um antagonista do receptor da BN/GRP, como terapia antiinflamatória e imunomoduladora em modelos de artrite induzida por albumina sérica bovina metilada (mBSA) em camundongos Balb/c e por colágeno bovino tipo II em camundongos DBA/1J.

4.2 Objetivos específicos

Estudar a ação do RC-3095 sobre:

- A) O processo inflamatório avaliado pelo escore clínico visual e o edema nas articulações;
- B) O processo inflamatório avaliado pela nocicepção articular e determinação dos glicosaminoglicanos (GAGs);
- C) O processo inflamatório avaliado através da migração de neutrófilos para cavidade articular;
- D) O processo inflamatório avaliado pelo padrão histológico e imunohistoquímico nas articulações;
- E) A concentração de citocinas pró e antiinflamatórias dos tecidos periarticulares;
- F) O efeito imuno-regulatório sobre as populações e subpopulações linfocitárias avaliados por citometria de fluxo e cultura celular.

5. Referências da Revisão da Literatura:

1. Senna ER, De Barros AL, Silva EO, Costa IF, Pereira LV, Ciconelli RM, et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol*. 2004 Mar;31(3):594-7.
2. Klippel J, editor. *Primer on the Rheumatic Diseases*. Atlanta: Arthritis Foundation; 2001.
3. Harris ED, Jr. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med*. 1990 May 3;322(18):1277-89.
4. Tugwell P. *Evidence-Based Rheumatology*. London: BMJ Publishing Group; 2005.
5. Andreoli TE BJ, Carpenter CCJ, Plum F. *Medicina Interna Básica*. *Medicina Interna Básica*; 1998. p. 568-70.
6. Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2001 Aug 1;167(3):1601-8.
7. Anastasi A, Erspamer V, Bucci M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*. *Experientia*. 1971 Feb 15;27(2):166-7.
8. Tokita K, Katsuno T, Hocart SJ, Coy DH, Llinares M, Martinez J, et al. Molecular basis for selectivity of high affinity peptide antagonists for the gastrin-releasing peptide receptor. *J Biol Chem*; 2001. p. 36652-63.
9. McKillop JM, McCann JP, Gibbons JR, Johnston CF, Buchanan KD. Gastrin-releasing peptide in normal and neoplastic human lung: measurement and biochemical characterization. *Int J Cancer*. 1990 Oct 15;46(4):591-61.
10. Ghatei MA, Jung RT, Stevenson JC, Hillyard CJ, Adrian TE, Lee YC, et al. Bombesin: action on gut hormones and calcium in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1982 May;54(5):980-5.
11. Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983 Jul 29;114(2):541-8.
12. Uddman R, Moghimzadeh E, Sundler F. Occurrence and distribution of GRP-immunoreactive nerve fibres in the respiratory tract. *Arch Otorhinolaryngol*. 1984;239(2):145-51.
13. Sunday ME, Kaplan LM, Motoyama E, Chin WW, Spindel ER. Gastrin-releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease. *Lab Invest*. 1988 Jul;59(1):5-24.
14. Helen P, Panula P, Yang HY, Hervonen A, Rapoport SI. Location of substance P-, bombesin-gastrin-releasing peptide, [Met5]enkephalin- and [Met5]enkephalin-Arg6-Phe7-like immunoreactivities in adult human sympathetic ganglia. *Neuroscience*. 1984 Jul;12(3):907-16.
15. Lemaire S, Chouinard L, Mercier P, Day R. Bombesin-like immunoreactivity in bovine adrenal medulla. *Regul Pept*. 1986 Jan;13(2):133-46.
16. Schwartzmann G, DiLeone LP, Horowitz M, Schunemann D, Cancellà 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 Sep;24(5):403-12.
17. Roesler R, Henriques JA, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2006 Apr;5(2):197-204.
18. Fraser M, McDonald TJ, Spindel ER, Fahy M, Hill D, Challis JR. Gastrin-releasing peptide is produced in the pregnant ovine uterus. *Endocrinology*. 1994 Dec;135(6):2440-5.

19. 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 Jan 1;173(1):84-90.
20. Oliveira PG, Brenol CV, Edelweiss MI, Brenol JC, Petronilho F, Roesler R, et al. Effects of an antagonist of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Peptides*. 2008 Jun 12.
21. Roberts LJ. New drugs for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2004 Dec 16;351(25):2659-61; author reply -61.
22. Mariette X. Emerging biological therapies in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2004 Nov;71(6):470-4.
23. Kelley WN, Ruddy S, Sledge C.B. *Textbook of Rheumatology*. Philadelphia: WB Saunders.; 1997.
24. Marques Neto JF. Estudo multicêntrico da prevalência da Artrite Reumatoide do adulto em amostras da população brasileira. *Revista Brasileira de Reumatologia* 1983;33:169-73.
25. Wolfe AM. The epidemiology of rheumatoid arthritis: a review. I. Surveys. *Bull Rheum Dis*. 1968 Oct;19(2):518-23.
26. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*. 1993 Aug 15;268(23):17478-88.
27. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2005 Mar;4(3):130-6.
28. Pincus T, Brooks RH, Callahan LF. Prediction of long-term mortality in patients with rheumatoid arthritis according to simple questionnaire and joint count measures. *Ann Intern Med*. 1994 Jan 1;120(1):26-34.
29. Young A, Koduri G, Batley M, Kulinskaya E, Gough A, Norton S, et al. Mortality in rheumatoid arthritis. Increased in the early course of disease, in ischaemic heart disease and in pulmonary fibrosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2007 Feb;46(2):350-7.
30. Symmons DP, Jones MA, Scott DL, Prior P. Longterm mortality outcome in patients with rheumatoid arthritis: early presenters continue to do well. *J Rheumatol*. 1998 Jun;25(6):1072-7.
31. Prior P, Symmons DP, Scott DL, Brown R, Hawkins CF. Cause of death in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*. 1984 May;23(2):92-9.
32. Navarro-Cano G, Del Rincon I, Pogosian S, Roldan JF, Escalante A. Association of mortality with disease severity in rheumatoid arthritis, independent of comorbidity. *Arthritis Rheum*. 2003 Sep;48(9):2425-33.
33. Worthington J. Investigating the genetic basis of susceptibility to rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*. 2005;25 Suppl:16-20.
34. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988 Mar;31(3):315-24.
35. Harris ED. *Rheumatoid Arthritis*. Philadelphia WB Saunders; 1997.
36. Goldring SR. Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2002 Jul;14(4):406-10.
37. Miossec P. An update on the cytokine network in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2004 May;16(3):218-22.
38. Klimiuk PA, Yang H, Goronzy JJ, Weyand CM. Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent. *Clin Immunol*. 1999 Jan;90(1):65-78.
39. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jun;7(6):429-42.
40. Dorner T, Burmester GR. The role of B cells in rheumatoid arthritis: mechanisms and therapeutic targets. *Curr Opin Rheumatol*. 2003 May;15(3):246-52.

41. Niissalo S, Hukkanen M, Imai S, Tornwall J, Konttinen YT. Neuropeptides in experimental and degenerative arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Jun;966:384-99.
42. Baker GH. Life events before the onset of rheumatoid arthritis. *Psychother Psychosom.* 1982;38(1):173-7.
43. Fries JF, Williams CA, Morfeld D, Singh G, Sibley J. Reduction in long-term disability in patients with rheumatoid arthritis by disease-modifying antirheumatic drug-based treatment strategies. *Arthritis Rheum.* 1996 Apr;39(4):616-22.
44. Emery P. The Roche Rheumatology Prize Lecture. The optimal management of early rheumatoid disease: the key to preventing disability. *Br J Rheumatol.* 1994 Aug;33(8):765-8.
45. van der Horst-Bruinsma IE, Speyer I, Visser H, Breedveld FC, Hazes JM. Diagnosis and course of early-onset arthritis: results of a special early arthritis clinic compared to routine patient care. *Br J Rheumatol.* 1998 Oct;37(10):1084-8.
46. Albers JM, Paimela L, Kurki P, Eberhardt KB, Emery P, van 't Hof MA, et al. Treatment strategy, disease activity, and outcome in four cohorts of patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2001 May;60(5):453-8.
47. Roberts LJ, Cleland LG, Thomas R, Proudman SM. Early combination disease modifying antirheumatic drug treatment for rheumatoid arthritis. *Med J Aust.* 2006 Feb 6;184(3):122-5.
48. O'Dell JR. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2004 Jun 17;350(25):2591-602.
49. Choi HK, Hernan MA, Seeger JD, Robins JM, Wolfe F. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Lancet.* 2002 Apr 6;359(9313):1173-7.
50. Carette S. All patients with rheumatoid arthritis should receive corticosteroids as part of their management. *J Rheumatol.* 2007 Apr;34(4):656-60.
51. Olsen NJ, Stein CM. New drugs for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2004 May 20;350(21):2167-79.
52. Hochberg MC, Tracy JK, Hawkins-Holt M, Flores RH. 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 Nov;62 Suppl 2:ii13-6.
53. Kremer JM, Genant HK, Moreland LW, Russell AS, Emery P, Abud-Mendoza C, et al. Effects of abatacept in patients with methotrexate-resistant active rheumatoid arthritis: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2006 Jun 20;144(12):865-76.
54. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2004 Jun 17;350(25):2572-81.
55. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, 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 Sep;54(9):2793-806.
56. Genovese MC, Becker JC, Schiff M, Luggen M, Sherrer Y, Kremer J, et al. Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. *N Engl J Med.* 2005 Sep 15;353(11):1114-23.
57. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update. *Arthritis Rheum.* 2002 Feb;46(2):328-46.
58. Doran MF, Crowson CS, Pond GR, O'Fallon WM, Gabriel SE. Predictors of infection in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002 Sep;46(9):2294-300.
59. Genovese MC, Cohen S, Moreland L, Lium D, Robbins S, Newmark R, 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 May;50(5):1412-9.

