



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÓLEO DA POLPA DE PEQUI *Caryocar coriaceum* Wittm NA ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS

Francisco Fábio Bezerra de Oliveira

Fortaleza – CE

2013

FRANCISCO FÁBIO BEZERRA DE OLIVEIRA

EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÓLEO DA POLPA DE PEQUI *Caryocar coriaceum* Wittm NA ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Lima Vale

Fortaleza – CE

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- O47e Oliveira, Francisco Fábio Bezerra de.
Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do óleo da polpa de pequi (*Caryocar coriaceum Wittm*)
na artrite induzida por zymosan em ratos / Francisco Fábio Bezerra de Oliveira. – 2013.
117 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de
Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2013.
Orientação: Profa. Dra. Mariana Lima Vale.
1. Artrite. 2. Nociceptividade. 3. Dor. I. Título.

CDD 616.722

FRANCISCO FÁBIO BEZERRA DE OLIVEIRA

EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÓLEO DA POLPA DE PEQUI *Caryocar coriaceum* Wittm NA ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em 16/08/2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mariana Lima Vale (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes
Universidade Regional do Cariri - URCA

Prof. Dr. Rondinelle Ribeiro Castro
Universidade Estadual do Ceará - UECE

**Aos meus pais, Francisco e Maria, pelo amor e
dedicação em todos os momentos.**

AGRADECIMENTOS

À Deus Soberano Pai e a Nossa Senhora, por estarem sempre presentes a cada momento de minha vida. Por sempre iluminarem meu caminho, por não terem me deixado fraquejar diante dos obstáculos encontrados durante essa caminhada e por terem me ajudado a superá-los.

À Professora Dra. Mariana Lima Vale, minha orientadora, pela oportunidade em ingressar na pós-graduação, por acreditar em mim e aceitar me orientar. Agradeço pelo tempo dedicado à orientação e correção do trabalho. Agradeço a você por me ensinar o caminho da pesquisa, pela paciência, atenção, dedicação e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao professor Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior, pela oportunidade em participar do VII Curso de Iniciação Científica em Fisiologia e Farmacologia, no qual tive a oportunidade de conhecer a Pós-graduação em Farmacologia da UFC e ter a certeza de que queria me tornar pesquisador. Obrigado pelo apoio e pela presteza na correção do trabalho.

Aos professores da Pós-graduação em Farmacologia, pelos ensinamentos compartilhados. Agradeço de forma especial a Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar pela disponibilidade, contribuições e correção do trabalho.

Ao professor Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, que gentilmente nos forneceu o óleo de pequi para que pudéssemos realizar a pesquisa. E ao Prof. Dr. Rondinelle Ribeiro Castro, pela correção da dissertação e pelas contribuições.

Aos meus pais, Francisco Costa de Oliveira e Maria Bezerra de Oliveira, pelos ensinamentos, dedicação e amor a mim conferidos. Obrigado por sempre acreditarem em mim e por permitirem a realização desse objetivo, e muito obrigado por serem pedra firme na minha vida.

Aos meus irmãos, Flavio, Flaviano e Fabiano, e a minha irmã, Suzana, pela dedicação e carinho em todos os momentos e por acreditarem sempre em mim. Vocês são importantes em minha vida.

Aos amigos e colegas da pós-graduação do LAFICA DE BAIXO, Ana Paula Fragoso, Ricardo Lima, Deysen Girão, Delane Gondim, Priscilla Fernanda e Álvaro Xavier. Obrigado pelo apoio, convivência e pela amizade, e em especial a Cecília Mendes, que esteve

comigo desde a preparação para a seleção do mestrado até a finalização da dissertação, sempre me dando força em todos os momentos.

Às alunas de iniciação científica, Joana Araújo e Anamaria Falcão, pela ajuda na realização dos experimentos, a participação de vocês foi essencial para realização da pesquisa.

Aos meus familiares, em especial a minha tia Maria Stela, pela acolhida em sua casa e em sua vida. Obrigado pelo incentivo e apoio durante esses anos. Agradeço também as minhas primas, Suzana Bezerra e Rosangela Bezerra, por sempre estarem dispostas a me ajudar, obrigado por todos os momentos compartilhados.

Aos primos Raphael Spinosa, Ruy e Rachel Bezerra, Kamila e Mayara Costa, Suely Bezerra, Vinicius e Pedro Barros, pelos laços de amizade construídos e pelo incentivo. E em especial, ao meu primo, parceiro e grande amigo Felipe Barros, obrigado pelas conversas, companheirismo e amizade a qual levarei para sempre comigo.

À Kamila Oliveira, pelo carinho, apoio, compreensão, paciência e disponibilidade. Obrigado por tudo.

Aos amigos/irmãos, Thiago Lima e José Rodrigo, pela força, incentivo e pelo encorajamento na busca da realização dos meus ideais. Obrigado pela amizade, cumplicidade e companheirismo de todas as horas.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, especialmente Aura Rhaes e Célia Gonzaga, pela disponibilidade constante em ajudar. Em especial a Vandinha pelo apoio na realização dos experimentos e pela disponibilidade em ajudar.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização desse trabalho, por tudo, muito OBRIGADO!

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Artrite é uma doença inflamatória que afeta as articulações sinoviais. Os sintomas mais comuns são o aumento da sensibilidade à dor nas articulações (hiperalgesia ou hipernocicepção) e edema. Uma alternativa para o tratamento da doença é a inclusão de plantas medicinais. O óleo extraído dos frutos do pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm), tem ampla aplicabilidade na medicina popular. Ensaios pré-clínicos demonstraram propriedades terapêuticas do óleo, tais como anti-inflamatória, gastroprotetora e cicatrizante. Com base neste contexto, o objetivo do presente estudo foi investigar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do óleo de pequi (OPCC) na artrite induzida por zymosan em ratos. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (nº 83/11). A artrite foi induzida por uma injeção intrarticular, no joelho direito, de zymosan (1mg/50µL) e foram avaliados a incapacitação articular (hipernocicepção), edema articular, migração de leucócitos, liberação de citocinas e expressão de mediadores inflamatórios. Os animais foram pré-tratados, por via oral, com OPCC (100, 200 e 400mg/kg) ou veículo durante 7 dias consecutivos ou em dose única, 45 minutos, antes da indução de artrite. Dexametasona, indometacina ou dipirona foram utilizadas como controles positivos. A incapacitação articular foi avaliada durante 4 horas após a injeção de zymosan. Em seguida os animais foram eutanasiados, procedendo-se a lavagem da cavidade articular com EDTA em PBS para avaliação de infiltração de leucócitos, atividade de mieloperoxidase e dosagem de citocinas. O tecido sinovial foi colhido para análise imunohistoquímica de TNF- α e COX-2. Também foram avaliados o edema (diâmetro transversal da articulação) e o aumento da permeabilidade vascular pelo método de extravasamento do Azul de Evans. O efeito antinociceptivo foi avaliado ainda através do teste de hiperalgesia mecânica plantar (*Von Frey* eletrônico) utilizando carragenina e PGE₂. Os resultados demonstraram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da incapacitação articular de todos os grupos tratados com OPCC durante 7 dias, no entanto com a dose única apenas as doses maiores foram eficazes. Em relação à migração de leucócitos para o líquido sinovial todos os grupos tratados com o OPCC (dose única e doses diárias) apresentaram significativa redução ($p < 0,05$) do número de leucócitos no lavado articular, acompanhada de uma diminuição ($p < 0,05$) na atividade da mieloperoxidase. Observou-se uma diminuição ($p < 0,05$) da liberação de citocinas (TNF- α e IL-1 β) no líquido sinovial, assim como expressão de TNF α e COX-2 no tecido sinovial. O edema foi inibido ($p < 0,05$) com o tratamento com OPCC em todas as doses administradas diariamente. Além disso, os grupos tratados com 100 e 400mg/kg de OPCC apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) da permeabilidade vascular. Os resultados mostraram ainda que a OPCC reduziu significativamente ($p < 0,05$) a hipernocicepção induzida pela carragenina e PGE₂. Os dados sugerem que o OPCC exibe efeito anti-inflamatório evidenciado pelo modelo de artrite induzida por zymosan em ratos, que pode ser associada com a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β). Aparentemente essa ação pode estar envolvida com a inibição da migração de neutrófilos. Sugerimos ainda que o OPCC previne o desenvolvimento da hipernocicepção inflamatória mecânica evocada por carragenina e PGE₂ (bloqueio direto da hipernocicepção) em ratos.

Palavras-chave: *Caryocar coriaceum* Wittm; Pequi; Dor; Artrite; Zymosan; Nocicepção.

ABSTRACT

Arthritis is an inflammatory disease that affects synovial joints. The most common symptoms are increased sensitivity to joint pain (hyperalgesia or hypernociception) and edema. An alternative to treating the disease is the inclusion of medicinal plants. The oil extracted from the fruits of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) has wide applicability in popular medicine. Pre-clinical tests have demonstrated the therapeutic properties of the oil, such as anti-inflammatory, gastroprotective and healing. Based on this background, the objective of this study was to investigate the antinociceptive and anti-inflammatory oil Pequi (OPCC) in zymosan-induced arthritis in rats. The study was approved by the Ethics Committee on Animal Research of the Federal University of Ceará (n° 83/11). Arthritis was induced by intraarticular injection in right knee of zymosan (1mg/50µL) and evaluated the articular incapacitation (hypernociception), joint swelling, leukocyte migration, cytokine release and expression of inflammatory mediators. The animals were pretreated orally with OPCC (100, 200 e 400mg/kg) or carrier for 7 consecutive days either as a single dose 45 minutes before the induction of arthritis. Dexamethasone, indomethacin or dipyron were used as positive controls. The articular incapacitation was assessed 4 hours after injection of zymosan. Then the animals were euthanized, proceeding to wash the joint cavity EDTA in PBS for evaluation of leukocyte infiltration, myeloperoxidase activity and cytokine. The tissue synovial fluid was harvested for immunohistochemical analysis of TNF- α and COX-2. We also evaluated edema (transverse diameter of the joint) and increased vascular permeability by the method of Evans blue extravasation. The antinociceptive effect was evaluated further by testing plant mechanical hyperalgesia (von Frey electronic). The results showed a significant decrease ($p < 0.05$) joint of disability in all groups treated with OPCC for 7 days, but with only a single dose, higher doses were effective. Compared to the migration of leukocytes into the synovial fluid all groups treated with the OPCC (single dose and daily doses) showed a significant reduction $p < 0.05$ in the number of leukocytes in the BAL joints, accompanied by a decrease ($p < 0.05$) in myeloperoxidase activity. There was a decrease ($p < 0.05$) cytokine release (TNF- α and IL-1 β) in the synovial fluid as well as expression of TNF and COX-2 in synovial tissue. The edema was inhibited ($p < 0.05$) treatment with all doses in OPCC. Moreover, the groups treated with 100 and 400mg/kg of OPCC showed a significant reduction ($p < 0.05$) in vascular permeability. The results also showed that the OPCC significantly reduced ($p < 0.05$) hypernociception and PGE2 induced by carrageenan. The data suggest that the OPCC exhibits anti-inflammatory effect evidenced by arthritis model in rats induced by zymosan, which can be associated with the inhibition of the production of proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β). Apparently this action may be involved in the inhibition of neutrophil migration. We also suggest that the OPCC hypernociception prevents the development of carrageenan-evoked inflammatory mechanical and PGE2 (direct blockade of hypernociception) in rats.

Keywords: *Caryocar coriaceum* Wittm. Pequi. Pain. Arthritis. Zymosan. Nociception.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Chapada do Araripe	38
Figura 2 - Pequi (<i>Caryocar coriaceum</i> Wittm).	40
Figura 3 - Aspecto das folhas, frutos e flor do <i>Caryocar coriaceum</i> Wittm.	41
Figura 4 - Exsicata do pequi (<i>Caryocar coriaceum</i> Wittm).	50
Figura 5 - Ilustração da artrite induzida por zymosan (teste de incapacitação articular em joelho de rato)	55
Figura 6 - Ilustração do teste de hipernocicepção mecânica plantar	61
Figura 7 - Efeito antinociceptivo do pré-tratamento com óleo de pequi (OPCC), em dose única, sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato	64
Figura 8 - Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a incapacitação articular da artrite induzida por zymosan em joelho de rato	66
Figura 9 - Efeito do pré-tratamento com óleo de pequi (OPCC), em dose única, sobre o influxo de leucócitos na artrite induzida por zymosan em joelho de rato	68
Figura 10 - Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a migração celular para a cavidade articular de ratos submetidos à artrite por zymosan	70
Figura 11 - Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre o a atividade de mieloperoxidase (MPO) na artrite induzida por zymosan em joelho de rato	72
Figura 12 - Efeito do pré-tratamento com óleo de pequi (OPCC), sobre o edema na artrite induzida por zymosan em joelho de rato	74
Figura 13 - Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a permeabilidade vascular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato	76
Figura 14 - Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a produção de citocinas na artrite induzida por zymosan em joelho de rato	78

Figura 15 - Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a reação de imunohistoquímica para TNF- α , em aumento de 100 e 400x	80
Figura 16 - Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a reação de imunohistoquímica para COX-2, em aumento de 100 e 400x	81
Figura 17 - Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a imunoexpressão de TNF- α e COX-2, em tecido sinovial de ratos submetidos a artrite induzida por zymosan	82
Figura 18 - Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a hipernocicepção mecânica plantar induzida por carragenina	84
Figura 19 - Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a hipernocicepção mecânica plantar induzida por PGE2	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ácidos graxos identificados no óleo da polpa do fruto do pequi	52
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
AIZy	Artrite Induzida por Zymosan
AMPc	Monofosfato Cíclico de Adenosina
ANOVA	Análise de Variância
AINEs	Anti-inflamatórios Não Esteróides
AR	Artrite Reumatóide
AP	Artrite Psoriática
ARe	Artrite Reativa
ATP	Trifosfato de Adenosina
BSA	Albumina de Soro Bovino
CA	Califónia
CAPES	Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
C5a	Componente complemento 5a
C3a	Componente complemento 3a
CFA	Completo Adjuvante de Freund
CCL-3	Quimiocina (padrão C-C) do ligando 3
CCL-2	Quimiocina (padrão C-C) do ligando 2
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
CG/EM	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
Cg	Carragenina
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CXCL1	Quimiocina (padrão C-X-C) ligante 1
CXCL2	Quimiocina (padrão C-X-C) ligando 2
COX	Cicloxygenase
DAB	Diaminobenzidina
DMARDs	Drogas Modificadoras da Doença
DL50	Dose Letal Mediana
Dexa	Dexametasona
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EPM	Erro Padrão da Média
ET-1	Endotelina 1

<i>et al</i>	E colaboradores
EA	Espondile Anquilosante
E.U.A	Estados Unidos da América
GM-CSF	Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos de Macrófagos
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogénio
IFN- γ	Interferon gama
i.a.	Intra-articular
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular 1
i.pl.	Intraplantar
IgG1	Imunoglobulina G1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-33	Interleucina 33
i.p.	Intraperitoneal
IA	Incapacitação Articular
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
kD	Kilodalton
kg	Quilograma
LAFICA	Laboratório de Fisiologia da Inflamação e do Câncer
LFA-1	Antígeno Associado à Função de Linfócitos 1
LTB ₄	Leucotrieno B4
LPS	Lipopolissacarídeo
LOX	Lipoxigenase
MPO	Mieloperoxidase
MMP	Metaloproteinase
NF- κ B	Factor Nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde

OPCC	Óleo de Pequi (<i>Caryocar coriaceum</i>)
p	Nível de significância
PAF	Fator de Agregação Plaquetária
PBS	Tampão Fosfato Salina
pg	Picograma
PGE2	Prostaglandina E2
PKA	Proteína Quinase A
PKC	Proteína Quinase C
RPM	Rotações por Minuto
s.c.	Subcutânea
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alpha
TNFR	Receptor do Fator de Necrose Tumoral
TSP	Tempo de Suspensão da Pata
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
URCA	Universidade Regional do Cariri
UMPO	Unidade de Mieloperoxidade
v.o.	Via Oral
VCAM-1	Proteína de Adesão da Célula Vascular 1
<	Menor que

SUMÁRIO

1 Introdução	19
1.1 Artrite	21
1.2 Inflamação	25
1.3 Nocicepção e Dor Inflamatória	28
1.4 Citocinas e Mediadores Inflamatórios	31
1.5 Artrite Induzida por Zymosan	33
1.6 Plantas Medicinais	34
1.7 <i>Caryocar coriaceum</i> Wittm.....	37
1.7.1 Descrição e Localização	37
1.7.2 Indicações Terapêuticas.....	42
1.7.3 Atividades Biológicas do <i>Caryocar coriaceum</i> Wittm	43
1.7.4 Composição do Óleo de Pequi	44
1.8 Justificativa.....	46
2 Objetivos	47
2.1 Objetivo Geral	48
2.2 Objetivos Específicos	48
3 Materiais e Métodos	49
3.1 Material Botânico	50
3.2 Obtenção do Óleo Fixo de Pequi (<i>Caryocar coriaceum</i> Wittm).....	51
3.3 Análise Química da Composição do Óleo de Pequi.....	51
3.4 Animais.....	52
3.5 Protocolos Experimentais	52

3.6 Indução da Artrite por Zymosan em Joelho de Rato	53
3.7 Análise da Incapacitação Articular (Hipernocicepção)	53
3.8 Coleta do Lavado Articular	55
3.9 Contagem Total de Leucócitos	56
3.10 Contagem Diferencial de Leucócitos	56
3.11 Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO)	56
3.12 Dosagem de Citocinas no Sobrenadante do Lavado Articular	57
3.13 Coleta do Tecido Sinovial de Joelho de Rato.....	57
3.14 Análise Imunohistoquímica para TNF- α e COX-2	58
3.15 Análise de Edema nas Articulações do Joelho	59
3.16 Permeabilidade Vascular por Extravasamento de Azul de Evans na Articulação	59
3.17 Teste de Hipernocicepção Mecânica Plantar.....	60
3.18 Análise Estatística	61
4 Resultados	60
Efeito antinociceptivo do pré-tratamento com OPCC, em dose única, sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato	63
Efeito do pré-tratamento com óleo de pequi (OPCC), em dose única, sobre o influxo de leucócitos na artrite induzida por zymosan em joelho de rato	67
Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre o influxo de leucócitos na artrite induzida por zymosan em joelho de rato	69
Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre o a atividade de mieloperoxidase na artrite induzida por zymosan em joelho de rato.....	71
Efeito do pré-tratamento com óleo de pequi (OPCC), em dose única, sobre o edema articular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato.....	72

Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre o edema na artrite induzida por zymosan em joelho de rato	73
Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a permeabilidade vascular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato	75
Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a liberação de citocinas na artrite induzida por zymosan em joelho de rato	77
Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a imunoexpressão de TNF- α e COX-2 em tecido sivoial	79
Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a hipernocicepção mecânica plantar induzida por carragenina	83
Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a hipernocicepção mecânica plantar induzida por PGE2	85
5 Discussão	87
6 Conclusão	99
Referências	101
Anexo	107

1. INTRODUÇÃO

Artrite é uma doença inflamatória que afeta as articulações sinoviais. Tem efeito social em termos de custo, incapacidade e perda de produtividade. Tem sido relatado que as citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α , a IL-1 β , e a IL-6 são importantes mediadores da perpetuação da doença. Além das convencionais estratégias de tratamento com anti-inflamatorios não esteroidais, drogas modificadoras da doença e glicocorticóides, novas drogas mais seguras estão continuamente sendo pesquisadas. Como o uso a longo prazo destas drogas resultou em desordens hepática e gastrointestinal, uma alternativa para o tratamento da doença é a inclusão de plantas medicinais (RATHORE *et al.*, 2007). Estas são utilizados para tratar uma vasta variedade de doenças clínicas. E não fugindo a essa regra as fórmulas à base de plantas, tem sido amplamente utilizado para o tratamento de artrite ao longo da história na China, Japão e outros países asiáticos (WANG *et al.*, 2013).

Esse trabalho mostra pela primeira vez o efeito, por via oral, do óleo de polpa de pequi *Caryocar coriaceum* Wittm (OPCC) em modelo de artrite experimental. O OPCC, extraído do fruto do pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm), é bastante utilizado na medicina popular para o tratamento de gripes e resfriados (FRANCO e BARROS, 2006), além de tratamento de reumatismo, úlceras externas, dores musculares e inflamações (AGRA *et al.*, 2007). Também é relatado seu uso como afrodisíaco, bem como em uso veterinário (FIGUEIREDO, MAIA e FIGUEIREDO, 1989). No entanto, poucos estudos disponíveis na literatura comprovam os efeitos atribuídos ao OPCC. Matos (2007) relata que a aplicação por vários anos e a comprovação popular da eficácia de um produto natural já demonstram sua relevância como um importante agente natural. No entanto, observa-se que os estudos acerca do possível potencial farmacológico do OPCC são incipientes, sendo encontrados na literatura, até o momento deste estudo, poucos relatos sobre seu potencial anti-inflamatório, eles referem-se ao efeito anti-inflamatório tópico (SARAIVA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2010), gastroprotetor (QUIRINO *et al.*, 2009), cicatrizante (QUIRINO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010; BATISTA *et al.*, 2010) e atividade antimicrobiana (COSTA *et al.*, 2011; SARAIVA *et al.*, 2011).

O uso e as observações de produtos naturais na medicina popular para o tratamento de doenças de caráter inflamatório sugere que essas substâncias possuem constituintes com princípios ativos importantes para o desenvolvimento de novos fármacos com ação anti-inflamatória e analgésica.

1.1 Artrite

Artrite inclui mais de 100 diferentes condições de doenças reumáticas e possuem como sintomas típicos a dor, que pode se tornar crônica, edema e rigidez nas articulações. É mais comum entre os adultos com 65 anos ou mais. As mulheres (24,3%) são mais afetadas do que os homens (18,7%) em todas as faixas etárias. Também é mais comum entre os adultos que são obesos do que aqueles que estão com peso normal ou abaixo do peso (*National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion*, 2013). Estima-se que 50 milhões de adultos norte-americanos possuem artrite. Com o envelhecimento da população, espera-se que o número de adultos com artrite aumente drasticamente para 67 milhões em 2030 (*National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion*, 2013).

As principais artropatias inflamatórias que são encontrados na prática clínica são artrite reumatoide, artrite psoriática, artrite reativa e espondilite anquilosante, além da artrite gotosa, que é uma doença bem descrita na literatura desde os tempos antigos. A apresentação clássica é o início súbito de sintomas como dor intensa, vermelhidão e inchaço sobre o hálux de pacientes de meia-idade. As três primeiras são mais comumente apresentadas como doença periférica afetando múltiplas articulações. A espondilite anquilosante, no entanto, geralmente afeta o esqueleto axial, com dores na região lombar, sendo a apresentação mais comum no início. Radiograficamente, todas essas patologias compartilham características como sinovite, erosão e perda uniforme da cartilagem articular, mas a distribuição e os achados radiológicos específicos ajudam a diferenciá-las (FLEMMING e BERNARD, 2013).

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória autoimune das articulações sinoviais que afeta cerca de 1% da população. Os sintomas incluem inchaço das articulações, vermelhidão e dor com deformidade articular progressiva em alguns casos, além da destruição do tecido sinovial e remodelação. A AR também apresenta manifestações extra-articulares, tais como vasculite, amiloidose, doença pulmonar e complicações cardíacas, que incluem entre outros, pericardite, miocardite, doença valvular, doença isquêmica cardíaca e insuficiência cardíaca. Pacientes com AR têm uma expectativa de vida reduzida, principalmente devido ao aumento da morbidade cardiovascular em comparação com a população em geral (MAVROGENI, *et al.*, 2013; ATHANASAKIS, PETRAKIS e KYRIOPOULOS, 2013). A AR é caracterizada por um aumento da infiltração de células imunes (incluindo neutrófilos, macrófagos, células T e B) na membrana sinovial, cavidade articular e tecidos periarticulares. Um dos sintomas mais prevalentes da AR é o aumento da

sensibilidade à dor articular (hiperalgesia), que provoca limitações nos movimentos (PINTO *et al.*, 2010).

Dentre as artropatias crônicas inflamatórias, a AR é a mais prevalente e a maior responsável por invalidez, seja temporária ou permanente. A AR tem etiologia ainda desconhecida. Embora se tenha avançado na compreensão da etiopatogenia dessa doença, muito dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos ainda estão por ser elucidados. Sabe-se que citocinas desempenham um papel importante na condução da ativação das células sinoviais que resulta em inflamação e destruição do osso condral durante a artrite. O tecido sinovial de pacientes com AR é caracterizado por infiltração de células mononucleares, proliferação e neovascularização da sinovia e fibroblastos (HAMILTON, 1983). Ocorre a formação de "pannus", um tecido localmente invasivo, que é uma característica importante da artrite na articulação. Este "pannus" é formado por células mononucleares e fibroblastos que se transforma em pannus fibroso formado de camada vascularizada (COURTENAY *et al.*, 1980).

A fisiopatologia da AR é complexa e parece ser iniciada quando o sistema imunitário adaptativo (celular ou humoral) reconhece antígenos, o que desencadeia uma série de mecanismos inflamatórios efetadores distintos, que incluem o recrutamento de leucócitos. A maioria destes mecanismos é mediada por uma série de citocinas e quimiocinas (SILVA-JUNIOR e ROCHA, 2006; PINTO *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2013).

Quanto às citocinas pró-inflamatórias envolvidas na inflamação e destruição tecidual na AR, destacam-se o TNF- α , IL-1 β e IL-6. Demonstrou-se que elas aumentam a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, favorecendo a migração de leucócitos para o local da inflamação. Ainda, contribuem para a neovascularização e induzem a síntese e liberação de metaloproteinases (MMP) por fibroblastos sinoviais e condrócitos articulares, levando à destruição da cartilagem através da degradação de proteoglicanos (DREXLER *et al.*, 2008). Estudos sugerem que a IL-17 é uma citocina pró-nociceptiva na artrite, que atua causando dor dependente de neutrófilos, liberação de citocinas (TNF- α , IL-1 β), ligantes de quimiocinas, MMP, endotelinas, prostaglandinas e aminas simpáticas (PINTO *et al.*, 2010). Estudos também sugerem que a IL-33 pode, em parte, contribuir para o patogênese da AR (XU *et al.*, 2013).

Drogas modificadoras da doença (DMARDs) representam a escolha para o tratamento da AR. Corticosteróides e AINES são também empregados, principalmente em curto prazo. Com base nos dados experimentais, foi proposto o uso de agentes bloqueadores especificamente do TNF como forma de tratamento na AR. Infliximab, adalimumab,

golimumab, pegol e etanercepte são antagonistas do TNF licenciados para RA. Infliximab, adalimumab, e golimumab são anticorpos monoclonais. Etanercept é um receptor solúvel de TNF (TNFR) compreendendo dois domínios extracelulares dos TNFR humano fundido com o fragmento da região constante da IgG1. Vale ressaltar que esses compostos têm sua resposta terapêutica fortemente influenciada pelo uso concomitante do metotrexato, uma vez que a sua eficácia como droga isolada é no máximo moderada, sendo semelhante à do metotrexato isolado. Embora estas drogas tradicionais juntamente com DMARDs, tais como sulfassalazina e leflunomida, têm ajudado a reduzir a incidência de manifestações extra-articulares graves e amiloidose, reduzir a inflamação e retardar o dano articular, eles não foram capazes de deter a progressão da destruição articular e reverter a deficiência, duas das principais marcas da AR que a distinguem de todas outras artrites crônicas (SALGADO *et al.*, 2013; SMOLEN, 2009; ATHANASAKIS, PETRAKIS e KYRIOPOULOS, 2013).

Como a AR é a mais prevalente e a maior responsável por invalidez, dentre as artropatias, ela torna-se um campo de investigação amplo para elucidação de sua fisiopatologia, que se encontra ainda obscura, bem como a investigação de mecanismos que possam prevenir ou reverter-la. Para isso, foram desenvolvidos modelos animais que se assemelham a AR em humanos. No entanto, a não existência de AR, em outras espécies como em humanos, não ocorre em outras espécies, representando uma dificuldade técnica no estudo da AR. Todavia, modelos animais foram desenvolvidos e empregados como ferramentas úteis na compreensão dos mecanismos de lesão em artrites. Alguns modelos experimentais foram padronizados e representam uma ferramenta importante na investigação de agentes biológicos na terapêutica da AR. A investigação da hiperalgesia (hipernocicepção) tem uma posição de destaque nesses modelos, tendo em vista que a dor é um dos principais motivos de incapacidade gerada pela AR (SILVA-JUNIOR e ROCHA, 2006). É amplamente aceito que hipernocicepção articular resulta principalmente, de efeitos direto e indireto de mediadores inflamatórios na sensibilização (aumento da excitabilidade) de fibras nociceptivas primárias que inervam as articulações inflamadas. As prostaglandinas e aminas simpáticas são os mediadores principais deste processo e a sua liberação é geralmente estimulada pela liberação de cascatas de citocinas (TNF- α , IL-1 β e quimiocinas) um processo que parece ser dependente de neutrófilos (CUNHA *et al.*, 2008). Além disso, outros mediadores, tais como a endotelina-1 (ET-1), atua direta ou indiretamente, também sensibilizando o neurônio nociceptivo primário (FERREIRA, ROMITELLI e NUCCI, 1989).

A espondilite anquilosante (EA) é uma doença reumática e suas manifestações clínicas incluem inflamação lombar e entesites, bem como o aumento da rigidez e perda de

mobilidade da coluna vertebral. A inflamação pode levar a uma completa anquilose da coluna vertebral, além de envolver estruturas extra-articulares, incluindo os olhos, sistema cardiovascular, os pulmões, a pleura, intestino, rim, próstata e sistema nervoso. A EA é caracterizada por inflamação do tecido acompanhada de danos estruturais e fibrose. Danos estruturais em EA são caracterizados por formação óssea excessiva, com sindesmofitos (saliências geralmente ósseas em um ligamento) como lesão típica. Drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (AINES) são a primeira linha de tratamento farmacológico. Ao contrário de artrite reumatóide (AR), os benefícios da terapia com inibidor de TNF e fármacos modificadores da doença, bem como injeções intra-articulares periféricas de glicocorticóides não foram demonstrada. A única terapia que mostrou efeito foram os fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais. (MACHADO, 2013; MACHADO *et al.*, 2013; HAROON *et al.*, 2013).

A artrite psoriática (AP) está incluída no grupo das espondiloartropatias. A artrite pode preceder o aparecimento de doença de pele em até 19% dos pacientes. A doença é frequentemente associada com o reparo ósseo, incluindo má formação óssea adjacente à interrupção cortical e reação periosteal (BHUTANI *et al.*, 2013; FLEMMING e BERNARD, 2013). As articulações envolvidas apresentam inchaço, vermelhidão, e deformidade, que são geralmente periféricas (principalmente articulações distais), articulações sacrílicas são menos afetadas. Embora a fisiopatologia da AP ainda não esteja totalmente elucidada, estudos indicam que os elementos característicos da AP incluem hipervascularização e aumento da infiltração de leucócitos polimorfonucleares que se assemelha a de espondiloartrite ao invés de AR (YAMAMOTO, 2013).

Artrite reativa (ARe) refere-se a uma infecção sistêmica, caracterizada por um envolvimento articular inflamatório predominantemente nos membros inferiores. Ocorre em pacientes geneticamente predispostos com uma infecção bacteriana localizada num órgão/sistema distante. Embora a ARe seja considerada uma artrite estéril, evidências acumuladas demonstraram que os produtos de degradação bacteriana e ainda DNA bacteriano estão presentes na membrana sinovial de pacientes com esta doença. Além disso, a detecção do antígeno bacteriano persistente no interior da articulação fortalece ainda mais a noção de um papel ativo dos microrganismos na patogênese deste grupo de doenças. A ARe pertence ao grupo das artrites conhecidas como espondiloartropatias. A síndrome clássica apresenta uma tríade de sintomas, incluindo a uretrite, conjuntivite e artrite, no entanto, a maioria dos pacientes não apresentam esta tríade clássica. ARe é um dos os tipos de artrite conhecida por afetar principalmente homens jovens, pois ela pode ser uma complicação de infecções

sexualmente transmissíveis. Embora a doença seja geralmente auto-limitante, os pacientes com ARe podem ter recaídas, desenvolver artrite crônica, espondilite, complicações cardíacas ou outras complicações (FLORES *et al.*, 2003; CARTER e HUDSON, 2009; KIM, KLAUSMEIER e ORR, 2009). Fármacos anti-inflamatórios não esteroidais são a terapia de escolha. Ensaios de antibioticoterapia de longo prazo em ARe têm mostrado pouca eficácia. Existem poucos dados sobre o uso de drogas modificadores da doença anti-reumáticas e terapia biológica molecular.