60. Listing J, Strangfeld A, Kary S, Rau R, von Hinueber U, Stoyanova-Scholz M, et al. Infections in patients with rheumatoid arthritis treated with biologic agents. *Arthritis Rheum.* 2005 Nov;52(11):3403-12.
61. Fleischmann RM, Tesser J, Schiff MH, Schechtman J, Burmester GR, Bennett R, et al. Safety of extended treatment with anakinra in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006 Aug;65(8):1006-12.
62. Bathon JM, Martin RW, Fleischmann RM, Tesser JR, Schiff MH, Keystone EC, et al. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2000 Nov 30;343(22):1586-93.
63. Desai SB, Furst DE. Problems encountered during anti-tumour necrosis factor therapy. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006 Aug;20(4):757-90.
64. Crofford LJ, W, R.L. Arthritis and autoimmunity in animals, in *Arthritis and Allied Conditions.* Williams and Wilkins. ed: Koopman, W.; 1997.
65. Wilder RL, Remmers EF, Kawahito Y, Gulko PS, Cannon GW, Griffiths MM. Genetic factors regulating experimental arthritis in mice and rats. *Curr Dir Autoimmun.* 1999;1:121-65.
66. Kollias G, Papadaki P, Apparailly F, Vervoordeldonk MJ, Holmdahl R, Baumans V, et al. Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. *Ann Rheum Dis.* Aug;70(8):1357-62.
67. William RO. Rodents models of arthritis: relevance for human disease. *Clin Exp Immunol.* 1998;114:330-2.
68. Bendele A, McComb J, Gould T, McAbee T, Sennello G, Chlipala E, et al. Animal models of arthritis: relevance to human disease. *Toxicol Pathol.* 1999 Jan-Feb;27(1):134-42.
69. Ferraccioli G, Bracci-Laudiero L, Alivernini S, Gremese E, Tulusso B, De Benedetti F. Interleukin-1beta and interleukin-6 in arthritis animal models: roles in the early phase of transition from acute to chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis. *Mol Med.* Nov-Dec;16(11-12):552-7.
70. Schaible HG, von Banchet GS, Boettger MK, Brauer R, Gajda M, Richter F, et al. The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain. *Ann N Y Acad Sci.* Apr;1193:60-9.
71. Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Collagen-induced arthritis in mice. *Methods Mol Biol.* 602:181-92.
72. Bendele A. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2001 Jun;1(4):377-85.
73. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc.* 2007;2(5):1269-75.
74. Dalsgaard CJ, Hultgardh-Nilsson A, Haegerstrand A, Nilsson J. Neuropeptides as growth factors. Possible roles in human diseases. *Regul Pept.* 1989 Apr;25(1):1-9.
75. 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(3):R416-26.
76. Battey JF, Way JM, Corjay MH, Shapira H, Kusano K, Harkins R, et al. Molecular cloning of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jan 15;88(2):395-9.
77. Weber HC, Hampton LL, Jensen RT, Battey JF. Structure and chromosomal localization of the mouse bombesin receptor subtype 3 gene. *Gene.* 1998 Apr 28;211(1):125-31.
78. von Schrenck T, Wang LH, Coy DH, Villanueva ML, Mantey S, Jensen RT. Potent bombesin receptor antagonists distinguish receptor subtypes. *Am J Physiol.* 1990 Sep;259(3 Pt 1):G468-73.
79. Von Schrenck T, Heinz-Erian P, Moran T, Mantey SA, Gardner JD, Jensen RT. Neuromedin B receptor in esophagus: evidence for subtypes of bombesin receptors. *Am J Physiol.* 1989 Apr;256(4 Pt 1):G747-58.

80. Wada E, Way J, Shapira H, Kusano K, Lebacqz-Verheyden AM, Coy D, et al. cDNA cloning, characterization, and brain region-specific expression of a neuromedin-B-preferring bombesin receptor. *Neuron*. 1991 Mar;6(3):421-30.
81. Wu JM, Nitecki DE, Biancalana S, Feldman RI. Discovery of high affinity bombesin receptor subtype 3 agonists. *Mol Pharmacol*. 1996 Nov;50(5):1355-63.
82. Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science*. 1988 Sep 2;241(4870):1218-21.
83. Cuesta MC, Quintero L, Pons H, Suarez-Roca H. 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 Apr;40(4):301-6.
84. McDonald TJ, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, Mutt V. A gastrin releasing peptide from the porcine nonantral gastric tissue. *Gut*. 1978 Sep;19(9):767-74.
85. McDonald TJ, Jornvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, et al. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 1979 Sep 12;90(1):227-33.
86. Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, Benya RV. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian Bombesin Receptors: Nomenclature, Distribution, Pharmacology, Signaling, and Functions in Normal and Disease States. *Pharmacol Rev*. 2007 Nov 30.
87. Bjornskov-Bartholdy L, Bersani M, Holst JJ. Identification, characterization and release of GRP gene-associated peptides from the normal porcine and human gastro-intestinal tract. *Regul Pept*. 1991 Jul 9;34(3):197-209.
88. Hernanz A. Characterization and distribution of bombesin-like peptides in the rat brain and gastrointestinal tract. *Biochem Cell Biol*. 1990 Sep;68(9):1142-5.
89. Larsen PJ, O'Hare MM, Vangsted A, Mikkelsen JD. Gastrin releasing peptide (GRP) is present in a GRP(1-27) form in anterior pituitary cells of the guinea pig. *Peptides*. 1989 Jul-Aug;10(4):815-8.
90. Fuxe K, Agnati LF, McDonald T, Locatelli V, Hokfelt T, Dalsgaard CJ, 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 May 27;37(1):17-22.
91. Panula P, Hadjiconstantinou M, Yang HY, Costa E. Immunohistochemical localization of bombesin/gastrin-releasing peptide and substance P in primary sensory neurons. *J Neurosci*. 1983 Oct;3(10):2021-9.
92. Conlon JM, McGregor GP, Wallin G, Grimelius L, Thim L. Molecular forms of katecalcin, calcitonin gene-related peptide and gastrin-releasing peptide, in a human medullary thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 1988 May 1;48(9):2412-6.
93. Xiao Q, Han X, Challis JR, Hill DJ, Spindel ER, Prasad CJ, et al. Gastrin-releasing peptide-like immunoreactivity is present in human maternal and fetal placental membranes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Oct;81(10):3766-73.
94. Westermark T, Rantapaa-Dahlqvist S, Wallberg-Jonsson S, Kjorell U, Forsgren S. Increased content of bombesin/GRP in human synovial fluid in early arthritis: different pattern compared with substance P. *Clin Exp Rheumatol*. 2001 Nov-Dec;19(6):715-20.
95. Watson S. Bombesin. The G-protein Linked Receptor. Factsbook ed; 1994.
96. 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 Sep;1110:525-38.
97. Chu KU, Evers BM, Ishizuka J, Townsend CM, Jr., Thompson JC. Role of bombesin on gut mucosal growth. *Ann Surg*. 1995 Jul;222(1):94-100.

98. Parekh D, Ishizuka J, Townsend CM, Jr., Haber B, Beauchamp RD, Karp G, et al. Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion. *Pancreas*. 1994 Jan;9(1):83-90.
99. Alexander RW, Upp JR, Jr., Poston GJ, Gupta V, Townsend CM, Jr., Thompson JC. Effects of bombesin on growth of human small cell lung carcinoma in vivo. *Cancer Res*. 1988 Mar 15;48(6):1439-41.
100. Bold RJ, Kim HJ, Ishizuka J, Townsend CM, Jr., Thompson JC. A human gastric cancer cell line possesses a functional receptor for gastrin-releasing peptide. *Cancer Invest*. 1998;16(1):12-7.
101. Kim HJ, Evers BM, Guo Y, Banker NA, Hellmich MR, Townsend CM, Jr. Bombesin-mediated AP-1 activation in a human gastric cancer (SIIA). *Surgery*. 1996 Aug;120(2):130-6; discussion 6-7.
102. Narayan S, Guo YS, Townsend CM, Jr., Singh P. Specific binding and growth effects of bombesin-related peptides on mouse colon cancer cells in vitro. *Cancer Res*. 1990 Nov 1;50(21):6772-8.
103. Burns DM, Walker B, Gray J, Nelson J. Breast cancer cell-associated endopeptidase EC 24.11 modulates proliferative response to bombesin. *Br J Cancer*. 1999 Jan;79(2):214-20.
104. Bologna M, Festuccia C, Muzi P, Biordi L, Ciomei M. Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer*. 1989 May 1;63(9):1714-20.
105. Logothetis C, Hoosein N. The inhibition of the paracrine progression of prostate cancer as an approach to early therapy of prostatic carcinoma. *J Cell Biochem Suppl*. 1992;16H:128-34.
106. Rozengurt E, Sinnett-Smith J. Bombesin stimulation of DNA synthesis and cell division in cultures of Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 May;80(10):2936-40.
107. Willey JC, Lechner JF, Harris CC. Bombesin and the C-terminal tetradecapeptide of gastrin-releasing peptide are growth factors for normal human bronchial epithelial cells. *Exp Cell Res*. 1984 Jul;153(1):245-8.
108. Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischler A, et al. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature*. 1985 Aug 29-Sep 4;316(6031):823-6.
109. McCoy JG, Avery DD. Bombesin: potential integrative peptide for feeding and satiety. *Peptides*. 1990 May-Jun;11(3):595-607.
110. Brown MR, Carver K, Fisher LA. Bombesin: central nervous system actions to affect the autonomic nervous system. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;547:174-82.
111. Albers HE, Liou SY, Stopa EG, Zoeller RT. Interaction of colocalized neuropeptides: functional significance in the circadian timing system. *J Neurosci*. 1991 Mar;11(3):846-51.
112. Hill DJ, McDonald TJ. Mitogenic action of gastrin-releasing polypeptide on isolated epiphyseal growth plate chondrocytes from the ovine fetus. *Endocrinology*. 1992 May;130(5):2811-9.
113. Roesler R, Luft T, Oliveira SH, Farias CB, Almeida VR, Quevedo J, et al. Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology*. 2006 Aug;51(2):350-7.
114. Medina S, Del Rio M, Ferrandez MD, Hernanz A, De la Fuente M. 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 Dec;32(6):549-55.
115. Del Rio M, Hernanz A, de la Fuente M. Bombesin, gastrin-releasing peptide, and neuromedin C modulate murine lymphocyte proliferation through adherent accessory cells and activate protein kinase C. *Peptides*. 1994 Jan;15(1):15-22.
116. Del Rio M, De la Fuente M. Chemoattractant capacity of bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C is mediated through PKC activation in murine peritoneal leukocytes. *Regul Pept*. 1994 Jan 13;49(3):185-93.
117. De la Fuente M, Del Rio M, Hernanz A. 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 Nov-Dec;48(2):143-50.
118. Subramaniam M, Sugiyama K, Coy DH, Kong Y, Miller YE, Weller PF, et al. Bombesin-like peptides and mast cell responses: relevance to bronchopulmonary dysplasia? *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Sep 1;168(5):601-11.
119. Green PG. Gastrin-releasing peptide, substance P and cytokines in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(3):111-3.
120. Schally AV. *Cancer Medicine.* Baltimore: Williams and Wilkins; 1997.
121. Radulovic S, Cai RZ, Serfozo P, Groot K, Redding TW, Pinski J, 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 Dec;38(6):593-600.
122. Davis TP, Crowell S, Taylor J, Clark DL, Coy D, Staley J, et al. Metabolic stability and tumor inhibition of bombesin/GRP receptor antagonists. *Peptides.* 1992 Mar-Apr;13(2):401-7.
123. Groot K, Horvath JE, Cai RZ, Schally AV. Development of a radioimmunoassay for a pseudonapeptide bombesin/GRP antagonist with antitumor activity. *Int J Pept Protein Res.* 1995 Jun;45(6):561-6.
124. Pinski J, Yano T, Groot K, Cai RZ, Radulovic S, Schally AV. Endocrine effects of new bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists in rats. *Am J Physiol.* 1992 Oct;263(4 Pt 1):E712-7.
125. Pinski J, Yano T, Rekasi Z, Cai RZ, Radulovic S, Schally AV. High potency of a new bombesin antagonist (RC-3095) in inhibiting serum gastrin levels; comparison of different routes of administration. *Regul Pept.* 1992 Oct 13;41(3):185-93.
126. Szepeshazi K, Schally AV, Cai RZ, Radulovic S, Milovanovic S, Szoke B. 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 Nov 1;51(21):5980-6.
127. Szepeshazi K, Schally AV, Groot K, Halmos G. 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 May 8;54(2):282-9.
128. Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, Groot K, Radulovic S. 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 Dec 16;84(24):1915-22.
129. Pinski J, Halmos G, Szepeshazi K, Schally AV. Antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptides as adjuncts to agonists of luteinizing hormone-releasing hormone in the treatment of experimental prostate cancer. *Cancer.* 1993 Dec 1;72(11):3263-70.
130. Qin Y, Ertl T, Cai RZ, Horvath JE, Groot K, Schally AV. Antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptide inhibit growth of SW-1990 human pancreatic adenocarcinoma and production of cyclic AMP. *Int J Cancer.* 1995 Oct 9;63(2):257-62.
131. Shirahige Y, Cai RZ, Szepeshazi K, Halmos G, Pinski J, Groot K, 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):465-72.
132. Pinski J, Halmos G, Yano T, Szepeshazi K, Qin Y, Ertl T, 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 May 15;57(4):574-80.
133. Radulovic S, Schally AV, Reile H, Halmos G, Szepeshazi K, Groot K, 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):693-701.
134. Halmos G, Schally AV. 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 Feb 4;94(3):956-60.