Artrite gotosa é uma doença inflamatória dolorosa caracterizada pela deposição de cristais de urato monossódico nas articulações, como resultado da hiperuricemia causada pela diminuição da excreção ou reabsorção renal de ácido úrico ou superprodução de urato (CURIEL e GUZMAN, 2012). A incidência e prevalência de gota variam muito entre as populações e pode estar aumentando ao longo do tempo devido ao aumento da longevidade, a mudança na dieta e estilo de vida moderno, e aumento do uso de certos medicamentos, como diuréticos. As taxas de prevalência de gota em homens variam de baixas frequências em países Africanos (0,03% em homens nigerianos), a cerca 1-2% nos países ocidentais, e alta frequências nas populações indígenas (15,2% em Aborígenes de Taiwan) (KLOOSTER, VONKEMAN e LAAR, 2012).

Vários modelos foram descritos com a finalidade de induzir artrite em animais tentando reproduzir achados clínicos da AR. Silva-Junior e Rocha (2006) descrevem que para um modelo animal ser considerado ideal de artrite, ele deveria preencher alguns requisitos, tais como: ter achados clínicos, radiológicos e histopatológicos semelhantes aos observados na AR; apresentar alterações mínimas de artrite não reumatoide; ser de fácil indução, baixo custo, boa reprodutibilidade, utilizando animal de fácil acesso; ter confiabilidade quanto ao início, incidência e avaliação da gravidade das alterações; responder a agentes terapêuticos de forma semelhante ao observado na AR humana; ter parâmetros de alterações imunológicas e de atividade mensuráveis. Mas nenhum dos modelos atualmente disponíveis satisfaz plenamente todas essas condições, embora, segundo o mesmo estudo, todos se aproximem razoavelmente do objetivo desejado. Um modelo bastante utilizado é o de artrite experimental induzida por zymosan em ratos, método utilizado para estudo do processo inflamatório.

1.2 Inflamação

A inflamação é considerada uma reação de defesa do organismo, que ocorre especialmente nos tecidos vascularizados, e é desencadeada como resposta a estímulos

lesivos. Microscopicamente, a reação inflamatória envolve uma série de fenômenos, que incluem: dilatação de arteríolas, capilares e vênulas, com aumento de permeabilidade vascular e fluxo sanguíneo; exsudação de plasma, incluindo proteínas; e migração de leucócitos para o foco inflamatório. A finalidade desse processo é remover o estímulo indutor da resposta e iniciar a recuperação tecidual local (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

Reações inflamatórias são caracterizadas por quatro sinais clássicos: calor, rubor, dor e edema, além de perda da função do órgão ou tecido lesado. Esses sinais surgem contra traumas, lesões térmicas, infecções, isquemia, reações imunológicas a agentes externos e processos autoimunes dos tecidos. Células inflamatórias, incluindo macrófagos, células polimorfonucleares e linfócitos, são recrutadas para o local da lesão, participando do processo inflamatório bem como o endotélio no sítio da lesão que também participa ativamente (KIM e DEUTSCHMAN, 2000; CHOI, CHA e JEON, 2012).

A resposta imediata (aguda) ocorre em curto prazo e geralmente resulta em cura. Envolve fenômenos vasculares e celulares que levam ao surgimento dos quatro sinais cardinais da inflamação. O aumento da permeabilidade causado pela inflamação permite o extravasamento de um líquido rico em proteínas para o interstício. Este fato gera o acúmulo de líquido no interstício promovendo edema (tumor). Além disso, ocorre vasodilatação a qual leva ao aumento do fluxo sanguíneo caracterizando o calor e o rubor. A resposta inflamatória aguda evolui a partir de uma fase vascular iniciada pelas células residentes no tecido imediatamente após o dano. Se a resposta inflamatória aguda falha para eliminar o agente patogênico, o processo inflamatório persiste e adquire novas características. O infiltrado de neutrófilos é substituído por macrófagos, e se o efeito destas células é ainda insuficiente, um estado inflamatório crônico se segue, causando a destruição do tecido. A fase crônica, em geral, é de longa duração e está associada em termos histológicos, à presença de linfócitos e de macrófagos e a proliferação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e tecido conjuntivo. Envolve ainda a formação de granulomas. (DRAYTON *et al.*, 2006).

A quimiotaxia trata da locomoção orientada ao longo de um gradiente químico. Existem quimiotaxinas endógenas e exógenas. As endógenas são os componentes do sistema complemento (C3a e C5a), ou metabólitos do ácido araquidônico (eicosanóides) e citocinas produzidas pelos macrófagos que agem nos leucócitos, sendo que as principais quimiotaxinas exógenas são os produtos bacterianos (KUMAR; FAUSTO e ABBAS, 2010).

As principais células efetoras da imunidade inata são: os macrófagos, mastócitos e neutrófilos. Os macrófagos pertencem ao sistema fagocítico mononuclear, que é um sistema composto por células que apresentam características morfológicas, imunológicas e funcionais semelhantes. São formados na medula óssea, a partir de uma linhagem de células fagocíticas mononucleares, que alcançam os tecidos através da corrente sanguínea. No tecido conjuntivo dos órgãos, estas células são chamadas de macrófagos residentes (LASKIN e PENDINO, 1995). Encontram-se em praticamente todos os tecidos e fluidos do organismo (VAN FURT, 1988). Os mastócitos são células derivadas de progenitores hematopoiéticos CD34⁺ na medula óssea e, em geral, não são encontrados na circulação. Os mastócitos maduros distribuem-se estrategicamente junto a vasos sanguíneos, nervos e sob o epitélio da pele e mucosas. São particularmente abundantes em áreas de contato com o meio ambiente e desempenham papel primordial nas reações inflamatórias agudas (ABBAS e LICHTMAN, 2012). Vários estudos histológicos têm relatado a presença de mastócitos na sinóvia normal humana e expansão dessa população na artrite reumatoide, gota e osteoartrose (NIGROVIC e LEE, 2007). Os neutrófilos são células provenientes das células-tronco pluripotentes, as quais dão origem às células brancas, células vermelhas e plaquetas circulantes na corrente sanguínea. Os neutrófilos são as principais células recrutadas para o sítio infeccioso, fagocitam microorganismo, células mortas e restos celulares. Eles saem do interior do leito capilar para o espaço extracelular. É um processo que envolve uma ação combinada de múltiplas moléculas de adesão celular. Estas moléculas são classificadas em três famílias: integrinas, imunoglobulinas e selectinas, que participam das interações entre leucócitos e células endoteliais (CRONSTEIN e WEISSMAN, 1993). A migração de neutrófilos envolve os seguintes passos: marginação, rolamento, adesão e diapedese (migração através do endotélio).

Os indutores da inflamação desencadeiam a produção de numerosos mediadores inflamatórios, que por sua vez alteraram a funcionalidade de muitos tecidos e órgãos. Muitos destes mediadores inflamatórios têm efeitos em comum na vasculatura e sobre o recrutamento de leucócitos. Esses mediadores podem ser derivados de proteínas do plasma ou secretada por células (MEDZHITOV, 2008). Alguns mediadores (tais como a histamina e serotonina) são pré-formados e armazenada nos grânulos de mastócitos, basófilos e plaquetas. Outros são pré-formados e circulam como precursores inativos no plasma. Outros mediadores são produzidos diretamente em resposta à estimulação adequada por indutores da inflamação. As células endoteliais ativadas podem expressar moléculas que promovem uma resposta através da

liberação de substâncias vasoativas (PGI_2) e quimioatrativas. As substâncias quimioatrativas podem ser produtos bacterianos, ou podem ainda ser liberados dos leucócitos, como por exemplo, leucotrieno B_4 (LTB_4), fator ativador de plaquetas (PAF), as quimiocinas IL-8; as proteínas inflamatórias específica de monócitos (CCL-3 e CXCL2); a proteína quimioatrativa de monócito CCL2.

1.3 Nociceção e Dor Inflamatória

A diferenciação entre nociceção e dor deve ser considerada quando se utilizam modelos animais nos estudos pré-clínicos. A Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain - IASP*) define nociceção como processos neurais de codificação e processamento de estímulos nocivos enquanto que a dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial (BARROT, 2012). A nociceção inclui mecanismos pelos quais estímulos nocivos são detectados e codificados pelo sistema nervoso periférico. A detecção pode ser assegurada por transdutores moleculares específicos suportados pelos neurônios nociceptivos cujos corpos celulares são agrupados nos gânglios da raiz dorsal ou trigeminal e são retransmitidas via nervos do trato espinotalâmico e trigeminal. Este sinal é depois transmitido por complexas redes aferentes dentro do corno dorsal da medula espinal ou seu equivalente no tronco cerebral. Estes nervos então transmitem informações ao cérebro para o processamento e interpretação do estímulo (WEBER, 2012; TODD, 2010). Nociceptores são as primeiras unidades de uma série de neurônios relacionados com dor. As terminações nervosas livres são nociceptores periféricos, mielinizadas (fibras A) ou não mielinizadas (fibras C) (ZHU e LU, 2010). Geralmente, as fibras $\text{A}\delta$ possuem um diâmetro médio de 2-6 μm , com uma velocidade de condução de 12-30 ms^{-1} . Em comparação, as fibras C que tem um diâmetro pequeno, medindo cerca de 0,4-1,2 μm , e sua velocidade de condução gira em torno de 0,5-2 ms^{-1} (HARPER e LAWSON, 1985; MILLAN, 1999). A velocidade de condução está diretamente relacionada ao diâmetro da fibra. Levando em consideração o parâmetro de velocidade de condução das fibras $\text{A}\delta$ e C, as primeiras são ditas de condutibilidade rápida e as segundas de condutibilidade lenta em respostas a estímulos nocivos (JULIUS e BASBAUM, 2001). De acordo com a resposta a diferentes estímulos, os nociceptores podem ser classificados como mecanorreceptores de alto limiar, quimiorreceptores, receptores sensíveis à temperatura

(calor/frio), nociceptores polimodais e nociceptores silenciosos (LEEM, WILLIS e CHUNG, 1993; ZHU e LU, 2010).

Todas as funções essenciais dos nociceptores dependem de canais iônicos (CATERINA *et al.*, 1999; MCCLESKEY e GOLD, 1999), que são proteínas localizadas na membrana da célula que seletivamente medeiam o transporte transmembranar de íons específicos, ou moléculas. Os canais iônicos são canais ativados por calor (CESARE e MCNAUGHTON 1996; NAGY e RANG, 1999a, b); ou dependentes de capsaicina (NAGY e RANG, 1999a, b); ou de trifosfato de adenosina (ATP-dependentes) (BURNSTOCK 1996; BURNSTOCK e WOOD, 1996; HILLIGES *et al.*, 2002); canais voltagem-dependentes de Na⁺ (WAXMAN *et al.*, 1999) entre outros. Quando um estímulo nocivo é aplicado a um nociceptor, o íon correspondente abre os canais o que induz uma corrente transmembranar e aumento da voltagem da membrana. Quando a tensão da membrana aumenta para o limiar, canais de sódio específicos são abertos, de modo a gerar um *feedback* positivo resultando na despolarização da membrana, gerando eventualmente um potencial de ação (ZHU e LU, 2010).

A sinalização nociceptiva é crucial para evitar danos ao corpo e para a sobrevivência. No entanto, sob circunstâncias fisiopatológicas, esta sinalização pode começar a deturpar a estimulação sensorial, causando respostas que não é mais benéfica para o organismo. Esta deturpação pode ser parcial, neste caso, a estimulação dos terminais sensoriais periféricos provocam respostas distorcidas ou exageradas causando respostas nociceptivas a estímulos que antes normalmente não eram nocivos (alodinia), ou diminuindo o limiar nociceptivo da membrana do nociceptor, fazendo com que estímulos que normalmente precisariam ser maiores, causem respostas nociceptivas (hipernocicepção). Pode haver casos em que a atividade dos nervos periféricos pode se tornar totalmente dissociada da estimulação sensorial, e neste caso, nociceptores periféricos começam a disparar potenciais de ação sem qualquer estímulo externo, causando resposta nociceptiva "espontânea". Tanto hipernocicepção/alodinia e resposta nociceptiva espontânea podem se desenvolver sob certas condições fisiopatológicas, tais como a inflamação, que pode persistir por meses ou anos, como por exemplo, na artrite (LINLEY *et al.*, 2010).

Como uma das sensações mais importantes, a dor tem sido estudada extensivamente. Conforme a etiologia, a dor pode ser classificada como: dor nociceptiva, que envolve a ativação ou sensibilização de nociceptores periféricos; dor inflamatória, onde

células inflamatórias ou de um tumor liberam mediadores químicos que ativam ou modificam as propriedades de resposta de estímulo de nociceptores aferentes; e dor neuropática, que resulta da lesão ou anormalidades adquiridas de estruturas neurais periféricas ou centrais (ZHU e LU, 2010). A via fisiológica da dor pode ser descrita em quatro processos. O primeiro é a transdução, quando um estímulo é aplicado ao tecido, os nociceptores que estão localizados nessa região desencadeiam potenciais de ação através da conversão da energia a partir de um estímulo nocivo; o segundo envolve o envio de sinais que são posteriormente transmitidos na forma de potenciais de ação de fibras nervosas através do sítio da transdução (periferia), para o gânglio da raiz dorsal, que então ativa o interneurônio; o terceiro processo envolve a percepção, onde a valorização dos sinais chegam em áreas específicas do córtex cerebral, e o quarto processo envolve a modulação, onde estímulos inibitórios descendentes facilitam a entrada no tronco cerebral e modula a transmissão nociceptiva da medula espinal (ZHU e LU, 2010).

Apesar de nocicepção e dor aparecerem intimamente ligados, a clínica também mostrou evidências de que elas podem ser dissociadas uma da outra. Em pacientes, a dor é avaliada e quantificada por expressão verbal, o que não é possível em roedores. Assim, o que é comumente referido como "testes de dor" em animais são, na verdade testes nociceptivos, e a medida pré-clínica de dor em si continua sendo um desafio para os pesquisadores. Quando pertinente nocicepção e dor são fundamentais para sobrevivência (LE BARS, GOZARIU e CADDEN, 2001). Elas oferecem um sistema de alarme que tem a capacidade de iniciar uma resposta imediata, que pode evoluir para uma melhor adaptação as respostas através de aprendizagem associativa emocional (BARROT, 2012).

A hiperalgesia é detectada em modelos experimentais como uma diminuição do limiar nociceptivo, assim chamada de hipernocicepção. Nas últimas décadas desenvolveu-se modelos experimentais para investigação de hipernocicepção inflamatória em ratos, bem como a utilização de agentes como o zymosan, formalina, capsaicina, carragenina, e Adjuvante Complementar de Freund (*Complete Freund's Adjuvant* - CFA) entre outros, têm sido amplamente utilizados para investigar os mecanismos subjacentes da dor inflamatória. (ZHOU *et al.*, 2012). A hipernocicepção induzida permite relacionar a quantificação direta do fenômeno inflamatório com hipernocicepção (GUERRERO *et al.*, 2013). Tendo em vista que a dor inflamatória resulta do aumento da excitabilidade das fibras sensoriais nociceptivas periféricas produzido pela ação de mediadores inflamatórios, esses modelos ganham destaque no meio científico, pois reproduzem os efeitos que se assemelham aos encontrados na clínica.

A dor de origem inflamatória resulta essencialmente da sensibilização dos neurônios sensoriais primários (FERREIRA, 1972). Existe crescente evidência de que, além da sensibilização periférica, a dor inflamatória pode ser dependente de um processo que ocorre na medula espinal, assim como no gânglio da raiz dorsal e gânglio trigeminal. Na medula espinal, a plasticidade neuronal é modulada dinamicamente pela microglia ativada e mediadores derivados de astrócitos, o que pode aumentar a capacidade de resposta a dor (SOUZA *et al.*, 2013). Os mecanismos envolvidos na sensibilização dos neurônios sensoriais primários podem ser divididos em dois processos. O primeiro processo inclui eventos não neuronais residentes que recrutam células imunes, as quais produzem uma sequência de mediadores da hipernocicepção inflamatória iniciados pelo fator de necrose tumoral alpha (TNF- α). Isso provoca a liberação de interleucina-1 beta (IL-1 β) e quimiocinas que por sua vez estimulam a liberação direta de mediadores que atuam no nociceptor (VALÉRIO *et al.*, 2009). O segundo processo inclui ativação das vias de sinalização intracelular, tais como o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), proteína quinase A (PKA) e proteína quinase C (PKC) (ALEY e LEVINE, 1999; KHASAR *et al.*, 1999). Estas vias de sinalização resultam em fosforilação subsequente dos canais de sódio dependentes de voltagem (GOLD, LEVINE e CORREA, 1998) e inibição dos canais de potássio dependentes da voltagem (EVANS, VASKO e NICOL, 1999). Consequentemente, o limiar nociceptivo é reduzido, o que finalmente leva a um aumento da excitabilidade neuronal (CUNHA TM *et al.*, 2008b; ZARPELON *et al.*, 2013).

1.4 Citocinas e Mediadores Inflamatórios

As citocinas constituem um elo entre as lesões celulares ou reconhecimento imunológico e os sinais locais ou sistêmicos de inflamação (BLACKWELL e CHRISTMAN, 1996; DINARELLO, 1984; HOPKINS, 2003). Elas são definidas como polipeptídios produzidos e liberados pelas células em resposta a uma variedade de estímulos inflamatórios tais como vírus, parasitas, bactérias e seus produtos, ou em resposta a outras citocinas. Em geral, elas são liberadas numa sequência controlada a partir de vários tipos de células e são responsáveis pela produção dos mediadores finais envolvidos na indução de sinais e sintomas inflamatórios. Elas são transitoriamente produzidas, e, geralmente, tem uma meia-vida curta. Estruturalmente, as citocinas possuem pesos moleculares baixos, entre 5 e 140 kD. Algumas delas são glicoproteínas, sintetizadas geralmente quando moléculas precursoras de grandes

dimensões são clivados para produzir a forma ativa. Além disso, as citocinas podem atuar sobre os receptores das mesmas células que a produzem (efeito autócrino) ou nos receptores de outras células (efeito parácrino), e até mesmo circular e agir em tecidos distantes (efeito hormonal) (VERRI *et al.*, 2006). Citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-1 β são os mediadores pró-inflamatórios primários. Estas citocinas iniciam a elaboração e liberação de outras citocinas. O TNF- α e IL-1 β têm efeitos semelhantes, apesar de agirem em diferentes receptores e diferentes vias de sinalização intracelular. O TNF- α é sintetizado principalmente por macrófagos, e é expresso como uma proteína de membrana de 17 kD, a partir da qual uma proteína de 26 kD de TNF é clivada pela TNF-convertease, uma metaloproteinase. Em modelos animais, a administração intravenosa de doses elevadas de TNF- α causa hipotensão, taquicardia, taquipnéia, acidose láctica, hemoconcentração, hipercalemia e hiperglicemia, seguido por hipoglicemia (TRACEY *et al.*, 1984). Em humanos, doses baixas de TNF- α provoca alguns sinais e sintomas de sepse, incluindo hipotensão, febre, fadiga e anorexia (CHAPMAN *et al.*, 1987). O TNF- α também aumenta a adesão de leucócitos, às células endoteliais, estimula secreção de quimiocina, e induz a ativação dos neutrófilos. IL-1 β provoca muitos dos mesmos efeitos do TNF- α quando é infundido nos seres humanos, já o bloqueio de IL-1 β e TNF- α atenua a inflamação (DINARELLO, 1997). A IL-6, outra citocina pró-inflamatória é secretada por monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e B, células endoteliais, células de músculo liso e fibroblastos. A IL-6 está envolvida na ativação de células B e T, na estimulação de células-tronco hematopoiéticas e provavelmente o mais importante *in vivo*, a indução da fase aguda da inflamação. Sua liberação é estimulada por TNF- α , IL-1 β , lipopolissacarídeo (LPS), fator de crescimento derivado de plaquetas, interferon- γ , granulócito/macrófago, fator estimulador de colônias, prostaglandina E (PGE2) e bradicinina. Em respostas inflamatória, infecciosa ou auto-imune, a elevação dos níveis séricos de IL-6 é mais consistente do que a elevação de TNF- α ou IL-1 β (DINARELLO, 1997). A IL-8 pertence a um grupo de mediadores conhecido como quimiocinas por causa da sua capacidade de recrutamento de células inflamatórias para os locais de lesão. A IL-8 é sintetizada por monócitos, macrófagos, neutrófilos e células endoteliais (PARTRICK *et al.*, 1996). IL-4 e IL-10 são as citocinas anti-inflamatórias humanas, e exercem efeitos semelhantes. Em células alvo *in vitro* e *in vivo*, a IL-4 e IL-10 inibem a síntese de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e fatores estimuladores de colônias. A IL-10 é importante para proteger o hospedeiro contra infecção e é sintetizada por células dendríticas, macrófagos, mastócitos, células *natural killer*, eosinófilos, neutrófilos, células B, células T CD8C e TH1, TH2, e células T CD4C e TH17 (KIM e DEUTSCHMAN, 2000; NG *et al.*, 2013).

Os mediadores envolvidos na origem da dor inflamatória também desempenham um papel fundamental no desencadeamento de outros eventos inflamatórios, incluindo edema e migração de leucócitos. As prostaglandinas podem ser cruciais para a formação de edema, e citocinas podem ser relevantes para o recrutamento de leucócitos em vários modelos de inflamação (CUNHA FQ *et al.*, 1992; FERREIRA, 1972; GRANSTEIN *et al.*, 1986; WANKOWICZ, MEGYERI e ISSEKUTZ, 1988; WHITE, BHANGOO e MILLER, 2005). Há evidências de que estes eventos podem ocorrer independentemente um do outro. A migração de leucócitos pode ser essencial para o aumento da permeabilidade da parede dos vasos, formação de exsudato e indução da dor por certos estímulos inflamatórios (FERREIRA, 1972; CANETTI *et al.*, 2001; BOMBINI *et al.*, 2004; FORD-HUTCHINSON *et al.*, 1984). Demonstrou-se que hipernocicepção mediada por estímulos inflamatórios como leucotrienos (LT), e fator de complemento 5 (C5a) depende da migração de neutrófilos (LEVINE *et al.*, 1984; LEVINE *et al.*, 1985). Considerando que os neutrófilos ativados produzem e liberam citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β , e CINC-1, e que estas são essenciais para o desenvolvimento de doenças inflamatórias e hipernocicepção, é aceitável que se sugira que os neutrófilos podem ser uma importante fonte de citocinas hipernociceptivas ou, alternativamente, de mediadores hipernociceptivos de ação direta, como PGs (CUNHA TM *et al.*, 2005; CUNHA TM *et al.*, 2008b).

1.5 Artrite Induzida por Zymosan

Zymosan é um polissacarídeo proveniente da parede do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, uma substância capaz de ativar macrófagos e induzir a liberação de mediadores inflamatórios, largamente empregada em estudos farmacológicos. O zymosan tem sido bastante empregado em estudos de indução ao choque não séptico, por seus efeitos sistêmicos importantes, quando inoculado por via parenteral ou via peritoneal, diferentemente do tipo de reação inflamatória induzida no ambiente intra-articular. Também a propriedade de induzir inflamação quando injetado na articulação de ratos, camundongos e coelhos, com subaguda e persistente proliferação da sinóvia e degradação da cartilagem, reproduzindo a maioria dos achados da artrite reumatoide (KEYSTONE *et al.*, 1977; GADÓ e GLIGER, 1991; GEGOUT *et al.*, 1995; ROCHA *et al.*, 1999).

O zymosan é reconhecido por macrófagos a partir do receptor dectina-1, tais receptores são expressos predominantemente em monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e uma menor população de células T do baço (WILLMENT, 2003). Após o

reconhecimento do zymosan por macrófagos, este polissacarídeo interage com o receptor toll-like (TLR2), presente na superfície das células. Em seguida ocorre ativação do fator NF- κ B, produção de citocinas inflamatórias, bem como a expressão de moléculas co-estimulatórias (TAYLON *et al.*, 2002).

Estudos demonstraram que o zymosan, administrado por via intra-articular em ratos, induz periartrite com um pico de hipernocicepção entre a 3ª e 4ª horas, com aumento significativo na permeabilidade vascular a partir da 3ª hora levando ao edema local. Já na 3ª hora após o zymosan há um influxo celular significativo que é máximo na 6ª hora. Como resultado da artrite induzida por zymosan ocorre alteração da marcha dos animais, que foi designada de incapacitação articular (IA). Após a injeção do zymosan, os animais desenvolvem progressiva IA que se inicia na segunda hora e é máxima entre a 3ª e 4ª horas de inflamação (ROCHA *et al.*, 1999; ROCHA *et al.*, 2004). A fase aguda da artrite induzida por zymosan é caracterizada por aumento da permeabilidade vascular, edema e influxo celular inflamatório para a cavidade articular. Na fase crônica da artrite induzida por zymosan, ocorre degradação da cartilagem articular e do osso subcondral (GEGOUT *et al.*, 1994). Além de produzir reação inflamatória intensa, caracterizada por extensa sinovite, com migração de células inflamatórias de fase aguda e cronificação com proliferação linfomonocitária (GEGOUT *et al.*, 1994; ROCHA *et al.*, 1999), a artrite induzida por zymosan também produz hipernocicepção (ROCHA *et al.*, 1999).

1.6 Plantas Medicinais

O uso de produtos naturais iniciou-se há milhares de anos por populações de vários países com o intuito de tratar diversas patologias. Embora algumas das propriedades terapêuticas atribuídas às plantas têm provado serem erradas, tendo em vista que a terapia com plantas baseia-se apenas nos resultados empíricos de centenas e milhares de anos e não apresentando evidências científicas que comprovem suas propriedades terapêuticas (GURIB-FAKIM, 2006).

As plantas medicinais têm um importante papel na saúde mundial. Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, elas continuam sendo muito utilizadas (SOUSA *et al.*, 2008). Plantas formaram a base de sofisticados sistemas da medicina tradicional e ainda continua fornecendo a humanidade novos fármacos. Os primeiros registros sobre o uso plantas medicinais são datados de cerca de 2.900 aC e foram escritos em tábuas de argila em escrita cuneiforme na Mesopotâmia. O documento trata sobre o uso de

aproximadamente mil substâncias derivadas de plantas. Dentre elas, estão os óleos de espécies de *Cedrus* (cedro) e *Cupressus sempervirens* (cipreste-italiano), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), espécies de *Commiphora* (mirra) e *Papaver somniferum* (sumo de papoula), os quais ainda hoje são usados para o tratamento de doenças que vão desde tosse e constipações, infecções parasitárias e inflamação (GURIB-FAKIM, 2006; CRAGG e NEWMAN, 2013). A Medicina egípcia data de cerca de 2.900 aC, mas o registro mais conhecido é o "Papiro de Ebers" que data de 1.500 aC, documentando mais de 700 drogas, principalmente de origem vegetal. A Medicina chinesa tem sido extensivamente documentada ao longo dos séculos, sendo o primeiro registro datado de cerca de 1.100 aC, e ao longo da história vários estudos documentaram centenas de substâncias ativas derivadas de plantas (CRAGG e NEWMAN, 2013).

Cerca de 25% a 50% de todos os fármacos avaliados como agentes terapêuticos em uso clínico em todo o mundo são derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005; GURIB-FAKIM, 2006; SOUSA *et al.*, 2008). A medicina tradicional é usada em todas as partes do mundo e tem uma grande importância econômica, principalmente pelo uso de plantas medicinais que têm uma posição respeitável, especialmente em países em desenvolvimento onde o serviço de saúde moderno é limitado e representa um tratamento pouco acessível (AGRA, FREITAS e BARBOSA FILHO, 2007). Fato confirmado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que de acordo com o relato de Dezembro de 2008, estima que 65% da população mundial incorporam o uso de plantas da medicina tradicional aos cuidados médicos e que 80% da população de alguns países da Ásia e África dependem da medicina tradicional como parte dos cuidados de saúde primários, devido ao desenvolvimento econômico e restrições geográficas (KADIR, YAAKOB e ZULKIFLI, 2012). Cerca de metade das espécies de plantas do mundo vivem nas florestas tropicais e representam um vasto reservatório de espécies com potencial para o desenvolvimento de fármacos. Elas fornecem compostos químicos de produtos naturais com inestimável potencial para o desenvolvimento de novos fármacos. O potencial para encontrar mais compostos é enorme quanto apenas cerca de 1% das espécies tropicais têm sido estudadas quanto à seu potencial farmacêutico (GURIB-FAKIM, 2006).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais prescritos, com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa maneira, usuários de plantas medicinais do mundo

inteiro mantêm viva essa prática, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos e que, de maneira direta, a cultura popular do uso de plantas medicinais desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como a Botânica e a Farmacologia (VEIGA JUNIOR, PINTO e MACIEL, 2005). Segundo Brandão e colaboradores (2009) os países latino-americanos são ricos em espécies medicinais devido à diversidade vegetal vasta e rica tradição da utilização de vegetais praticada por esses povos durante séculos. No Brasil, no entanto, a mistura intensa de culturas conduziu a uma introdução de espécies nativas de outros continentes. A cultura indígena foi a responsável pela disseminação do uso de plantas medicinais no país, pois, este é rico em sua biodiversidade, cujo território possui cinco principais biomas: floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e savana; figurando como uma rica fonte de produtos terapêuticos (SOUSA *et al.*, 2008). Especificamente no Nordeste do Brasil, a diversidade de espécies, aliada à precária assistência à saúde de grande parte da população, torna o uso de plantas medicinais uma prática cada vez mais comum para o tratamento de várias enfermidades. As substâncias biologicamente ativas, presentes nos extratos ou óleos de diferentes partes dessas plantas, são retiradas através de chás e utilizadas na medicina popular contra os mais diversos males (MAIA, 2007). Agra e colaboradores (2008) realizaram um levantamento das plantas medicinais usadas na região Nordeste do Brasil, onde foi obtido um total de 650 espécies e 407 gêneros pertencentes a 111 famílias. Destes, cerca de 126 espécies, referidas por seus usos medicinais, são exóticas e cultivadas na região. No entanto, concluiu-se que a maioria das espécies relatadas não tem sido estudada em relação aos seus constituintes químicos e/ou atividades biológicas. É ressaltada, a importância de se investigar essas espécies que não tem sido objeto de estudos farmacológicos e químicos, embora sua utilização popular tenha sido relatada. A procura de medicamentos à base de plantas é crescente à medida que são geralmente considerados seguros, não tóxicos e menos prejudiciais do que os fármacos sintéticos.

Diversas misturas de ervas têm sido testadas em ensaios clínicos com resultados positivos para pacientes com AR. Destas preparações, apenas um estudo (ERNST, 1999), foi submetido a ensaios clínicos replicados independentemente. A totalidade desta evidência mostra um efeito positivo sobre a dor da AR (ERNST, 2008). Produtos derivados de plantas ainda são uma parte importante do tradicional sistema de saúde nos países em desenvolvimento. Nos últimos anos tem-se havido um ressurgimento de interesse em plantas

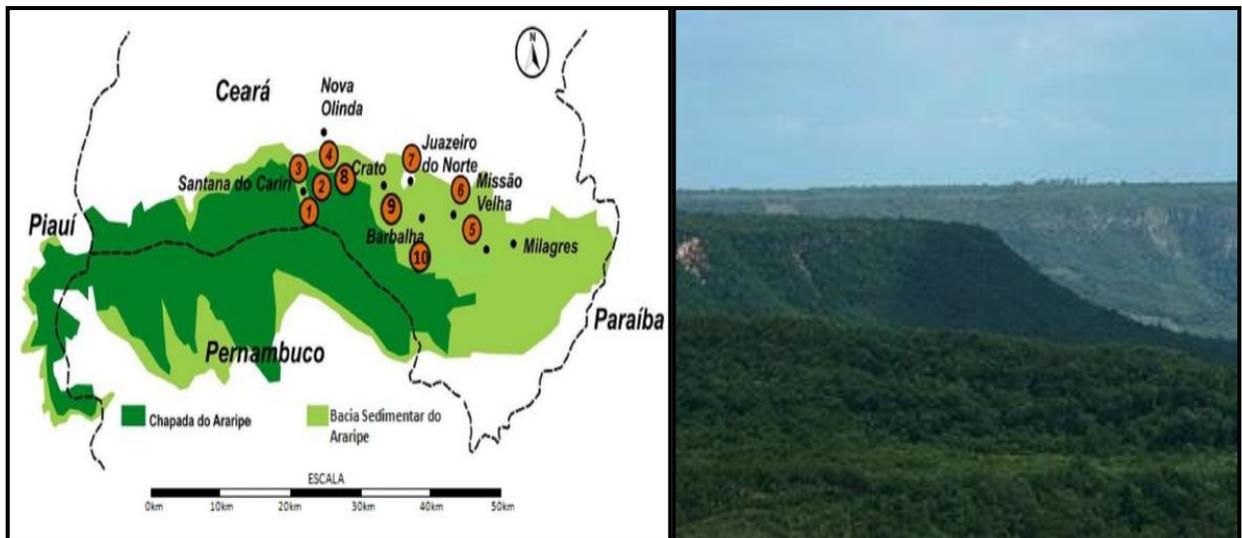
medicinais em todos os países como fontes alternativas de fármacos para doenças intratáveis, tais como AR (WANG *et al.*, 2011).