135. Pinski J, Schally AV, Halmos G, Szepeshazi K. 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 Dec 2;55(6):963-7.
136. Sotomayor S, Munoz-Moreno L, Carmena MJ, Schally AV, Sanchez-Chapado M, Prieto JC, et al. Regulation of HER expression and transactivation in human prostate cancer cells by a targeted cytotoxic bombesin analog (AN-215) and a bombesin antagonist (RC-3095). *Int J Cancer*. Oct 15;127(8):1813-22.
137. Jungwirth A, Galvan G, Pinski J, Halmos G, Szepeshazi K, Cai RZ, 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 Aug 1;32(3):164-72.
138. Miyazaki M, Lamharzi N, Schally AV, Halmos G, Szepeshazi K, Groot K, 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 Apr;34(5):710-7.
139. Kahan Z, Sun B, Schally AV, Arencibia JM, Cai RZ, Groot K, 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 Mar 15;88(6):1384-92.
140. Bajo AM, Schally AV, Krupa M, Hebert F, Groot K, Szepeshazi K. 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 Mar 19;99(6):3836-41.
141. Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, Lamharzi N, Groot K, Horvath JE. 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 Sep 30;94(20):10913-8.
142. Pereira DV, Steckert AV, Mina F, Petronilho F, Roesler R, Schwartzmann G, et al. Effects of an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor in animal model of uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Jun 10.
143. Petronilho F, Araujo JH, Steckert AV, Rezin GT, Ferreira GK, Roesler R, et al. Effect of a gastrin-releasing peptide receptor antagonist and a proton pump inhibitor association in an animal model of gastritis. *Peptides*. 2009 Aug;30(8):1460-5.
144. Damin DC, Santos FS, Heck R, Rosito MA, Meurer L, Kliemann LM, et al. Effects of the Gastrin-Releasing Peptide Antagonist RC-3095 in a Rat Model of Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci*. 2009 Nov 6.
145. Waksman BH. Immune regulation in adjuvant disease and other arthritis models: relevance to pathogenesis of chronic arthritis. *Scand J Immunol*. 2002 Jul;56(1):12-34.
146. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2001 Sep 15;358(9285):903-11.
147. Edwards JC, Cambridge G. Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology (Oxford)*. 2001 Feb;40(2):205-11.
148. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell*. 1996 May 3;85(3):307-10.
149. Sekine T, Kato T, Masuko-Hongo K, Nakamura H, Yoshino S, Nishioka K, et al. Type II collagen is a target antigen of clonally expanded T cells in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1999 Jul;58(7):446-50.
150. Holmdahl R. Rheumatoid arthritis viewed using a headache paradigm. *Arthritis Res*. 2000;2(3):169-71.
151. Foey AD, Field S, Ahmed S, Jain A, Feldmann M, Brennan FM, et al. Impact of VIP and cAMP on the regulation of TNF-alpha and IL-10 production: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(6):R317-28.
152. 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(5):326-35.
153. Grimsholm O, Guo Y, Ny T, Forsgren S. Expression patterns of neurotrophins and neurotrophin receptors in articular chondrocytes and inflammatory infiltrates in knee joint arthritis. *Cells Tissues Organs*. 2008;188(3):299-309.
154. Keeble JE, Brain SD. A role for substance P in arthritis? *Neurosci Lett*. 2004 May 6;361(1-3):176-9.
155. Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum*. 1977 Apr;20(3):841-50.
156. Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR, Miller JF. Studies on antigen-induced arthritis in mice. II. Immunologic correlates of arthritis susceptibility in mice. *J Immunol*. 1977 May;118(5):1639-44.
157. Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR. Studies on antigen-induced arthritis in mice. III. Cell and serum transfer experiments. *J Immunol*. 1977 May;118(5):1645-8.
158. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med*. 1977 Sep 1;146(3):857-68.
159. Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature*. 1980 Feb 14;283(5748):666-8.
160. Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med*. 1998 Mar;76(3-4):275-88.
161. Svensson L, Jirholt J, Holmdahl R, Jansson L. B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol*. 1998 Mar;111(3):521-6.
162. Corthay A, Johansson A, Vestberg M, Holmdahl R. Collagen-induced arthritis development requires alpha beta T cells but not gamma delta T cells: studies with T cell-deficient (TCR mutant) mice. *Int Immunol*. 1999 Jul;11(7):1065-73.
163. 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 Oct-Dec;16(2-3):141-9.
164. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1962 Dec;111:544-7.
165. Cunha TM, Verri WA, Jr., Vivancos GG, Moreira IF, Reis S, Parada CA, et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Mar;37(3):401-7.
166. van de Loo FA, Joosten LA, van Lent PL, Arntz OJ, van den Berg WB. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995 Feb;38(2):164-72.
167. Tomita T, Kakiuchi Y, Tsao PS. THR0921, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, reduces the severity of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(1):R7.
168. Flores DG, de Farias CB, Leites J, de Oliveira MS, Lima RC, Tamajusuku AS, et al. Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 Glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Curr Neurovasc Res*. 2008 May;5(2):99-105.
169. Brenner M, Meng HC, Yarlett NC, Griffiths MM, Remmers EF, Wilder RL, et al. The non-major histocompatibility complex quantitative trait locus Cia10 contains a major arthritis gene and regulates disease severity, pannus formation, and joint damage. *Arthritis Rheum*. 2005 Jan;52(1):322-32.
170. Ohki-Hamazaki H, Iwabuchi M, Maekawa F. Development and function of bombesin-like peptides and their receptors. *Int J Dev Biol*. 2005;49(2-3):293-300.

171. 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 Nov;277(5 Pt 1):G922-8.
172. Irmeler IM, Gajda M, Brauer R. Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN-gamma-deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response. *J Immunol*. 2007 Nov 1;179(9):6228-36.

6. Artigo Científico Redigido em Inglês

Protective Effect of RC-3095, an Antagonist of the Gastrin-Releasing Peptide Receptor, in Experimental Arthritis

P. G. Oliveira,¹ R. Grespan,² L. G. Pinto,² L. Meurer,¹ J. C. T. Brenol,¹ R. Roesler,¹
G. Schwartzmann,¹ F. Q. Cunha,² and R. M. Xavier¹

Objective. To evaluate the antiinflammatory effects of RC-3095 in 2 experimental models of arthritis, collagen-induced arthritis (CIA) and antigen-induced arthritis (AIA), and to determine the mechanisms of action involved.

Methods. RC-3095 was administered daily to mice with CIA and mice with AIA, after induction of disease with methylated bovine serum albumin. Disease incidence and severity were assessed using a clinical index and evaluation of histologic features, respectively. In mice with CIA, gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) was detected by immunohistochemical analysis, while in mice with AIA, migration of neutrophils, presence of glycosaminoglycans, and lymphocyte proliferation, determined using the MTT assay, were assessed. Expression of cytokines interleukin-17 (IL-17), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) was evaluated in all mouse knees using enzyme-linked immunosorbent assay. Treg cell production was assessed by flow cytometry in the joints of mice with AIA.

Results. In mice with AIA, administration of RC-3095 reduced neutrophil migration, mechanical hy-

pernociception, and proteoglycan loss. These findings were associated with inhibition of the levels of all 3 proinflammatory cytokines, decreased lymphocyte proliferation, and increased Treg cell numbers. In the CIA model, treatment with RC-3095 led to a significant reduction in arthritis clinical scores and the severity of disease determined histologically. Synovial inflammation, synovial hyperplasia, pannus formation, and extensive erosive changes were all dramatically reduced in the arthritic mice treated with RC-3095. Furthermore, arthritic mice treated with RC-3095 showed a significant reduction in the concentrations of IL-17, IL-1, and TNF, and showed a diminished expression of GRPR.

Conclusion. These findings suggest that the GRP pathway has a significant role in chronic arthritis, and its inhibition can be explored as a possible therapeutic strategy in rheumatoid arthritis.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory joint disease characterized by inflammation of the synovium that leads to destruction of cartilage and bone (1). Its etiology is unknown but seems to involve both humoral (2,3) and cellular (4) immune mechanisms. There is now a growing awareness that RA is a heterogeneous disease composed of several distinct disease pathways (5). In spite of significant improvements in the treatment of RA, there is still a need for novel therapeutic strategies, and, to achieve this, identification of the many pathways involved in the modulation of inflammation is critical.

Although many different cell types, such as macrophages and synoviocytes, have long been known to be involved in RA, it has recently been realized that the peripheral nervous system has a key role in modulating the severity of RA (6). In addition, studies have shown that neuropeptides are secreted locally during immune responses, and that they are involved in vasodilation and

Supported in part by the National Council for Scientific and Technological Development (grant 472737/2008-2 to Dr. Brenol), the Fundação de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and Aeterna Zentaris GmbH, Frankfurt, Germany.