1.7 *Caryocar coriaceum* Wittm (Pequi)

1.7.1 Descrição e Localização

O pequizeiro (*Caryocar coriaceum* Wittm) oleaginosa da família Caryocaraceae, está localizado na região do Cariri. Essa região fica situada ao sul do estado do Ceará. Sua geografia é marcada por um extenso planalto com 160 km de comprimento em seu eixo principal (leste-oeste) e cerca de 50 km de largura na direção norte-sul, este planalto recebe o nome de Chapada do Araripe (**Figura 1**). A chapada abriga uma floresta nacional (1946), uma área de proteção ambiental (1997) e um geoparque (2006). Localiza-se entre os limites dos Estados do Ceará, Piauí e Pernambuco. No Ceará abrange 15 municípios (Missão Velha, Abaiara, Brejo Santo, Porteiras, Jardim, Jati, Penaforte, Barbalha, Crato, Nova Olinda, Santana do Cariri, Araripe, Potengi, Campos Sales e Salitre). A chapada é reconhecida internacionalmente como um dos mais completos e ricos depósitos de fósseis do planeta. Plantas, sementes, frutos, insetos, anfíbios, répteis e dinossauros. Tudo está ali, gravado na rocha há centenas de milhões de anos, constituindo o mais expressivo e raro patrimônio paleontológico do país. A vegetação é bastante diversificada, variando de acordo com as condições climáticas da região, predominando uma formação florestal do bioma cerrado que apresenta um tipo denso de vegetação (PROGRAMA PARQUE VIVO, 2013; REBOUÇAS, 2013).

FIGURA 1: Chapada do Araripe.



Fontes: Adaptado de

<<http://maps.google.com.br/maps?hl=ptBR&tab=wl>>; <http://www.geocities.com/cariri_ce/mapa3b.gif>; <http://cariricult.blogspot.com/2009_02_01_archive.html>.

Caryocaraceae é uma pequena família botânica, amplamente distribuída na América Central e do Sul, composto por 25 espécies, distribuídas em dois gêneros, *Caryocar* e *Anthodiscus*. As plantas do gênero *Caryocar* são muito bem estudadas especialmente porque elas são boas fontes de óleos e madeira, este último sendo de boa qualidade, devido a sua resistência à umidade e aos ataques de insetos (ASCARI, *et al.*, 2011). O gênero *Caryocar* apresenta dezesseis espécies, algumas das que possuem potencial econômico uma vez que o seu fruto, chamado pequi, é frequentemente utilizado como uma fonte de óleo comestível. Dentre as espécies do gênero *Caryocar*, destacam-se no Brasil as espécies: *C. brasiliense*, *C. villosum*, *C. coriaceum*, *C. cuneatum* e *C. glabrum*. Ocorrendo em quase todos os agroecossistemas do país e tem seus frutos, de cheiro e sabor peculiares, bastante apreciado na culinária regional pela população nas regiões Centro-Oeste, Norte e parte do Nordeste (PAULA-JÚNIOR, 2004). Entre as espécies de *Caryocar*, o *Caryocar brasiliense* é de longe a espécie mais estudada, o que auxiliam na compreensão das características e propriedades de *C. coriaceum*, em virtude da proximidade genética entre essas duas espécies (OLIVEIRA *et al.*, 2007). O pequi é usado como alimento e remédio (antiinflamatório e cicatrizante), o qual gera renda e substrato nutricional para as populações de baixa renda da região, de onde é

extraído o óleo da sua polpa e comercializados nas feiras públicas das cidades da região do Cariri (MATOS, 2007).

O fruto do pequizeiro é conhecido pelos nomes populares de pequi, piqui, pequiá, piqui-brabo, piqui da serra, piqui do arisco ou pequi do Nordeste, é uma espécie arbórea, perene nativa, explorada de forma extrativista. A palavra pequi ou piqui vem do tupi-guarani e significa (*py-qui*, *py* = pele, casca; *qui* = espinho; “fruto de pele com espinho”), fazendo, dessa forma, uma alusão aos vários espinhos formadores de uma camada protetora sobre a semente (SILVA e MEDEIROS-FILHO, 2006). Na parte mais setentrional do Nordeste brasileiro é encontrada a espécie *Caryocar coriaceum* Wittm, que possui um fruto de polpa oleaginosa, que exerce importante papel sócio-econômico na Chapada do Araripe e circunvizinhanças nos Estados do Ceará, Pernambuco e Piauí (OLIVEIRA *et al.*, 2007; VERA *et al.*, 2007).

O pequizeiro possui hábito arbóreo, podendo atingir de 12 a 15 metros de altura e tronco com até 2 metros de circunferência, revestido de casca escura, grossa e sulcada, galhos grossos, compridos e inclinados, e uma copa longa (**Figura 2**). Tem folhas simples opostas, ternadas, com folíolos ovais, glabros (sem pelos), verde, de aspecto coreáceo. As flores são grandes com coloração amarelo intenso, com estames vermelhos grandes e estão reunidas em cachos terminais. O fruto é drupáceo, globoso, de consistência carnosa, com epicarpo de coloração verde escura, medindo cerca de 0,1 cm de espessura (**Figura 3**). A germinação do *C. coriaceum* pode ser classificada como lenta, com tempo médio maior que 10 dias bem como a embebição de água pelas sementes, também lenta, podendo estar relacionada à natureza lipídica das mesmas. Por outro lado, a dormência é longa, fato atribuído à imaturidade embrionária ou aos inibidores de germinação presentes. Os períodos de floração e de frutificação possuem comportamento sazonal, com a floração ocorrendo entre os meses de setembro e novembro e a frutificação entre os meses de dezembro e abril. (SILVA e MEDEIROS FILHO, 2006).

FIGURA 2: Pequiizeiro (*Caryocar coriaceum* Wittm). Localizado na Chapada do Araripe.



Fonte: <<http://lugaresquever.com/s?as=foto&fp=17901310>>

FIGURA 3: Aspecto das folhas, frutos e flor do *Caryocar coriaceum* Wittm.



Fonte: APA Chapada do Araripe.

A polpa e a amêndoa, porções oleaginosas comestíveis do fruto, são altamente nutritivas, por seu sabor característico e por ser fonte de lipídios e vitaminas antioxidantes, são bastante aproveitadas como alimento. A principal utilização do fruto é o consumo direto do “caroço” em forma de “pequizada”, em cozidos de carne bovina e frango, no feijão e arroz e na preparação de molhos e temperos, e substituindo outras fontes de lipídios. (OLIVEIRA *et al.*, 2007; SILVA e MEDEIROS-FILHO, 2006). Devido ao preço acessível, o pequi constitui um precioso recurso alimentar para a população de baixa renda. Além de ser utilizado como alimento, o pequi também é aproveitado para a produção de óleo, que é produzido de forma artesanal. A extração é feita através de fervura intensa do fruto sem casca em uma panela de ferro com água, por algumas horas, até obter um sobrenadante gorduroso. Retira-se a parte oleosa que, aos poucos, sobe à tona da água, obtendo-se dessa forma o óleo de pequi. O óleo é negociado nas feiras e casas de comércio da região, sendo adquirido geralmente para fins medicinais (MATOS, 2007; AUGUSTO e GÓES, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 1989).

1.7.2 Indicações Terapêuticas

O conhecimento popular atribui ao óleo de pequi grande aplicabilidade medicinal. Principalmente no tratamento de gripes e infecções bronco-pulmonares (administrado isolado ou adicionado ao mel de abelha), inflamações e dores da garganta, bronquite, tosse, coqueluche, asma, inflamações da pele, úlceras externas, uso tópico para curativos de ferimentos, cicatrização, na forma de compressas e massagens nos casos de dores musculares, reumatismo, contusões e em tratamentos fisioterapêuticos (FRANCO e BARROS, 2006; SILVA e MEDEIROS-FILHO, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007; AGRA *et al.*, 2007; MATOS, 2007; SANTOS, 2007); é usado para tratamento de queimadura, como afrodisíaco, fortificante e estimulante da produção de bÍlis (SANTOS *et al.*, 2004). O óleo também tem aplicabilidade veterinária, sendo usado em cortes, contusões, pisaduras e inchaços de animais (BRAGA, 1960; LIMA, 1996).

Além da polpa do fruto, as folhas e flores do pequizeiro também são utilizadas, na forma de decocto como energético, fortificante, em combate a gripes, resfriados, disfunções menstruais, contra doenças hepáticas e utilizado como afrodisíaco (AGRA *et al.*, 2007). As cascas da árvore e dos frutos são utilizadas em infusões como antifebris e diuréticos (SILVA e MEDEIROS-FILHO, 2006). Porém, os estudos experimentais que comprovem tais ações ainda encontram-se incipiente. Essas aplicações populares citadas acima são observadas em trabalhos de etnobotânica e etnofarmacologia abordando o óleo obtido do fruto de outras

espécies do gênero *Caryocar*, como o *C. brasiliense*. Os estudos etnobotânicos ainda apontam o uso do óleo de *C. brasiliense* contra tumores (AGRA *et al.*, 2007; RODRIGUES e CARVALHO, 2001; GUARIM-NETO e MORAIS, 2003; SOUZA e FELFILI, 2006).

1.7.3 Atividades Biológicas do *Caryocar coriaceum* Wittm.

Muitos estudos foram realizados com o objetivo de identificar possíveis atividades biológicas do gênero *Caryocar*, a partir de observações etnobotânicas e estudos farmacológicos. Por sua localização geográfica e dessa forma estando mais acessível a grandes centros de pesquisa brasileiros, o *C. brasiliense* é a espécie mais estudada (SARAIVA, 2009).

Ensaio pré-clínicos do óleo fixo da polpa e da semente de *C. coriaceum* Wittm realizados por Saraiva *et al.* (2010), apontaram atividade anti-inflamatória significativa com resultado melhor para o óleo fixo da polpa, onde os pesquisadores testaram o óleo fixo do pequi (*C. coriaceum* Wittm) no modelo de indução de edema mediado por agentes flogísticos, e verificaram que sua ação pode estar ligada à inibição de COX e LOX ou receptores de prostaglandinas e/ou à produção de 44icosanóides anti-inflamatórios. Os efeitos gastroprotetores do óleo da polpa de *C. coriaceum* Wittm, avaliados em modelos de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos, nas doses de 200 e 400 mg/kg demonstraram inibição da lesão em 60,5% e 57,0%, respectivamente (LEITE *et al.*, 2009). Em modelo de úlcera induzida por etanol e ácido acetil salicílico, o óleo mostrou inibição das lesões gástricas em 69,3% e 50,5%, nas concentrações de 200 e 400 mg/kg. O efeito gastroprotetor do óleo de *C. coriaceum* Wittm ocorre, em partes, através de mecanismos que envolvem α_2 -receptores, prostaglandinas endógenas, óxido nítrico (NO) e canais de potássio ATP dependentes (K^+_{ATP}). O pré-tratamento dos camundongos com indometacina suprimiu esse efeito. No mesmo estudo o óleo apresentou ainda atividade cicatrizante em modelo de ferida cutânea aberta por incisão, evidenciada pela regressão da área da ferida quando comparada ao grupo controle. Do ponto de vista histológico, no grupo tratado com óleo do *C. Coriaceum* Wittm foi marcada por quantidade aumentada de fibroblastos, colágeno e neoangiogênese (QUIRINO *et al.*, 2009). O efeito cicatrizante do óleo fixo das sementes de *Caryocar coriaceum* Wittm., foi avaliando ainda por Oliveira (2009), onde o autor evidenciou uma inibição da inflamação tópica e aceleração do processo de cicatrização cutânea, mostrando potencial terapêutico sobre o sistema imune da pele. Já o óleo da polpa do fruto apresentou influência positiva na

cicatrização de feridas cutâneas experimental em ratos, por promover reação inflamatória menos intensa e fechamento mais rápido das feridas em relação ao grupo controle (BATISTA, *et al.*, 2010).

1.7.4 Composição do Óleo de Pequi (OPCC)

Os óleos e as gorduras têm um papel importante, usados com fins farmacológicos, industriais e nutricionais. Há um crescente interesse nas características de lipídios de óleos vegetais, pois eles parecem ser uma interessante fonte de componentes bioativos e nutrientes funcionais, tais como vitaminas e ácidos graxos insaturados essenciais, com propriedades químicas únicas e com benefícios para a saúde. Os relatórios têm descrito diversas atividades farmacológicas interessantes dos óleos fixos, incluindo ação antimutagênica, anti-inflamatória, anti-viral, antioxidante e antimicrobiana, obtidos a partir de plantas e ervas usadas na medicina popular (ROSA *et al.*, 2012). Os óleos fixos e gorduras diferem apenas no ponto de fusão; os que em temperatura ambiente, são líquidos recebem o nome de óleos fixos. Quimicamente os óleos fixos são compostos predominantemente por triacilgliceróis, que têm ácidos graxos diferentes ou idênticos, esterificados nas três posições hidroxila da molécula de glicerol. O nome ácido graxo designa qualquer um dos ácidos monocarboxílicos alifáticos que podem ser liberados por hidrólise de gorduras e óleos naturais. Os principais ácidos graxos podem ser saturados ou insaturados, com uma cadeia de carbono não ramificada de número par. Os ácidos graxos saturados (láurico, mirístico, palmítico e esteárico) e os insaturados (oléico, linoléico e linolênico), juntos, perfazem quase toda a quantidade de óleos fixos e gorduras existentes no comércio. A maioria dos óleos fixos é obtida a partir de sementes, casca do caule e polpa de frutos de vegetais (MORETTO e FETT, 1998; SIMÕES *et al.*, 2007; MOYNA e HEINZEN, 2007).

A composição química do óleo da polpa do pequi obtido de duas formas, artesanal e em laboratório (com solvente orgânico hexano) identificou em ambos a presença de ácidos graxos mono e poli-insaturados: ácido oleico, palmítico, esteárico e linoleico. O ácido oleico foi a substância majoritária encontrada num percentual em torno de 54%, não havendo diferenças significativas entre os percentuais de cada substância no óleo obtido das duas formas (FIGUEIREDO *et al.*, 1989). Nos estudos realizado por Oliveira *et al.*, (2010), foram avaliadas as características químicas, físico-químicas e a composição mineral da polpa e amêndoa do *C. coriaceum* Wittm. e os resultados demonstram a importância nutricional,

principalmente de sua amêndoa, pelo elevado percentual de lipídios, proteínas, zinco, cobre e fósforo, onde a maior variabilidade foi exibida pelo cobre (142,5%) na polpa e o sódio (84,7%) na amêndoa, enquanto a menor foi observada para os teores de potássio e fósforo na polpa e Magnésio e potássio na amêndoa. Em estudos posteriores o óleo de pequi (*C. coriaceum* Wittm) apresentou um teor elevado de ácidos graxos insaturados (64,9%). No entanto, os ácidos oleico e palmítico apresentaram-se como componentes majoritários. Ácido palmitoleico (0,27%), ácido esteárico (1,73%), ácido linoléico (1,80%), ácido heptadecenoico (5,86%) e ácido 11-eicosenoico (0,37%) (SARAIVA *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2011).

1.8 Justificativa

A artrite é uma patologia articular caracterizada por inflamação sinovial crônica. Ela acomete a população em nível mundial e causa grandes prejuízos socioeconômicos, porém sua etiologia ainda permanece desconhecida. No entanto, dados da literatura mostram que fatores ambientais, genéticos e infecciosos podem desencadear o aparecimento dessa doença. O tratamento gera muitos gastos, devido ao alto custo dos medicamentos. E o uso de produtos naturais vem sendo utilizado como forma alternativa ao tratamento convencional da artrite. O uso de produtos naturais ganha destaque, tendo em vista serem de fácil acesso e pela larga utilização na medicina popular. O uso de plantas medicinais tem sido amplamente relatado ao longo do tempo. É de interesse da medicina o estudo de substâncias isoladas de plantas, por apresentarem grande potencial no mercado.

O óleo da polpa de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm), apesar de seu grande uso na medicina popular e de já haver descrição de sua atividade anti-inflamatória tópica e gastroprotetora, ainda não há relatos na literatura da investigação de atividade anti-inflamatória sistêmica e antinociceptiva em modelos animais que simule achados clínicos. Sabendo-se que sua atividade gastroprotetora, como citado acima, tem a participação de NO e K⁺ATP e que essa via também está bem descrita como uma via analgésica periférica, acreditamos que seria válido a investigação do efeito anti-inflamatório, bem como antinociceptivo, tendo em vista que a dor é o principal fator de incapacidade em pacientes com artrite levando à perda da funcionalidade.

A utilização de extratos e/ou substâncias isoladas de plantas medicinais torna-se necessário, pois seu estudo e comprovação de sua eficácia podem levar a descoberta de novos fármacos acessíveis e que causem menos efeitos colaterais, podendo determinar melhoria da qualidade de vida em doenças crônicas como a AR ou a própria sobrevivência do paciente afetado. Socialmente, a descoberta de fontes naturais e locais de compostos farmacológicos e o desenvolvimento de fitoterápicos de fabricação local podem ter consequências econômicas significativas, além de possibilitar desenvolvimento científico regional e ainda com a comprovação dessas atividades, incentivar a conservação dessa planta de grande importância comercial e científica.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do óleo da polpa de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) na artrite induzida por zymosan em ratos.

2.2 Específicos

- Estudar o efeito do óleo da polpa do pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan;
- Estudar o efeito do óleo da polpa de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) sobre a migração celular na artrite induzida por zymosan;
- Avaliar o efeito do óleo da polpa de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) sobre a liberação de mediadores inflamatórios (citocinas) na artrite induzida por zymosan;
- Averiguar a imunoexpressão de TNF- α e COX-2 em tecido sinovial na artrite induzida por zymosan;
- Avaliar o efeito do óleo da polpa de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) sobre o edema na artrite induzida por zymosan;
- Estudar o efeito antinociceptivo do óleo da polpa de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) no modelo de hipernocicepção plantar induzida por carragenina ou PGE2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Botânico

O material botânico utilizado para o estudo foram os frutos do pequizeiro (*Caryocar coriaceum* Wittm). Para obtenção do óleo foi utilizado a polpa dos frutos da planta, coletados numa área de cerrado da Chapada do Araripe (Fazenda Barreiro Grande, Crato-CE, 7°21'53,1" S; 39°28'42,6" W; altitude: 892 m), adquiridos no mês de janeiro de 2009 através de moradores locais. A exsicata (**Figura 4**) do *Caryocar coriaceum* Wittm encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará - UFC, sob o número 44523, tendo sido identificada pela Profa. Dra. Lígia Queiroz Matias.

Figura 4: Exsicata do pequizeiro (*Caryocar coriaceum* Wittm).



Fonte: SARAIVA 2009.

3.2 Obtenção do Óleo Fixo de Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm)

A extração do óleo do pequi foi realizada pelo Prof. Dr. Irwin Alencar do Departamento de Química Biológica, Laboratório de Farmacologia e Química Molecular da Universidade Regional do Cariri (URCA). A polpa *in natura* dos frutos de pequi foram retiradas manualmente com auxílio de uma faca, separando o mesocarpo interno do endocarpo que é a porção resistente do fruto, onde encontram-se espinhos e amêndoa. A polpa obtida (104,14 g) foi colocada num extrator de *Soxhlet* em contato com solvente acetato de etila por 3 horas (método de extração a quente). Ao final do processo, obteve-se uma solução (óleo + acetato de etila). Posteriormente, a solução foi submetida à rota-evaporação (rota-evaporador Fisatom), seguido de aquecimento em banho-maria com temperatura controlada ($70 \pm 2^\circ\text{C}$), objetivando retirar o acetato de etila residual e evitar a decomposição de substâncias termossensíveis do óleo. O óleo demonstrou rendimento de 5,17%.

3.3 Análise Química da Composição do Óleo de Pequi

Utilizou-se a análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) para análise química. O óleo de pequi (OPCC) apresentou um teor elevado de ácidos graxos insaturados (64,9%). Os ácidos oleico e palmítico apresentaram-se como componentes majoritários. Ácido palmitoleico (0,27%), ácido esteárico (1,73%), ácido linoléico (1,80%), ácido heptadecenoico (5,86%) e ácido 11-eicosenoico (0,37%), também foram encontrados (**Tabela 1**) (COSTA *et al.*, 2011; SARAIVA *et al.*, 2011).

TABELA 1: Ácidos graxos identificados no óleo da polpa do fruto do pequi.

ÁCIDO GRAXO	ESQUELETO CARBÔNICO*	PERCENTUAL (%)
Ácido palmitoleico	16:1(Δ_9)	0,27
Ácido palmítico	16:0	34,18
Ácido linoleico	18:2($\Delta_9,12$)	1,80
Ácido oleico	18:1(Δ_9)	55,79
Ácido esteárico	18:0	1,73
Ácido heptadecenoico	17:1(Δ_9)	5,86
Ácido 11-eicosenoico	20:1(Δ_{11})	0,37

3.4 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 180 e 200g, provenientes Biotério Central e do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Foram utilizados 6 animais por grupo experimental, os quais foram mantidos em gaiolas, em uma sala especial sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, sendo oferecido ração e água *Ad libitum*, e permaneceram nas mesmas condições durante os dias de administração do OPCC, bem como no dia do experimento.

Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, sob o protocolo número 83/11.

3.5 Protocolos Experimentais

O óleo da polpa do fruto do pequi (OPCC) foi administrado em doses variando de 100 a 400mg/kg, 45 minutos antes da artrite induzida por zymosan (AIZy) ou durante 7 dias consecutivos, sempre no mesmo horário, por via oral (gavagem). Essas doses foram escolhidas tendo em vista que no estudo realizado por Quirino (2009), não foi observado morte ou qualquer outro sinal de toxicidade nos animais tratados com uma dose de 2.000mg/kg do OPCC. A sobrevivência de 100% dos animais em doses de 2.000mg/kg indica que este óleo pode ser considerado, segundo a classificação da União Europeia, como

“toxicidade não definida” que por analogia, a sua DL50 por via oral é superior a este valor (QUIRINO, 2009).

Os ratos foram distribuídos em 6 grupos, cada grupo composto de 6 animais, onde cada grupo experimental foi induzida a inflamação articular (com exceção do grupo *naive*), No grupo controle foi administrado água aos animais. Em três grupos foram administradas, 45 minutos antes da AIZy ou durante 7 dias consecutivos, soluções do OPCC nas doses de 100, 200 e 400mg/kg. E outro grupo foi tratado com o fármaco padrão (dexametasona, indometacina ou dipirona) em cada teste experimental, apenas no dia do experimento. O OPCC foi diluído da seguinte forma, primeiro em um abalança pesa-se o óleo em um tubo falco e em seguida é adicionado Tween 80, posteriormente é adicionado solução salina e procedesse a diluição para as doses de 400, 200 e 100mg/Kg.

Os grupos foram divididos em subgrupos experimentais para a avaliação de parâmetros como: Incapacitação articular, e em seguida os animais foram eutanasiados sob anestesia com tribromoetanol (50mg/kg) para coleta do líquido e tecido sinoviais para avaliação de recrutamento leucocitário, atividade de mieloperoxidase (MPO), liberação de citocinas e reação de imunohistoquímica. Também foram divididos subgrupos para avaliação dos parâmetros: Formação de edema; Alterações da permeabilidade vascular; e hiperalgesia mecânica plantar induzida por carragenina ou PGE2.

3.6 Indução da Artrite por Zymosan em Joelho de Rato

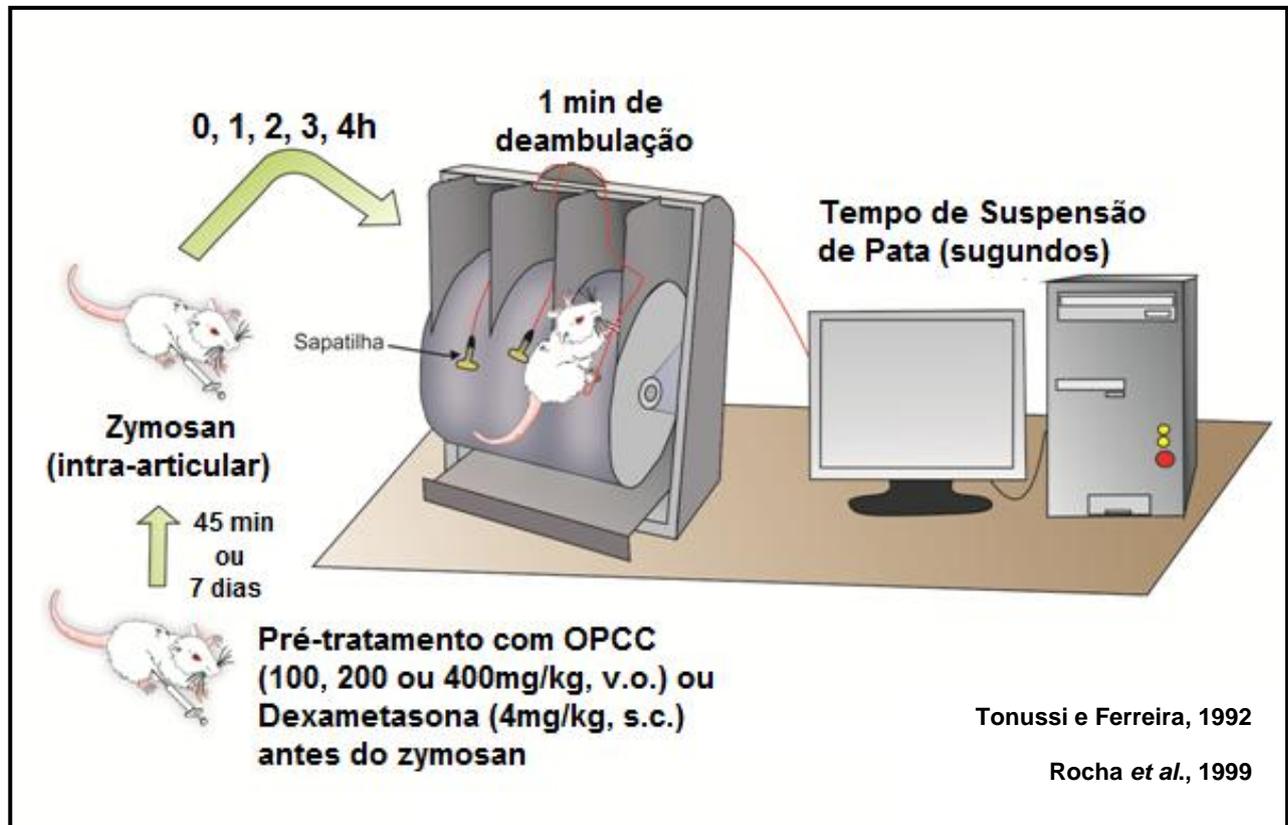
Ratos Wistar machos, foram submetidos a indução de artrite através da injeção intra-articular (i.a.), no joelho posterior direito, de zymosan dissolvido em solução salina estéril (1mg/animal; 50 µl). Após 4 horas da artrite induzida por zymosan, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% (0,1 ml/30g, i.p.) e eutanasiados.

3.7 Análise da Incapacitação Articular (hipernociceção)

A avaliação da hipernociceção foi realizada através do Teste de Incapacitação Articular em ratos. O modelo foi descrito anteriormente por TONUSSI e FERREIRA (1992), posteriormente modificado (MAGALHÃES *et al*, 1997, VIANA *et al*. 1998; ROCHA *et al.*, 1999) e adaptado para o nosso laboratório. Os ratos foram postos para deambular

forçadamente em um carrossel de piso metálico (cilindro de alumínio, 30 cm de diâmetro x 50 cm de largura, coberto por uma tela de alumínio nas mesmas proporções), giratório, com capacidade para 3 animais. A velocidade utilizada foi de 3 rotações por minuto (rpm) durante 1 min. As patas traseiras foram calçadas com sapatilhas metálicas especialmente desenhadas, onde a sapatilha da pata direita correspondente ao joelho injetado foi conectada à porta de dados de um microcomputador, no qual estava instalado um programa de aquisição de dados (IA – incapacímetro articular V1.0). Ao tocar com a sapatilha no piso metálico fecha-se um circuito e ao final de 1 minuto o computador registra o tempo de suspensão da pata (TSP), isto é, o tempo que o animal permaneceu com a pata levantada sem encostar no piso. O TSP foi medido antes da injeção do estímulo (tempo zero) e de hora em hora até a 4ª hora. Dessa forma, um aumento do TSP indica nocicepção (incapacitação articular), isto é, a incapacidade do animal deambular normalmente sobre o carrossel (**Figura 5**). Vale ressaltar, que 24 horas antes da realização do ensaio o animais foram treinados, permitindo-se um período de deambulação e adaptação ao ambiente.

Figura 5: Ilustração da artrite induzida por zymosan (teste de incapacitação articular em joelho de rato)



3.8 Coleta do Lavado Articular

Após a eutanásia dos animais, a pele e os ligamentos articulares do joelho injetado foram removidos e procedeu-se a lavagem da cavidade articular fazendo-se duas injeções seguidas por aspiração de 200 μ L de EDTA 10mM em PBS através da membrana sinovial recolhendo-se o exsudato articular. As amostras foram colocadas em tubos *ependorff* e mantidas em banho de gelo. Em seguida foram coletas alíquotas para análise do influxo celular (contagem total e diferencial de leucócitos); dosagem de mieloperoxidase (MPO) e dosagem de citocinas.

3.9 Contagem Total de Leucócitos

A contagem do número total de células foi feita em câmara de Neubauer utilizando 20 μ L do lavado articular diluído em 380 μ L da solução de Turk (diluição de 1:20). Em seguida, 20 μ L desse preparado (solução de Turk + lavado articular) foi colocado na câmara de Neubauer e foi realizada a contagem do número total de leucócitos nos quatro quadrantes da câmara com auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x) e contador manual e expressa como número de leucócitos totais x 10⁶/ml.

3.10 Contagem Diferencial de Leucócitos

Após a retirada de alíquotas para contagem total do número de leucócitos o lavado articular foi centrifugado (1.500 rpm, 10 min, 4° C). O sobrenadante foi estocado à -70° C, para posterior análise (determinação de citocinas), e o *pellet* celular foi ressuspenso em 200 μ L de solução de PBS e EDTA. Em seguida, as lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação (1.500 rpm, 10 min) de uma alíquota do lavado articular (50 μ L). As lâminas então foram colocadas por 4 min no fixador e foram coradas com eosina (30 seg) e hematoxilina (20 seg). Então as lâminas foram lavadas em água corrente e colocadas para secagem. Posteriormente procedeu-se a contagem diferencial das células do exudato articular. As células foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 100x). Foram então contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se os tipos celulares em: neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, mononucleares e mastócitos. O número de neutrófilos presentes no lavado articular foi obtido através da porcentagem de neutrófilos (contagem diferencial) e da quantidade de células total presentes no lavado articular. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos x 10⁶/ml.