¹P. G. Oliveira, MSc, L. Meurer, MD, PhD, J. C. T. Brenol, MD, PhD, R. Roesler, PhD, G. Schwartzmann, MD, PhD, R. M. Xavier, MD, PhD: Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ²R. Grespan, PhD, L. G. Pinto, MSc, F. Q. Cunha, PhD: Universidade de São Paulo—Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil.

Drs. Roesler and Schwartzmann are listed as inventors in a provisional patent application for the therapeutic use of gastrin-releasing peptide receptor antagonists in the treatment of inflammatory conditions.

Address correspondence to R. M. Xavier, MD, PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia, Rua Ramiro Barcellos 2350, Sala 645, 90035-003 Porto Alegre, Brazil. E-mail: rmaxavier@hcpa.ufrgs.br.

Submitted for publication August 6, 2010; accepted in revised form May 31, 2011.

plasma extravasation, i.e., neurogenic inflammation. It is furthermore known that inflammatory cells can produce neuropeptides (7). Synovial tissue is richly innervated with neuropeptide-containing primary afferent and sympathetic neurons, and there is evidence that the release of these neuropeptides powerfully influences the severity of chronic inflammatory diseases, including RA (6).

The possible role of neuropeptides, including vasoactive intestinal peptide, substance P, and neuropeptide Y, in the mechanisms of joint inflammation has been investigated in RA (8,9). Another neuropeptide that has been studied is the gastrin-releasing peptide (GRP), which is the mammalian homolog of bombesin, a tetradecapeptide originally isolated from frog skin (10).

GRP affects several systems in mammals, including neuroendocrine regulation, gastrointestinal secretion, and cell proliferation. Furthermore, it is involved in the development and regulation of the immune response, acting directly on the immune cells that express the GRP receptor (GRPR) (11,12). Its presence in increased concentrations has been demonstrated in the joint fluid and chondrocytes of RA patients (13,14), in correlation with a raised erythrocyte sedimentation rate and increased levels of proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF), interleukin-6 (IL-6), and monocyte chemoattractant protein (MCP), suggesting that this neuropeptide could be involved in modulation of the inflammatory process. The GRPR is a cell surface protein that binds, depending on the species, bombesin, GRP, or closely related peptides with high affinity, triggering intracellular changes that influence cell behavior (11). Moreover, recently the presence of GRPRs in articular chondrocytes and inflammatory infiltrates in mouse models of arthritis has been reported. Therefore, it has been suggested that this neuropeptide could be an interesting target for new therapeutic strategies in RA (15).

The pseudonapeptide RC-3095 is an antagonist of the receptor of bombesin/GRP, originally synthesized by McKillop et al in 1990 (16), with the aim of inhibiting the action of bombesin/GRP. Using this specific antagonist of the GRPR, our group has demonstrated that inhibition of the GRPR could decrease the release of TNF and IL-1 from activated macrophages in an experimental model of sepsis (17), elicit important action against oxidative damage in an experimental model of uveitis (18), and protect against gastric oxidative injury in an animal model of gastritis (19).

Recently, we demonstrated the effect of RC-3095 in a model of arthritis induced by Freund's complete

adjuvant (CFA). This was the first study to demonstrate a protective effect of an antagonist of the receptor for bombesin /GRP, and to thus exhibit a possible role of GRP in the development of arthritis, but further studies are needed (20). However, this model has several limitations and is less representative of RA processes (21).

Antigen-induced arthritis (AIA) (22–24) and collagen-induced arthritis (CIA) (25–27) are 2 commonly used murine models of RA. AIA is induced by intradermal immunization and subsequent intraarticular (IA) injection of methylated bovine serum albumin (mBSA) (22–24). The disease is chronic and antigen-specific, and has been suggested to be T cell dependent (22). CIA is induced by intradermal immunizations with a major cartilage protein component, type II collagen (CII) (25–27). CIA is dependent on both B cells and T cells as well as the complement system (28,29).

Thus, in the present study, we studied the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of RC-3095 in 2 different animal models of arthritis, each of which better reflects the diverse pathophysiologic mechanisms involved in RA.

MATERIALS AND METHODS

Animals. AIA was induced in Balb/c wild-type mice, and CIA was induced in DBA/1J inbred mice. In both groups, only male mice, weighing 18–25 gm, were used. All experimental procedures involving animals were performed in accordance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Animals and with the approval of our institutional ethics committee.

Drug. The GRPR antagonist RC-3095, or D-Tpi6-Leu13 -(CH₂NH)-Leu14 (30), was produced and donated by Æterna Zentaris.

Induction of AIA and CIA. For AIA studies, mice were sensitized by subcutaneous (SC) injection with 500 µg of mBSA (Sigma) in 0.2 ml of an emulsion containing 0.1 ml of 0.9% saline and 0.1 ml CFA (1 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis*; Sigma) on days 0 and 7. Twenty-one days after the initial injection, arthritis was induced in the immunized animals by IA injection of mBSA (30 µg/cavity), dissolved in 10 µl of saline, into the left tibiofemoral joint, and the contralateral joint was injected with 10 µl of saline alone as a control.

The Balb/c mice were injected with RC-3095 (1 mg/kg SC) or vehicle (0.9% saline) twice a day for a total of 2 or 10 days, starting on the second day before the induction of arthritis. Some mice were killed at 24 hours after IA injection, to study neutrophil migration, articular nociception, and lymphocyte proliferation. The remaining mice were reinduced with the same IA preparation after 4 days, and the mice were killed 4 days thereafter for studies on cytokines, glycosaminoglycans (GAGs), and the distribution of Treg cell populations.

For CIA studies, mice were randomly divided into 4 groups. Group 1 comprised mice that were not manipulated (nonimmunized), group 2 comprised immunized mice treated with vehicle (saline, administered SC at 5 ml/kg twice a day for

10 days after the onset of the disease), and groups 3 and 4 comprised immunized mice treated with either 0.3 mg/kg (group 3) or 1 mg/kg (group 4) RC-3095, administered SC twice a day for 10 days after the onset of the disease. The immunizations were administered by intradermal injection at the base of the tail with 100 μ l of emulsion, consisting of equal parts of CFA containing 5 mg/ml heat-killed *M tuberculosis* antigen (strain H37Ra; Difco) and 2 mg/ml bovine CII (Sigma) in 10 mM acetic acid (day 0). Booster injections of 100 μ l of emulsion consisting of equal parts of Freund's incomplete adjuvant and 2 mg/ml CII in 10 mM acetic acid were administered in the other site at the base of the tail 18 days later. Clinical evaluation was performed daily, through standardized scoring of arthritis, measurement of edema, and evaluation of articular nociception. The animals were killed on the eleventh day after treatment, by anesthesia overdose. The knees of the mice were collected to determine cytokine levels, and hind paws were collected for histology and immunohistochemistry analyses.

Arthritis scoring. We used a standardized method of arthritis scoring to evaluate the degree of swelling and erythema of the paws, in which 0 normal, 1 mild swelling and erythema, 2 moderate swelling and erythema, 3 severe swelling and erythema plus loss of function in 2 paws, and 4 total loss of function in a minimum of 3 paws. Onset of disease, characterized by the development of erythema and/or paw swelling, was seen between day 25 and day 35.

Edema measurement. Paw thickness was measured with a plethysmometer (Ugo Basile) before the induction of CIA (V_0) and every day after the beginning of the disease (V_T), as previously described (31). The amount of paw swelling was determined for each mouse, and the difference between the V_T and the V_0 was calculated to obtain the extent of edema (expressed in mm^3).

Evaluation of articular hypernociception. The articular hypernociception of the tibiofemoral joint was evaluated using a previously described method (32), with modification. In a quiet room, mice were placed in acrylic cages (12 \times 10 \times 17 cm high) with a wire-grid floor for 15–30 minutes before testing for environmental adaptation. In these experiments, an electronic pressure meter was used, consisting of a hand-held force transducer fitted with a polypropylene tip (IITC Inc.— Life Science Instruments). For this model, a large tip (4.15 mm^2) was adapted to the probe. An increasing perpendicular force was applied to the central area of the plantar surface of the hind paw to induce flexion of the tibiofemoral joint, followed by paw withdrawal. The electronic pressure-meter apparatus automatically recorded the intensity of the force applied when the paw was withdrawn. The test was repeated until 3 subsequent measurements that yielded consistent results (i.e., variation among these measurements was lower than 1 gm) were obtained. This represented the flexion-elicited mechanical threshold for evaluation of articular hypernociception, with results expressed in grams.

Evaluation of in vivo neutrophil migration in AIA.

Neutrophil migration into the knee joints of mice in all groups was evaluated at the end of the experimental period. The mice were killed and the articular cavities were washed twice with 5 l phosphate buffered saline (PBS) containing 1 mM EDTA, and then diluted to a final volume of 100 μ l with PBS/EDTA to evaluate leukocyte migration at the indicated times. The total number of leukocytes was determined in a Neubauer

chamber diluted in Turk's solution. Differential cell counts were determined in cytocentrifuge on Rosenfeld-stained slices (Cytospin 4; Shandon). Differential cell counts were performed with a light microscope, with results expressed as the mean SEM number of neutrophils per cavity.

Assessment of proteoglycan metabolism in patellar cartilage in AIA. Sulfated GAG content was evaluated in patellar cartilage with the 1,9-dimethylmethylene blue (DMMB) colorimetric assay (Sigma-Aldrich), as previously described (33). In brief, patellae were fixed overnight and decalcified in 5% (volume/volume) formic acid at room temperature for 4 hours before separation of the cartilage layer from underlying bone, and subsequently digested overnight at 60°C with 60 μ l of 10 mg/ml of papain (type IV; Sigma) in 0.1M sodium acetate, pH 6.5, 10 mM L-cysteine, and 50 mM di-sodium EDTA per patella. The digested patellar tissue was then collected to measure GAGs using the DMMB assay. The assay was performed by monitoring the metachromatic reaction of sulfated GAGs with DMMB at 525 nm. The calibration curve ranged from 0 to 100 μ g/ml chondroitin 6-sulfate, with results expressed as the μ g of GAG per mg of cartilage.

Lymphocyte proliferation assay in AIA. In vitro proliferation of lymphocytes in the draining lymph nodes (DLNs) (popliteal and inguinal) of mice was examined using the MTT assay (34). Mice were killed, and their DLNs were removed aseptically. A single-cell suspension was prepared and cultured in triplicate wells (5 \times 10⁵ cells/well in a 96-well plate) and treated with RC-3095 (0.1 M) or GRP (100 nM) (35) for 72 hours at 37°C in 5% CO₂ in RPMI medium containing 100 μ g/ml mBSA or only RPMI medium for control culture. On the day of the assay, the medium was removed and MTT (0.5 mg/ml) was added to the medium in each well. The plate was returned to the incubator for 4 hours, and the supernatants were then removed and 50 μ l of DMSO (Sigma) was added. The plate was agitated in the dark for 10 minutes to dissolve the MTT formazan crystals. The optical density of each well was read at 480 nm.