3.11 Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares e tem sido usado como índice quantitativo para avaliar a inflamação em vários tecidos. Para tanto, as amostras colhidas previamente foram descongeladas e centrifugadas a 4.500 rpm, durante 12 min a uma temperatura de 4° C; o sobrenadante foi, então, colhido. Os níveis da atividade de MPO foram determinados por

meio da técnica descrita por Bradley e colaboradores (1982), utilizando peróxido de hidrogênio 0,0005% como substrato para MPO. Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade capaz de converter 1 μmol de peróxido de hidrogênio a água em 1 min a 22° C. A variação da densidade óptica da mistura das amostras com a solução de o-dianisidina em função do tempo de reação foi medida por espectrofotômetro à 450nm. Os resultados foram expressos como UMPO/ μL de lavado.

3.12 Dosagem de Citocinas no Sobrenadante do Lavado Articular

Para determinação dos níveis de citocinas foi utilizado o sobrenadante coletado do lavado articular, conforme descrito anteriormente. As citocinas foram medidas utilizando o sistema de ensaio de citocinas multiplex Bioplex (Bio-Rad Laboratories[®], Hercules, CA, EUA). Esse sistema quantifica múltiplos biomarcadores em um único poço, em uma placa de 96 poços. Anticorpos são dirigidos contra o biomarcador que se deseja, acoplando-se covalentemente as *beads* magnéticas que reagem com as amostras contendo o biomarcador de interesse. Após algumas séries de lavagens, um anticorpo bionitilado de detecção é adicionado para formar um complexo. O complexo de detecção final é formado com a adição de Streptavidina-PE, que funciona como um indicador de fluorescência. Brevemente, 50 μl das *beads* foram colocadas nos poços da placa que foi lavada em uma lavadora apropriada com 100 μl de tampão de lavagem. Em seguida 50 μl padrão, das amostras e do “branco” foram colocados na placa, que é incubada no escuro, durante uma hora à 300 rpm. Adicionou-se 25 μl do anticorpo de detecção e a placa foi incubada novamente a 300 rpm, por 30 min. Mais uma lavagem foi realizada e, então, 50 μl de estreptavidina-PE foi adicionado em cada poço e após 10 minutos de incubação e lavagem, as *beads* foram novamente suspensas em 125 μl de tampão de ensaio e incubadas a 1.100rpm por 30 segundos. Em seguida foi realizada a leitura da placa à 635nm através do sistema Bio-Plex. Os dados foram analisados utilizando o Bio-Plex Software Manager (versão 3.0, Bio-Rad Laboratories[®], Hercules,CA, EUA). Oito citocinas foram analisadas: TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, INF- γ , GM-CSF.

3.13 Coleta do Tecido Sinovial de Joelho de Rato

Os animais receberam injeção intrarticular de zymosan (1mg/animal, 50 μL) no joelho posterior direito, após 4 horas de experimento foram anestesiados por via i.p. com

hidrato de cloral 10% (0,1 ml/30g, i.p.) e eutanasiados. Para coleta do tecido sinovial a pele e os ligamentos articulares do joelho injetado foram removidos e procedeu-se a remoção cirúrgica do tecido sinovial. O tecido foi fixado em formol 10% e 24h depois em álcool 70%. As peças foram desidratadas e parafinizadas para corte e confecção de lâminas para imunohistoquímica.

3.14 Análise Imunohistoquímica para TNF- α e COX-2

A sinóvia foi removida como já descrito, e fixada em formol a 10%. Posteriormente foram desidratadas e então parafinizadas. A imunohistoquímica para TNF- α e COX-2 foi realizada no tecido sinovial da articulação do joelho de ratos usando o método estreptavidina-biotina-peroxidase. Os tecidos foram cortados no plano transversal com 4 μ m de espessura com o auxílio de um micrótomo. As secções de tecidos foram montadas em lâminas especiais para imunohistoquímica. O ensaio de imunohistoquímica foi realizado na sequência seguinte: desparafinização e hidratação dos cortes, para desparafinização as lâminas foram deixadas em estufa a 66-88°C durante 3 horas. Em seguida foram colocadas em xilol (três banhos com duração de cinco minutos cada). A reidratação foi realizada em concentrações de alcoóis decrescentes 100%, 90% e 70% (banhos com duração de cinco minutos cada) e água destilada (banho com duração de cinco minutos), seguida da ativação antigênica em tampão citrato pH 6,0 (98°C por 15min, em forno microondas), após esfriamento (20 min), foi realizada inibição da peroxidase tecidual com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% (dois banhos, 10min cada) e lavadas em PBS. Em seguida as secções foram incubadas com os anticorpos primários (anti-TNF- α ou anti-COX-2 produzidos em cabra), *overnight* a 4°C, os anticorpos foram diluídos a 1:200 em albumina bovina 5% (BSA 5%). O controle negativo não recebeu anticorpo primário.

No dia seguinte, o anticorpo primário foi removido por lavagem em tampão PBS e as secções foram incubadas durante 30 minutos com o anticorpo secundário (anti-IgG de cabra, diluído em BSA 5%, diluição 1:400). Após lavagem em PBS ocorreu a incubação com o complexo estrepto-avidina-peroxidase (complexo ABC) durante 30 min. A coloração foi realizada através da adição do diaminobenzidina-peróxido de hidrogênio (DAB-peróxido). Este corante produz uma marcação de cor marrom. Foi realizada a contra-coloração com hematoxilina de Mayer, durante 5 minutos. Então foi realizada a desidratação em gradações de etanol, seguidas de xilol e depois foram montadas com entelan. Após a secagem as lâminas

foram examinadas no microscópio Leica® e registradas as fotografias dos cortes obtidos do tecido sinovial. A quantificação da área marcada das micrografias do tecido sinovial (aumento de 100x) foi feita diferenciando as áreas marcadas (pixels) pela maior saturação de cor associada a marcação (marron). Para isso foi utilizado o programa Image J-NIH. O procedimento foi baseado na saturação da cor associada à marcação positiva para o marcador. Os limites necessários para definição de pixels marcados e não marcados foram definidos previamente.

3.15 Análise de Edema nas Articulações do Joelho.

O edema da articulação do joelho foi avaliado por medição do diâmetro transversal do joelho direito, no qual foi injetado zymosan, um paquímetro digital (Digimatic Caliper, Mitsutoyo Corporation, Japão) foi utilizado para medir o edema. A medição foi realizada antes da administração de zymosan (tempo zero) e, subsequentemente, a cada hora durante 5h. Para a medida das articulações, o animal foi cuidadosamente imobilizado por um pesquisador, e a medida do diâmetro do joelho foi realizada por um segundo pesquisador. O edema foi expresso em milímetros. Os dados foram apresentados como a diferença média entre os valores do diâmetro articular obtidos a cada hora após a injeção de zymosan e o valor obtido imediatamente antes da injeção de zymosan (Variação do Diâmetro Articular, mm).

3.16 Permeabilidade Vascular por Extravasamento de Azul de Evans na Articulação

Os animais receberam a injeção intrarticular de zymosan (1 mg/animal, 50 μ L) no joelho posterior direito, após 6 horas foram anestesiados com hidrato de cloral 10% (0,1 ml / 30g, i.p.) e eutanasiados. O método de extravasamento de azul Evans, como descrito por Lam e Ferrell (1991), foi usado para avaliar o extravasamento de proteínas plasmáticas para a articulação do joelho de rato. Esse método baseia-se no fato de que o azul de Evans tem alta afinidade de ligação às proteínas (albumina) do plasma. Normalmente, as proteínas plasmáticas (albumina) ligadas ao azul de Evans não podem passar através das aberturas endoteliais, e elas são, portanto, restrita ao compartimento vascular. No entanto, quando a aberturas endoteliais são ampliadas, o complexo plasmático albumina-azul de Evans pode

escapar para o interstício. Assim, medição da quantidade de corante azul de Evans na cápsula sinovial pode fornecer um índice da permeabilidade vascular relativa.

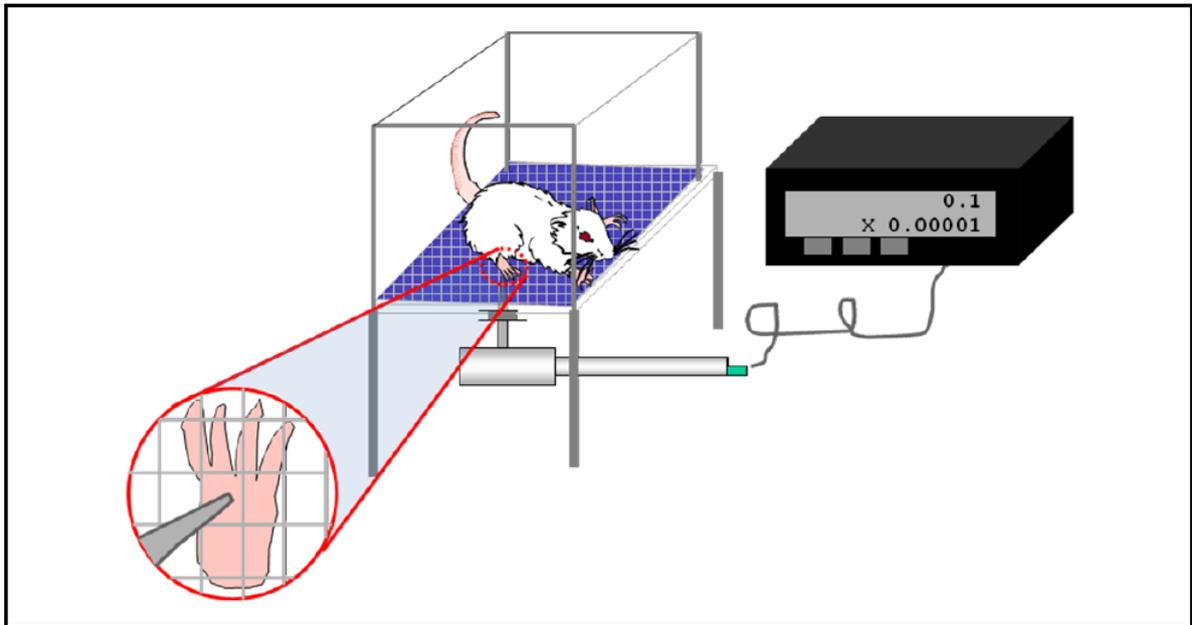
Azul de Evans (25mg/kg) foi administrado por injeção endovenosa 1 h antes da eutanásia. Após 6 h da injeção de zymosan, os animais foram eutanasiados, e a sinovia e tecidos periarticulados foram dissecados de cada joelho de forma conjunta. Os tecidos obtidos a partir de cada articulação do joelho foram pesados, e a quantidade de azul de Evans nas amostras foi estimada utilizando uma técnica de extração, onde o tecido extraído foi colocado em uma solução de formamida (2 ml) em tubos de vidro e incubou-se a 40° C *overnight* para a extração do corante. Cada tubo foi centrifugado durante 10 min a 2.000 rpm, e 200µL do sobrenadante foi separado para a medição da absorbância a 620 nm usando um leitor de microplacas (Biotek Instruments, Winooski, VT). A quantidade de corante recuperado foi calculada por comparação da absorbância do fluido com a de uma curva com concentrações conhecidas de uma solução de azul de Evans (25mg/ml a 0,0977mg/ml), preparada imediatamente antes da realização da leitura.

3.17 Teste de Hipernociceção Mecânica Plantar

Os animais receberam uma injeção intraplantar de carragenina (Cg; 300µg/pata) ou prostaglandina E₂ (PGE₂; 400ng/pata). A intensidade de hipernociceção foi avaliada pelo limiar de sensibilidade de cada animal a um estímulo mecânico produzido pela pressão gradual exercida por um filamento rígido acoplado a um aparelho que registra a pressão em gramas exercida na ponta desse filamento. A estimulação mecânica foi exercida na região plantar das patas traseiras, como é demonstrado na **figura 6**. O aparelho (eletronic Von-Frey anesthesiometer, Insight, Ribeirão Preto-SP, Brasil) registra a pressão em gramas suficiente para provocar uma reação descrita como uma flexão da pata seguida por um “*flinch*” após a retirada da pata em contato com o aparelho (CUNHA TM *et al.*, 2004).

Os animais foram colocados individualmente em compartimentos de acrílico transparentes (9 x 7 x 11 cm), localizados em uma plataforma de arame elevada para permitir o acesso à superfície ventral das patas traseiras. A hipernociceção mecânica plantar (grau de sensibilidade ao estímulo mecânico) foi avaliada antes (tempo zero) e após a injeção da carragenina ou PGE₂.

Figura 6: Ilustração do teste de hipernociceção mecânica plantar



3.18 Análise Estatística

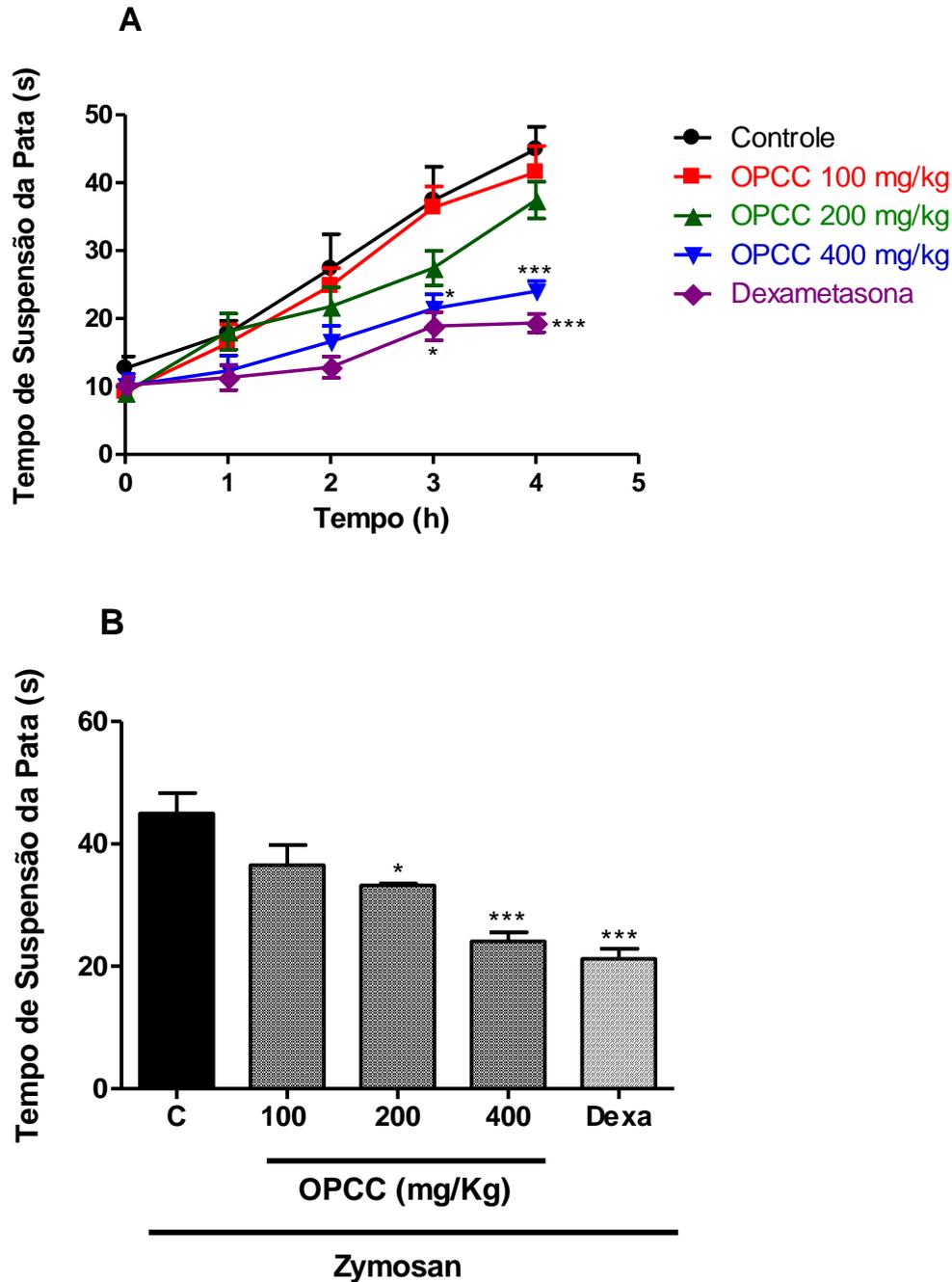
Os dados foram expressos como média \pm o erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi feita usando o teste one-way ANOVA, seguida do teste de Newman-keuls. Significância estatística foi observada quando $p < 0,05$. Para realização dos testes estatísticos foi utilizado o *software* Prisma versão 5.0 da *GraphPad Software*.