Histology and histologic scoring of arthritis in CIA.

DBA/1J mice were killed at designated time points after the induction of arthritis, and the ankles were dissected and fixed in 10% buffered formalin for 7 days. Paws were then decalcified with 10% nitric acid for 27 hours. Tissues were sectioned and embedded in paraffin, and slides were prepared and stained with hematoxylin and eosin. We used a previously described comprehensive histologic scoring system. Briefly, the tibiotalar, talus-calcaneal, and midfoot joints were histologically scored for the following parameters. Synovial inflammation, determined in 5 high-power magnification fields (HMFs), was scored for the percentage of infiltrating mononuclear cells, as follows: 0 absent, 1 mild (1–10%), 2 moderate (11–50%), and 3 severe (51–100%). Synovial hyperplasia was scored for severity, as follows: 0 absent, 1 mild (5–10 layers), 2 moderate (11–50 layers), and 3 severe (20 layers). Extension of pannus formation was determined on the basis of the reader's impression, as follows: 0 absent, 1 mild, 2 moderate, and 3 severe. Cartilage erosion was determined as the percentage of the cartilage surface that was eroded, as follows: 0 absent, 1 mild (1–10%), 2 moderate (11–50%), and 3 severe (51–100%). Finally, bone erosion was scored as follows: 0 none, 1 minor erosions observed only on HMFs, 2 moderate erosions observed at low magnification, and 3 severe transcortical erosions (36).

Staining of the tissue was interpreted by 2 blinded and independent investigators.

Immunohistochemical analysis for GRPR. Serial sections of the ankles of DBA/1J mice were subjected to immunohistochemistry for detection of GRPR, which consisted of deparaffinization and rehydration, inactivation of endogenous peroxidase activity, and blocking of nonspecific reactions (13). These sections were incubated for 12 hours at 4°C with a solution of the anti-GRPR primary antibody (Abcam) diluted 1:300. Identification of the primary antibody site was achieved by subsequent application of biotinylated antibody, streptavidin–horseradish peroxidase conjugate (LSAB; Dako), and exposure to diaminobenzidine tetrahydrochloride as chromogen (DAB Kit; Dako), and were counterstained with hematoxylin for visualization. Immunohistochemical staining was scored according to intensity, as follows: 1 mild immunostaining, 2 moderate immunostaining, and 3 strong immunostaining. In addition, the area of distribution was expressed as the percentage of cells stained. We used a semiquantitative approach in which the percentage of stained cells was multiplied by the intensity of staining, and this number was used for data evaluation. A pathologist, who was blinded to the clinical and histopathologic information, independently analyzed the glass slides.

Measurement of cytokines. The knee joints of mice with AIA and mice with CIA were dissected, frozen with liquid nitrogen, crushed in a mortar and pestle, and then solubilized in PBS. The homogenates were centrifuged at 10,000g for 10 minutes, and the supernatants were used for detection of IL-1, TNF, and IL-17. The concentrations were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; R&D Systems) using paired antibodies (detection limit 10 pg/ml).

Flow cytometry analysis. DLNs (popliteal and inguinal) from Balb/c mice were removed aseptically following immunization with mBSA and treatment with RC-3095. The cells were cultured in 12-well plates in RPMI medium (1×10^6 /ml). Cells were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse CD25 or phycoerythrin (PE)-conjugated anti-mouse CD4 and Cy5-conjugated anti-mouse CD3, FITC-conjugated anti-mouse or CD25 PE-conjugated anti-mouse FoxP3 and Cy5-conjugated anti-mouse CD4, and FITC-conjugated anti-mouse CD25 or PE-conjugated anti-mouse GITR and Cy5-conjugated anti-mouse CD4. After washing twice with buffer (1 PBS with 2% BSA), the cells were analyzed by flow cytometry. The acquisition and analysis of the samples were performed using FACSCalibur flow cytometry with CellQuest software (Becton Dickinson).

Statistical analysis. Values are the mean SEM and are representative of 2 or 3 separate experiments. The mean values in the different treatment groups were compared by analysis of variance with Tukey's adjustment for multiple comparisons or by Student's *t*-test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Amelioration of the inflammatory reaction in AIA by treatment with RC-3095. IA injection of mBSA into the tibiofemoral joints of immunized mice induced a significant neutrophil migration to the articular cavity at 24 hours, as compared with that in the control contralateral joint in the same mice. Treatment with

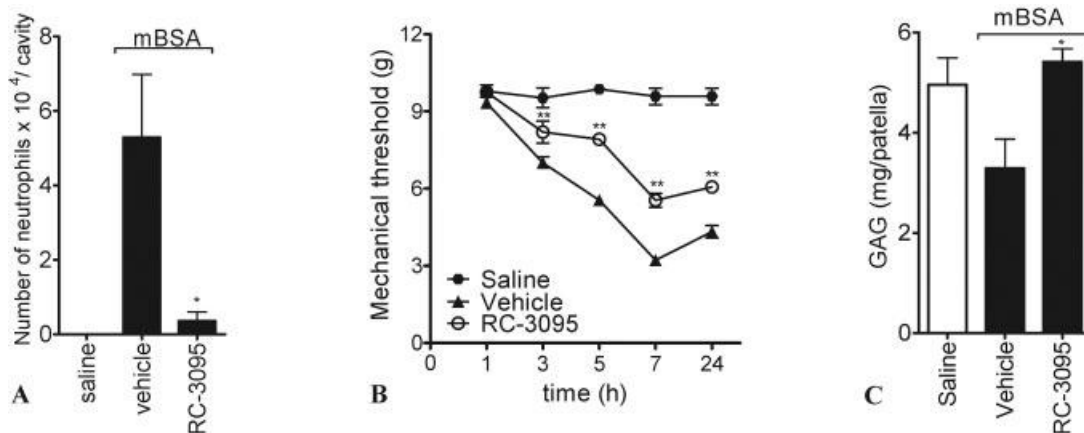


Figure 1. Inhibitory effect of RC-3095 on disease progression in mice with antigen-induced arthritis (AIA). **A**, Neutrophil migration into the articular cavity of the knee joints of mice immunized with methylated bovine serum albumin (mBSA) was assessed 24 hours after treatment with vehicle or RC-3095 (1 mg/kg). Injection of saline alone was used as a control. *P* 0.045 versus vehicle treatment, by Student's unpaired *t*-test. **B**, Hypernociceptive responses were evaluated 1, 3, 5, 7, and 24 hours after intraarticular injection of mBSA. Treatment with RC-3095 inhibited mechanical hypernociception at 3, 5, 7, and 24 hours, as assessed by the paw pressure test. *P* 0.01 versus vehicle treatment, by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post hoc test. **C**, Cartilage damage was assessed by measurement of the glycosaminoglycan (GAG) content using a colorimetric assay. Arthritis-induced loss of proteoglycans was significantly reduced in mice treated with RC-3095 (1 mg/kg twice per day), preventing cartilage erosion. *P* 0.05 versus vehicle treatment, by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Bars show the mean SEM results in 6 mice per group.

Table 1. Effects of RC-3095 on the tissue concentration of interleukin-17 (IL-17), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in mice with antigen-induced arthritis and mice with collagen-induced arthritis*

	Saline-injected or nonimmunized controls	RC-3095-treated immunized mice	Vehicle-treated immunized mice
Antigen-induced arthritis			
IL-17	41.72 4.38	81.67 11.15†	175.3 23.15
IL-1	30.63 0.85	37.24 0.64†	53.24 5.54
TNF	7.45 1.82	27.21 7.16†	128.3 48.78
Collagen-induced arthritis			
IL-17	0.00 0.0	0.88 0.88†	25.11 6.31
IL-1	23.2 0.57	40.37 3.09†	67.8 3.82
TNF	0.00 0.0	3.34 1.58†	16.58 2.73

* Values are the mean SEM pg/joint in 10 mice per group. Comparisons between treatment groups were made using one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. RC-3095 (1 mg/kg) or vehicle (5 mg/kg of 0.9% saline) was administered subcutaneously after arthritis induction in antigen-induced arthritis and after the onset of arthritis in collagen-induced arthritis. The cytokine concentrations in the joint tissue were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay at 24 hours after arthritis induction.

† $P < 0.05$ versus vehicle-treated immunized mice.

RC-3095 greatly reduced antigen-induced recruitment of neutrophils into the synovial cavity during joint inflammation (Figure 1A).

Inflammation-related hypernociception was first noticeable at 3 hours after antigen challenge, and then became more intense by 5 hours, peaked at 7 hours, and was persisting at 24 hours. Treatment with RC-3095 (1 mg/kg, twice per day) diminished the extent of inflammation-related hypernociception observed at 5, 7, and 24 hours after antigen challenge in immunized mice compared to that in vehicle-treated immunized mice (Figure 1B). The GAG content, an indicator of turnover of proteoglycans, was decreased in vehicle-treated arthritic mice compared with treatment-naïve (saline only) animals. This loss of GAGs was prevented in mice treated with RC-3095 (Figure 1C).

Effects of RC-3095 on the immune response in AIA. Levels of the proinflammatory cytokines IL-17, IL-1, and TNF and the antiinflammatory cytokine IL-10 in articular tissue were analyzed on day 8 after IA injection of mBSA and treatment with RC-3095. IL-17, IL-1, and TNF were systemically overproduced in the vehicle-treated mice with AIA. All cytokine levels were decreased in the RC-3095 treatment group, in correlation with the degree of amelioration of the inflammatory reaction as measured with the parameters utilized in this study (Table 1).

In order to determine whether RC-3095 alters the proliferation of lymphocytes from the DLNs (popliteal and inguinal) when mice were exposed in vitro to the immunization antigen, cells were isolated from mice 8 days after immunization. Treatment with RC-3095 in

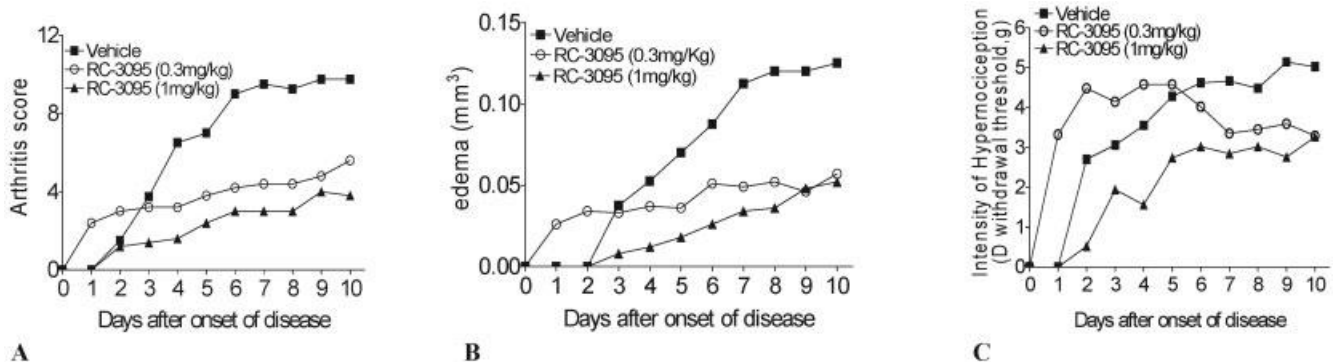


Figure 2. Effects of RC-3095 on the arthritis score, edema, and hypernociception in mice with collagen-induced arthritis (CIA). DBA/1J mice were sensitized to type II collagen, and the development of arthritis was evaluated clinically using a clinical arthritis score (A), measurement of hind paw edema by plethysmometry (B), and measurement of hypernociception using the paw pressure test (C). $P < 0.01$ for both RC-3095 treatment groups versus vehicle-treated mice with CIA, by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post hoc test for comparisons of clinical score and paw edema, and by two-way ANOVA with Tukey's post hoc test for comparisons of hypernociception. Results are the mean of 6 mice per group.

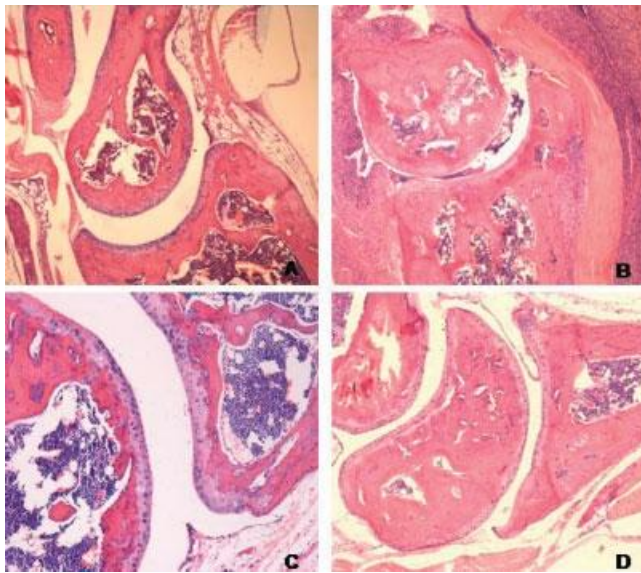


Figure 3. Histopathologic features of representative ankle joints from male DBA/1J mice, as assessed by hematoxylin and eosin staining. **A**, Nonimmunized mice showed normal articular cartilage, absence of infiltrates in the synovium, and open joint space. **B**, Vehicle-treated mice with collagen-induced arthritis (CIA) showed marked infiltration of inflammatory cells and synovial hyperplasia with pannus formation in the joint space, as well as extensive cartilage and bone erosions. **C**, Mice with CIA treated with 0.3 mg/kg RC-3095 showed moderate synovial inflammation and extension of pannus similar to that in the vehicle-treated group. **D**, Mice with CIA treated with 1 mg/kg RC-3095 showed only mild inflammatory cell infiltration and nearly normal joint architecture. Original magnification 20.

vitro dramatically inhibited the proliferation of lymphocytes ($P < 0.0001$) when compared to that in vehicle-treated mice and that in mice with GRP exposure (results not shown).

Proportions of the Treg cell population are

known to change with AIA immunization, and therefore we sought to investigate the effect of RC-3095 on the ratio of positive expression of Treg cells, by assessing differences in surface marker expression (CD25^{high} FoxP3 GITR) in peripheral DLN-derived cells. Flow cytometry analysis indicated that RC-3095 markedly increased the proportion of CD25^{high} FoxP3 GITR cells ($P < 0.05$) when compared with that in the vehicle-treated group (results not shown).

Inhibition of the development of CIA by RC-3095. The CIA model is characterized by aggressive synovitis, extensive pannus formation, cartilage degradation, and focal bone erosion. After 21 days of CIA induction of disease, all animals had developed a severe arthritis in the paws, whereas there were no changes in the nonimmunized control group. Progression of disease was indicated by an increase in edema and erythema of one or both ankle joints, followed by involvement of the metatarsal and interphalangeal joints. Fully developed arthritis, including red and swollen paws, was observed 3–6 days after the onset of inflammation.

There was a clear difference in the arthritis score, extent of edema, and mechanical hypernociception between the vehicle-treated and RC-3095 (0.3 mg/kg or 1 mg/kg twice per day)–treated animals (Figures 2A–C). Both doses markedly improved all 3 of these parameters, with differences in edema and the arthritis score seen from day 3 of disease onset.

Reduction in the histopathologic changes of the joint by RC-3095 in mice with CIA. Representative histologic findings for each experimental group are shown in Figure 3, and the histologic scores are detailed in Table 2. The nonimmunized animals exhibited a normal architecture of the ankle joints, with normal

Table 2. Synovial histologic scoring of the ankles of mice with collagen-induced arthritis treated with RC-3095*

	RC-3095		Vehicle
	0.3 mg/kg	1 mg/kg	
Synovial inflammation	2 (0–3)	0 (0–3)‡	3 (2–3)
Synovial hyperplasia	0 (0–1)†	0 (0–1)‡	1 (1–2)
Extension of pannus	1.5 (0–3)	0 (0–2)‡	2 (1–3)
Cartilage erosions	1 (0–2)†	0 (0–2)‡	2 (1–3)
Bone erosions	0 (0–1)†	0 (0–2)‡	2 (1–3)

* Values are the median (25th–75th percentile) histologic scores (scale 0–3 for all measures) of the ankles from mice with collagen-induced arthritis (n 10 animals per group) treated with RC-3095 at 0.3 or 1 mg/kg, or saline as vehicle control, for 10 days after the onset of experimental arthritis. All comparisons of the RC-3095 treatment groups with the vehicle-treated group were made using the Kruskal-Wallis test with Dunn’s test for multiple comparisons.

† $P < 0.05$ versus vehicle-treated and RC-3095 (1 mg/kg) groups.

‡ $P < 0.05$ versus vehicle-treated and RC-3095 (0.3 mg/kg) groups.

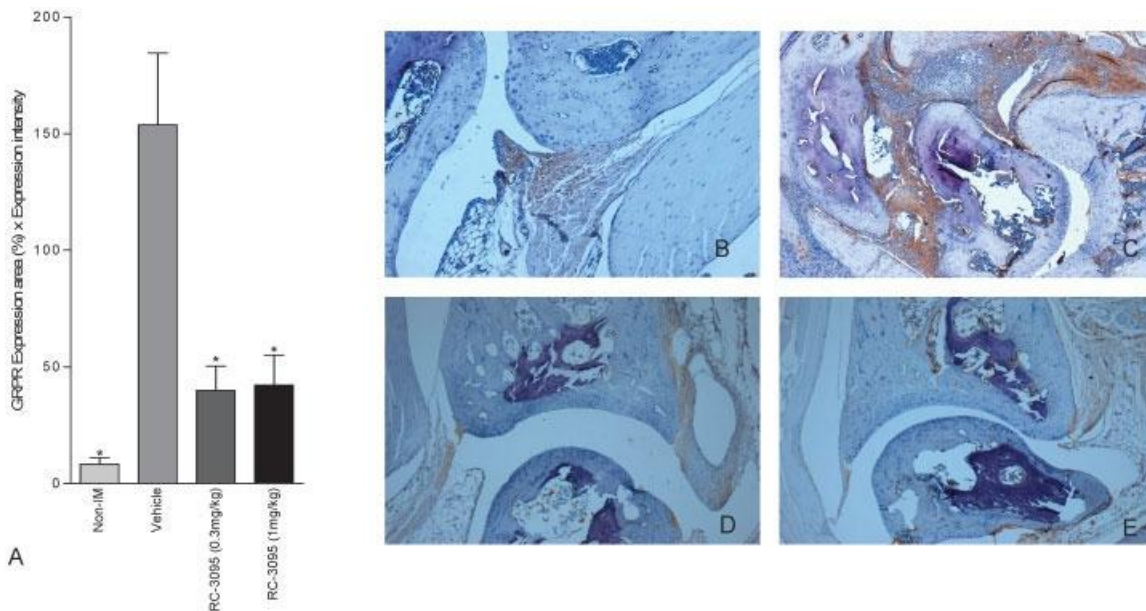


Figure 4. Evaluation of gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) expression in the ankle joints of mice with collagen-induced arthritis (CIA), as assessed by immunohistochemistry. **A**, Immunostaining for GRPR was significantly less intense in the RC-3095–treated groups (both doses) than in the vehicle-treated group of mice with CIA. Nonimmunized (non-IM) animals were used as a control. Bars show the mean SEM of 6 mice per group. $P < 0.01$ versus vehicle-treated mice, by one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. **B–E**, Results of immunohistochemical analyses of representative ankle joint tissue sections reveal mild immunostaining for GRPR in nonimmunized animals (**B**), strong immunostaining on inflammatory infiltrates in cartilage of vehicle-treated mice with CIA (**C**), and mild immunostaining with less intensity and a smaller area of expression, indicative of a lower expression of GRPR, in RC-3095–treated animals with CIA receiving a dose of 0.3 mg/kg (**D**) or 1 mg/kg (**E**) twice per day. Original magnification 20.

appearance of the cartilage lining, the joint surface, and the underlying bones, without any inflammatory infiltrates in the synovial tissue (Figure 3A). Vehicle-treated animals presented a highly abnormal histologic appearance of the joint, with pronounced synovial inflammation, synovial hyperplasia, pannus formation, and extensive erosive changes in the cartilage and bone (Figure 3B). In contrast, the animals treated with RC-3095 at a dose of 1 mg/kg showed a remarkable inhibition in all histologic findings of arthritis, displaying only mild inflammatory cell infiltration and nearly normal joint architecture of the anterior paws (Figure 3D) when compared with vehicle-treated mice. In contrast, the 0.3 mg/kg dose of RC-3095 was shown to be less effective in all scores of histologic features; in particular, the mice treated with 0.3 mg/kg RC-3095 exhibited synovial inflammation and extension of pannus similar to that in the vehicle-treated group (Figure 3C).

Effect of treatment with RC-3095 on GRPR expression in articular tissue in the CIA model. Immunohistochemical analysis for GRPR was performed in the articular tissue of mice with CIA (Figure 4). Staining for

GRPR was detected both in the cytoplasm and on the cell membrane, and all ankle tissue sections expressed the receptor. No membrane staining was seen. The staining was often multifocal and sometimes diffuse.

GRPR was significantly less intensely expressed in the RC-3095–treated group than in the vehicle-treated group (Figure 4A). The nonimmunized animals showed light staining for GRPR (Figure 4B). An increase in GRPR expression could be observed in the synovial cells (fibroblasts and interstitial cells) and sometimes in the cartilage (chondrocytes lining the articular surface) in the animals of the vehicle-treated group, in conjunction with severe articular inflammation, characterized by inflammatory infiltration into the vessels, synovial membrane, and cartilage (Figure 4C). The RC-3095–treated groups (0.3 mg/kg and 1 mg/kg twice per day) showed a smaller expression of GRPR, in terms of both area and intensity (Figures 4D and E).

Alteration of the release of proinflammatory cytokines by RC-3095 in mice with chronic CIA. The levels of the proinflammatory cytokines IL-17, IL-1, and TNF in the articular tissue were analyzed using

ELISA on day 10 after the onset of disease. Treatment with RC-3095 (1 mg/kg twice per day) significantly reduced the levels of all 3 proinflammatory cytokines in the joint tissue of mice with CIA, when compared with that in the vehicle-treated group, the latter of which displayed a systemic overproduction of all 3 cytokines in the articular tissue (Table 1).

DISCUSSION

In the present study, we evaluated the effects of a selective GRPR antagonist, RC-3095, on 2 different models of RA, comprising mice with CIA and mice with AIA. In both models, the histopathologic findings are similar to those observed in RA patients. Our findings demonstrate that RC-3095 treatment significantly attenuates the development of arthritis in both AIA and CIA. This was evidenced by the observed reduction in clinical scores and synovial inflammation in the treated animals from both experimental models. In the AIA model, reduction of neutrophil influx into the joint cavity, hypernociception, damage to the articular cartilage, lymphocyte proliferation, and an increase in Treg cell numbers were observed, while in the CIA model, there was significant reduction in the hypernociception, number of inflamed paws, visually determined inflammation score, and proinflammatory cytokine levels. Virtual abrogation of the chronic synovitis, seen on histopathologic analysis, and prevention of damage to the joint are indicative of a protective effect of RC-3095, also at the structural level. Demonstration of efficacy in different species and models is a crucial proof-of-concept step to establish the therapeutic value of a compound.

Despite the known effects of GRP on tissue growth (16) and on the gastrointestinal system (37,38), respiratory tract (39), and nervous system (40), little is known about its physiologic effects on immune function. GRP seems to modulate, as either a stimulator or inhibitor, the function of lymphocytes, phagocytes, and natural killer cells. Lymphocytes, neutrophils, eosinophils, macrophages, mast cells, and endothelial cells all express the receptor for GRP, indicating a possible role of this peptide in inflammatory conditions (11,12). The expression of GRPRs depends on cell differentiation, and GRP can stimulate or inhibit responses, depending on the maturity and state of activation of the target cell (41).

Previous work has shown that GRP can exert a significant effect on different aspects of immune regulation in arthritic joints. Bombesin/GRP-like peptide is clearly detectable in the synovial fluid of patients with

RA, but not that of control subjects, in correlation with inflammatory cytokine levels and the erythrocyte sedimentation rate (7). Grimsholm et al (13,14) have clearly demonstrated the presence of GRPR in both the inflammatory infiltrate and on the articular chondrocytes of arthritic mice. They also observed frequent bombesin/GRP-immunoreactive varicose nerve fibers in association with the inflammatory infiltrate, and the presence of GRPR in some cells in the infiltrate (13,14). The present study thus shows that bombesin/GRP can be added to the list of neuropeptides present in joint innervations, especially in association with inflammatory infiltrates.

Many antagonists for the bombesin/GRPR have been synthesized and tested for their ability to inhibit the effects of this peptide (37,38). RC-3095 has been tested in an animal model of sepsis, in which the treatment was shown to decrease the production of proinflammatory cytokines, such as TNF and IL-1, without changing the production of the antiinflammatory cytokine IL-10, leading to improved survival of the treated animals (17). In an animal model of uveitis, RC-3095 elicited important action against oxidative damage in the irides, and also exhibited antiinflammatory actions by reducing the activity of myeloperoxidase and decreasing the levels of TNF and MCP-1 to a higher extent than that with dexamethasone (18). In an animal model of gastric ulcer, RC-3095 treatment, administered alone or in combination with omeprazole, was effective for the inhibition of acid secretion, in addition to exerting protective effects by reducing gastric oxidative injury (19). Finally, in an animal model of ulcerative colitis, RC-3095 reduced the severity of inflammatory bowel disease, and its antiinflammatory activity was associated with a reduction in the colonic expression of TNF (39).

Recently, our group demonstrated the effect of RC-3095 in a model of arthritis induced by CFA. The results demonstrated that treatment with RC-3095 led to improvement of arthritis, by reducing the ankle thickness in the affected paw, reducing the joint damage, and decreasing cytokine serum levels. This prior study was the first to evaluate the protective effect of an antagonist of bombesin/GRP in these conditions (20).

New therapies for RA have recently been developed, in which the aim has been to inhibit inflammation mediators such as TNF (etanercept, adalimumab, and infliximab), IL-1 (anakinra), and IL-6 (tocilizumab). However, there is evidence that although these anticytokine therapies are effective, a single cytokine target will likely benefit a specific subset of patients with RA.

Other proinflammatory mediators, such as neuropeptides, are also involved, but the relationship of neuropeptides with cytokines in RA has received little attention. A large number of agonists and antagonists of neuropeptide receptors have been produced and could be tested alone or in combination with preexisting therapies (40,42).

These studies of the GRPR antagonist RC-3095 in experimental models of arthritis may provide relevant information on the development of the disease and increase the knowledge of new treatments for RA. The promising results that we have observed in the model of arthritis induced by CFA point to the need to better assess the efficacy and potential mechanisms of action in other models that are most similar to human RA. Such knowledge would be essential for the subsequent progression to the stage of clinical trials with the drug.

It is likely that multiple mechanisms are involved in the protection conferred by RC-3095 in arthritis. The reduction in the acute influx of neutrophils in AIA, leading to decreased hypernociception and cartilage degradation, contributes to the joint protection. The extent of joint damage observed in AIA is closely related to an increase in the production of proinflammatory cytokines, but, most prominently, that of IL-17 (43). RC-3095 decreased the release of TNF, IL-1, and IL-17 and increased the Treg cell population. There was also a significant reduction in the rate of lymphocyte proliferation in RC-3095-treated animals.

In conclusion, the present results support the view that interference of the neuropeptide GRP pathway by RC-3095 has immunomodulatory and antiinflammatory effects and was able to attenuate damage and progression of disease in experimental models of arthritis. Such observations support the future development of clinical trials in RA with this potential new therapeutic strategy.

ACKNOWLEDGMENTS

RC-3095 was a gift from Æterna Zentaris GmbH (Frankfurt, Germany). The authors thank Giuliana Bertozzi, Priscila Lora, and Ju'lio Anselmo Siqueira for providing technical assistance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Drs. Cunha and Xavier had full access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study conception and design. Oliveira, Grespan, Pinto, Brenol, Roesler, Schwartzmann, Cunha, Xavier.

Acquisition of data. Oliveira, Grespan, Pinto.

Analysis and interpretation of data. Oliveira, Grespan, Pinto, Meurer, Cunha, Xavier.

REFERENCES

1. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2001;358:903–11.
2. Edwards JC, Cambridge G. Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:205–11.
3. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996;85:307–10.
4. Sekine T, Kato T, Masuko-Hongo K, Nakamura H, Yoshino S, Nishioka K, et al. Type II collagen is a target antigen of clonally expanded T cells in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999;58:446–50.
5. Holmdahl R. Rheumatoid arthritis viewed using a headache paradigm. *Arthritis Res* 2000;2:169–71.
6. Green PG. Gastrin-releasing peptide, substance P and cytokines in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:111–3.
7. 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.
8. Foey AD, Field S, Ahmed S, Jain A, Feldmann M, Brennan FM, et al. Impact of VIP and cAMP on the regulation of TNF- and IL-10 production: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2003;5:R317–28.
9. 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.
10. 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.
11. Tokita K, Katsuno T, Hocart SJ, Coy DH, Llinares M, Martinez J, et al. Molecular basis for selectivity of high affinity peptide antagonists for the gastrin-releasing peptide receptor. *J Biol Chem* 2001;276:36652–63.
12. Sunday ME, Kaplan LM, Motoyama E, Chin WW, Spindel ER. Gastrin-releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease. *Lab Invest* 1988;59:5–24.
13. 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.
14. Grimsholm O, Guo Y, Ny T, Forsgren S. Expression patterns of neurotrophins and neurotrophin receptors in articular chondrocytes and inflammatory infiltrates in knee joint arthritis. *Cells Tissues Organs* 2008;188:299–309.
15. Keeble JE, Brain SD. A role for substance P in arthritis? *Neurosci Lett* 2004;361:176–9.
16. McKillop JM, McCann JP, Gibbons JR, Johnston CF, Buchanan KD. Gastrin-releasing peptide in normal and neoplastic human lung: measurement and biochemical characterization. *Int J Cancer* 1990;46:591–61.
17. 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.
18. Pereira DV, Steckert AV, Mina F, Petronilho F, Roesler R, Schwartzmann G, et al. Effects of an antagonist of the gastrin-

- releasing peptide receptor in animal model of uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:5300–3.
19. Petronilho F, Araujo JH, Steckert AV, Rezin GT, Ferreira GK, Roesler R, et al. Effect of a gastrin-releasing peptide receptor antagonist and a proton pump inhibitor association in an animal model of gastritis. *Peptides* 2009;30:1460–5.
 20. Oliveira PG, Brenol CV, Edelweiss MI, Brenol JC, Petronilho F, Roesler R, et al. Effects of an antagonist of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Peptides* 2008;29:1726–31.
 21. Waksman BH. Immune regulation in adjuvant disease and other arthritis models: relevance to pathogenesis of chronic arthritis. *Scand J Immunol* 2002;56:12–34.
 22. Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 1977;20:841–50.
 23. Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR, Miller JF. Studies on antigen-induced arthritis in mice. II. Immunologic correlates of arthritis susceptibility in mice. *J Immunol* 1977;118: 1639–44.
 24. Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR. Studies on antigen-induced arthritis in mice. III. Cell and serum transfer experiments. *J Immunol* 1977;118:1645–8.
 25. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977;146: 857–68.
 26. Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 1980;283:666–8.
 27. Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med* 1998;76:275–88.
 28. Svensson L, Jirholt J, Holmdahl R, Jansson L. B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol* 1998;111:521–6.
 29. Corthay A, Johansson A, Vestberg M, Holmdahl R. Collagen-induced arthritis development requires T cells but not T cells: studies with T cell-deficient (TCR mutant) mice. *Int Immunol* 1999;11:1065–73.
 30. Szepshazi 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.
 31. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962;111:544–7.
 32. Cunha TM, Verri WA Jr, Vivancos GG, Moreira IF, Reis S, Parada CA, et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:401–7.
 33. Van de Loo FA, Joosten LA, van Lent PL, Arntz OJ, van den Berg WB. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction: effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:164–72.
 34. Tomita T, Kakiuchi Y, Tsao PS. THR921, a novel peroxisome proliferator-activated receptor agonist, reduces the severity of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R7.
 35. Flores DG, de Farias CB, Leites J, de Oliveira MS, Lima RC, Tamajusuku AS, et al. Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Curr Neurovasc Res* 2008;5: 99–105.
 36. Brenner M, Meng HC, Yarlett NC, Griffiths MM, Remmers EF, Wilder RL, et al. The non-major histocompatibility complex quantitative trait locus Cia10 contains a major arthritis gene and regulates disease severity, pannus formation, and joint damage. *Arthritis Rheum* 2005;52:322–32.
 37. Helen P, Panula P, Yang HY, Hervonen A, Rapoport SI. 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: 907–16.
 38. Lemaire S, Chouinard L, Mercier P, Day R. Bombesin-like immunoreactivity in bovine adrenal medulla. *Regul Pept* 1986;13: 133–46.
 39. Damin DC, Santos FS, Heck R, Rosito MA, Meurer L, Kliemann LM, et al. Effects of the gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 in a rat model of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2010;55: 2203–10.
 40. Mariette X. Emerging biological therapies in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2004;71:470–4.
 41. 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.
 42. Roberts LJ. New drugs for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004;351:2659–61.
 43. Irmiler IM, Gajda M, Brauer R. Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN- γ -deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response. *J Immunol* 2007;179:6228–36.

7. Conclusões

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

O RC-3095 foi capaz de melhorar a artrite experimental:

- Diminuindo a inflamação nos achados clínicos
- Atenuando o dano articular
- Diminuindo os níveis do tecido articular de IL-17, IL-1 β e TNF
- Diminuindo a linfoproliferação quando comparado com o grupo veículo do tratamento
- Aumentou a subpopulação de células T regulatórias, inibindo o desbalanço Treg *versus* Th17
- Diminuindo a expressão do receptor de GRP nos tecidos articulares.

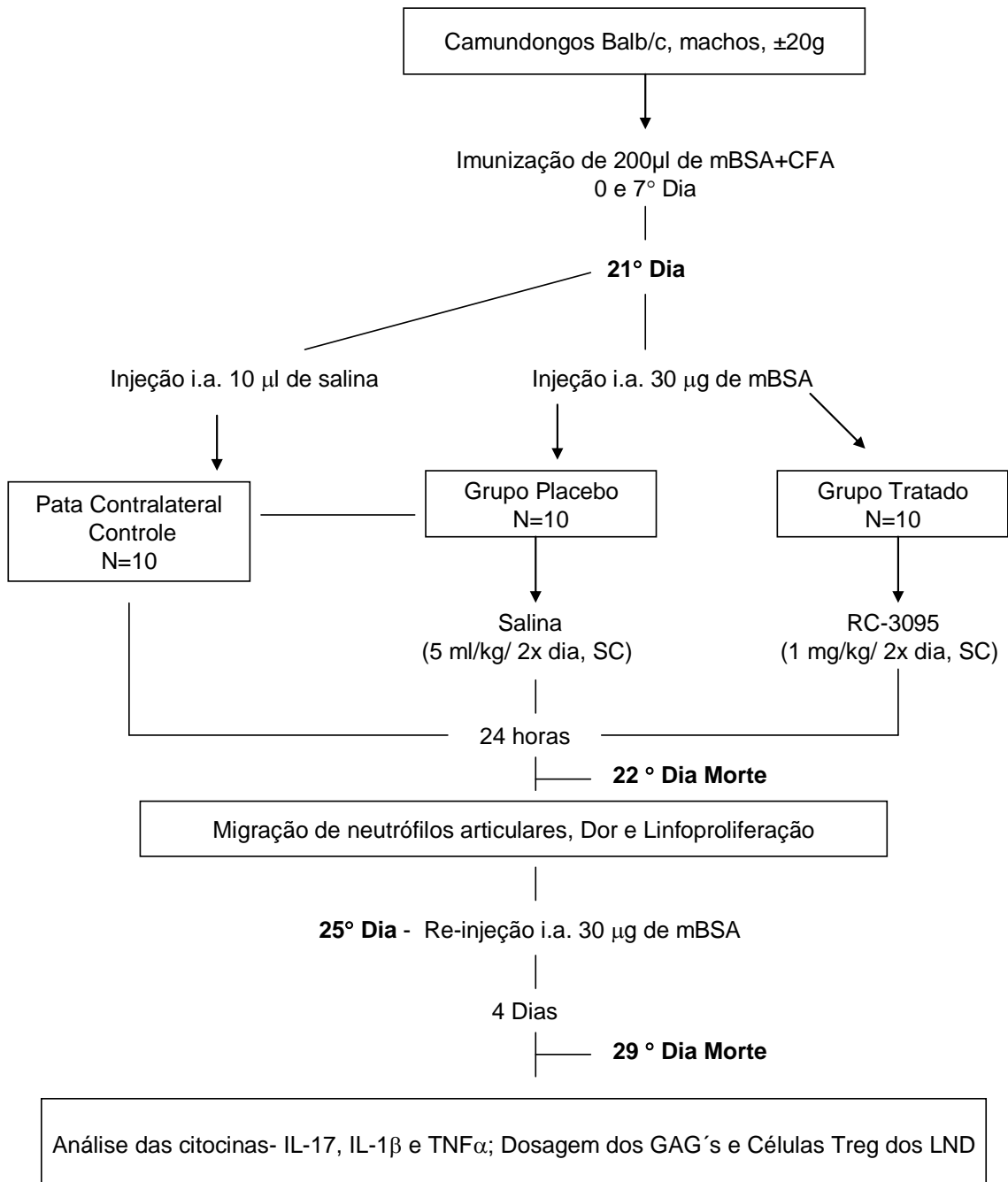
Como perspectivas futuras, esperamos testar o RC-3095 na clínica.

8. Anexos

8.1 ANEXO I – Fluxograma do Procedimento Experimental

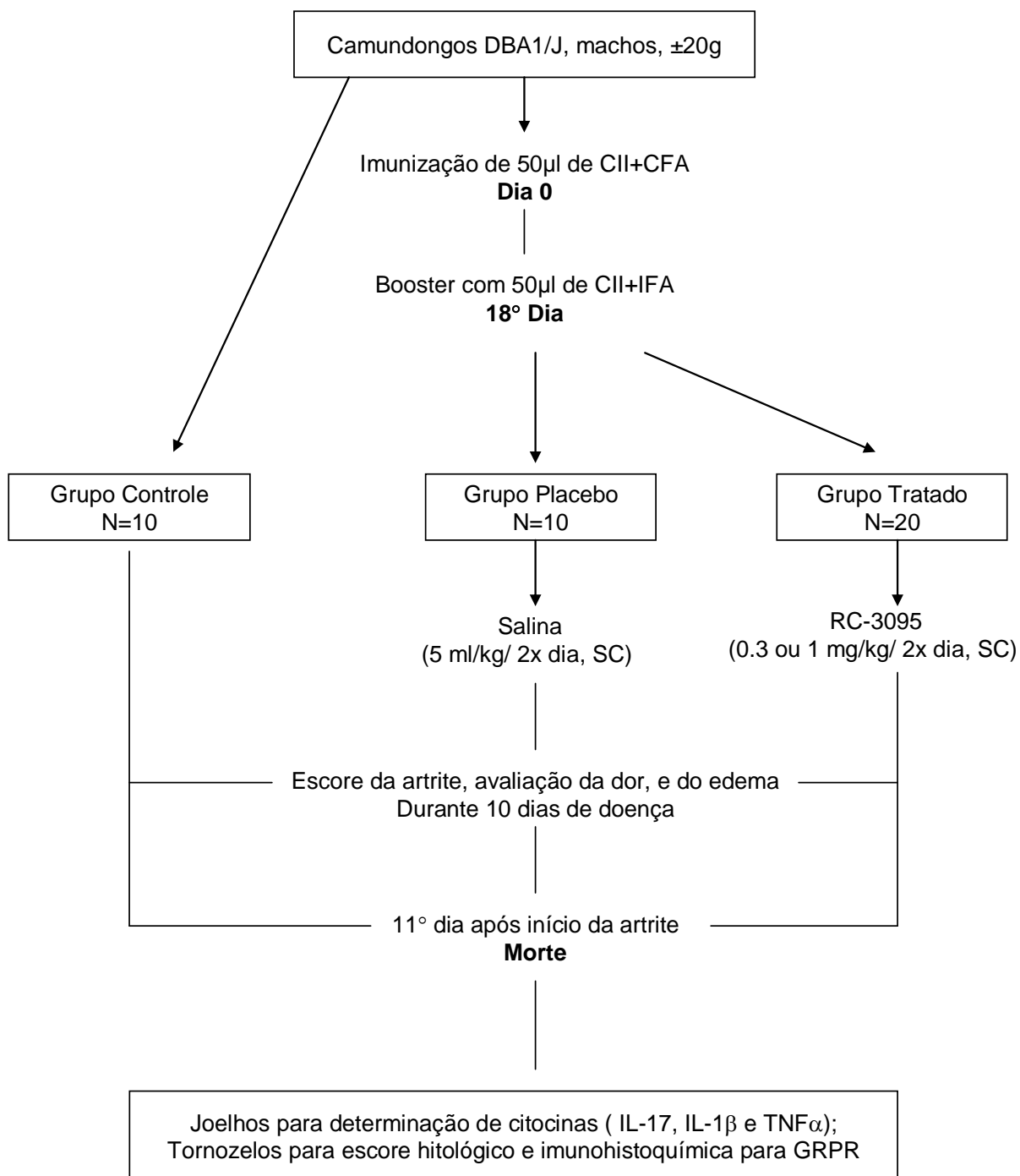
Fluxograma do Procedimento Experimental

Artrite Induzida por Antígeno



Fluxograma do Procedimento Experimental

Artrite Induzida por Colágeno tipo II



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

Histopatologia da Articulação – Protocolo de Interpretação

Código do animal: _____

Infiltrado Inflamatório 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

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)