4. RESULTADOS

Efeito antinociceptivo do pré-tratamento com OPCC, em dose única, sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato

Os animais desenvolveram incapacitação articular caracterizada pelo aumento no tempo de suspensão da pata (TSP), medido pelo Teste de Incapacitação Articular (hipernocicepção) para ratos. Os valores do TSP para o grupo controle foram crescentes atingindo o pico de incapacitação entre a 3^a ($37,40 \pm 4,96$) e 4^a hora ($44,95 \pm 3,33$). O pré-tratamento com OPCC (400mg/kg), 45 min antes da injeção de zymosan, diminuiu significativamente ($p < 0,05$) o TSP na 3^a ($21,46 \pm 2,11$) e 4^a horas ($24,04 \pm 1,49$). Quando foi avaliado o pico de incapacitação, correspondente ao maior valor da 3^a ou 4^a hora, os grupos que foram tratados com OPCC 200mg/kg ($33,23 \pm 0,24$) e 400mg/kg ($24,06 \pm 1,50$) demonstraram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle (animais não tratados e com artrite) ($44,97 \pm 3,35$). O grupo tratado com dexametasona (4mg/kg) também diminuiu significativamente ($p < 0,05$) o TPS na 3^a ($18,88 \pm 2,08$) e 4^a ($19,34 \pm 1,34$). Não houve diferenças estatísticas quando comparado ao grupo OPCC 400mg/kg (**Figura 7B**).

Figura 7: Efeito antinociceptivo do pré-tratamento com óleo de pequi (OPCC), em dose única, sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato.



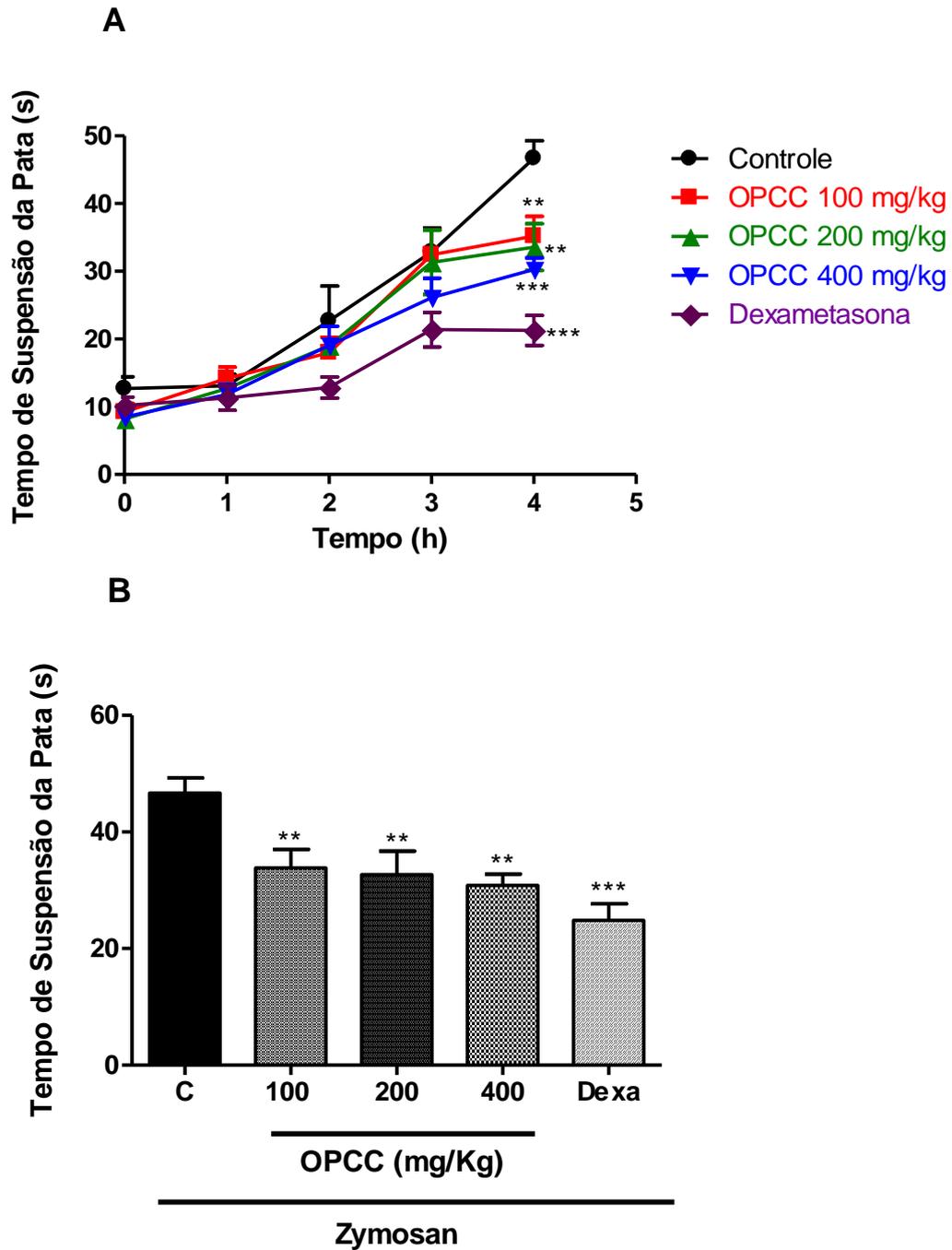
Todos os grupos foram submetidos à artrite induzida por zymosan (1 mg/animal; 50 μ l, i.a). Água (Controle, C, 1ml/animal, v.o.; 45 min antes do zymosan), OPCC (100, 200 e 400mg/kg, v.o.; 45 min antes do zymosan, dose única) ou Dexametasona (Dexa, 4mg/kg, s.c.; 2h antes do zymosan). A incapacitação articular foi avaliada de hora em hora pelo Tempo de Suspensão da Pata (TSP) em segundos, até a 4ª hora após a administração do zymosan. Os dados representam média do TSP \pm EPM de 6 animais por grupo. (A) cinética da incapacitação articular; (B) pico de incapacitação articular (maior valor obtido entre a 3ª e 4ª horas após a injeção de zymosan). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ relação ao grupo controle (ANOVA, seguida de Newman-Keuls).

Efeito antinociceptivo do pré-tratamento com óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato

O tratamento com OPCC nas doses de 100, 200 ou 400mg/kg durante 7 dias consecutivos antes da Artrite Induzida por Zymosan (AIZy) no joelho dos ratos, inibiu o TSP na 4ª hora de forma significativa ($p < 0,05$), com efeito máximo na dose de 400mg/kg ($30,28 \pm 1,70$), sendo mais eficaz em relação ao grupo não tratado (Controle; $46,68 \pm 2,56$). A administração da dexametasona na dose de 4mg/kg, via s.c., 2 horas antes de induzir a reação inflamatória, inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) a incapacitação articular medida na 4ª hora ($21,27 \pm 2,21$) de artrite (**Figura 8A**).

Determinou-se o pico de incapacitação após a administração intra-articular de zymosan que corresponde ao maior valor do TPS entre a 3ª e 4ª hora. A incapacitação foi máxima na 4ª hora ($46,68 \pm 2,56$), onde ocorreu a um aumento do TSP para o grupo controle em relação aos grupos tratados com OPCC. Todos os grupos tratados com OPCC (100, 200 e 400mg/kg) foram estatisticamente significantes na reversão da incapacitação articular, bem como o grupo tratado com dexametasona (4mg/kg), o grupo OPCC 400mg/kg ($30,83 \pm 1,94$) obteve o melhor resultado entre os grupos tratados com o OPCC, bem como o grupo tratado com dexametasona (controle positivo) ($24,80 \pm 2,85$) comparados ao grupo controle ($46,68 \pm 2,56$) (**Figura 8B**).

Figura 8: Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a incapacitação articular da artrite induzida por zymosan em joelho de rato.



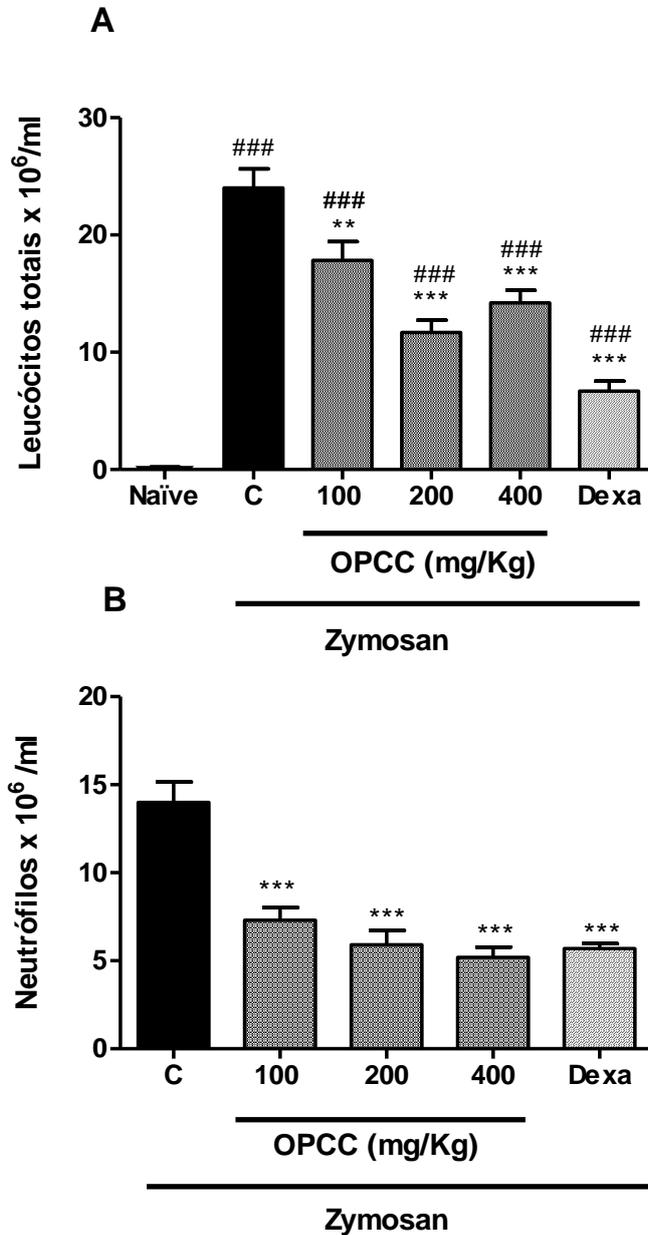
Todos os grupos foram submetidos à artrite induzida por zymosan (1 mg/animal; 50 μ l, i.a). Água (Controle, C, 1ml/animal, v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes do zymosan), OPCC (100, 200 e 400mg/kg; v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes do zymosan). Dexametasona (Dexa, 4mg/kg, s.c.; 2h antes do zymosan). A incapacitação articular foi avaliada de hora em hora pelo Tempo de Suspensão da Pata (TSP) em segundos, até a 4ª hora após a administração do zymosan. Os dados representam média do TSP \pm EPM de 6 animais por grupo. (A) cinética da incapacitação articular; (B) pico de incapacitação articular (maior valor obtido entre a 3ª e 4ª horas após a injeção de zymosan. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ relação ao grupo controle (ANOVA, seguida de Newman-Keuls).

Efeito do pré-tratamento com óleo de pequi (OPCC), em dose única, sobre o influxo de leucócitos na artrite induzida por zymosan em joelho de rato

O infiltrado leucocitário na cavidade articular foi avaliado no tempo de 4 h após a injeção de 1mg/kg de zymosan. O tratamento com o OPCC nas doses de 100, 200 e 400mg/kg, 45 minutos antes da indução da AIZy inibiu, de forma significativa ($p < 0,05$) o influxo de leucócitos medido na 4ª hora ($17,83 \pm 1,60$; $11,68 \pm 1,05$; $14,22 \pm 1,06$, respectivamente) de artrite, em relação ao grupo controle ($24,00 \pm 1,64$) (**Figura 9A**). A administração da dexametasona na dose de 4mg/kg, via s.c., 2 horas antes de induzir a reação inflamatória, inibiu de forma significante ($p < 0,05$) o influxo de leucócitos, medido na 4ª hora ($6,68 \pm 2,09$) de artrite (**Figura 9**), sendo menor em relação ao grupo controle ($24,00 \pm 1,64$).

Quanto à contagem diferencial de leucócitos observou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de células polimorfonucleares de 47,78% para o grupo que recebeu a dose de 100mg/kg ($7,30 \pm 0,72$) de OPCC; 57,73% para o grupo que recebeu 200mg/kg ($5,91 \pm 0,82$) de OPCC; e 62,87% para o grupo que recebeu 400mg/kg de OPCC ($5,19 \pm 0,57$), 45 minutos antes da indução da AIZy, comparados ao grupo controle ($13,99 \pm 1,16$) (**Figura 9B**). Administração da dexametasona na dose de 4mg/kg ($5,69 \pm 0,28$), via s.c., 2 horas antes de induzir a reação inflamatória, inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) em 59, 29% o influxo de células em relação ao grupo controle ($13,99 \pm 1,16$).

Figura 9: Efeito do pré-tratamento com óleo de pequi (OPCC), em dose única, sobre o influxo de leucócitos na artrite induzida por zymosan em joelho de rato.



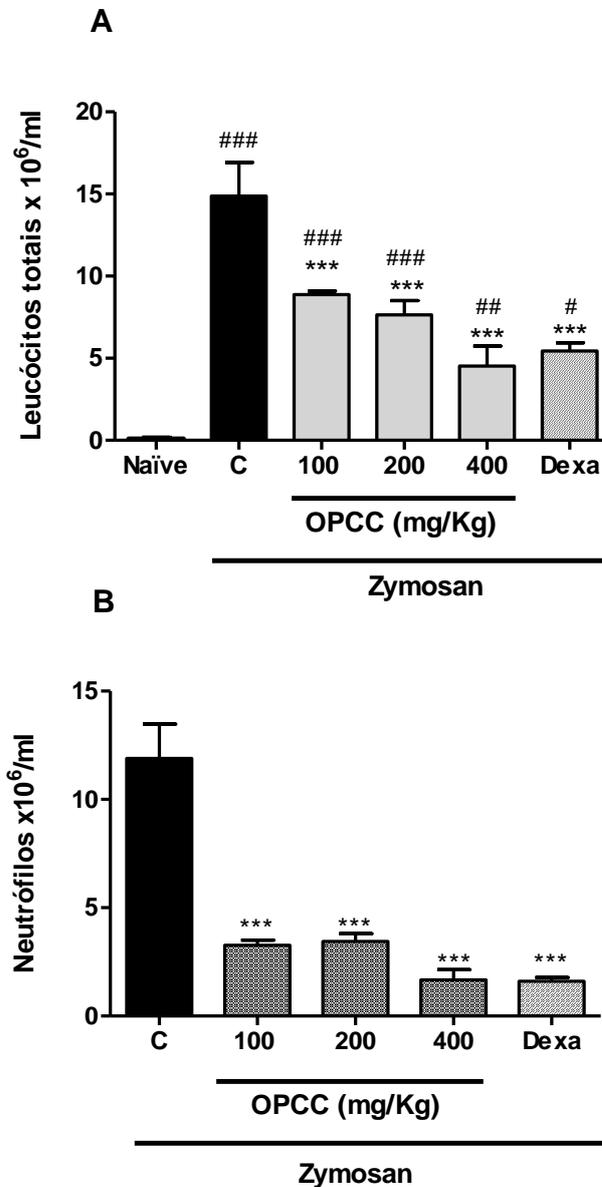
Todos os grupos foram submetidos à artrite induzida por zymosan (1 mg/animal; 50 µl, i.a). Água (Controle, C, 1ml/animal, v.o.; 45 min antes do zymosan, dose única), OPCC (100, 200 e 400mg/kg, v.o.; 45 min antes, dose única) ou Dexametasona (Dexa, 4mg/kg, s.c.; 2h antes do zymosan). O grupo NAIVE representa os animais que não receberam nenhum estímulo intra-articular e nem tratamento. O número total de leucócitos foi quantificado no lavado articular após 4 horas. Os dados representam média do número de células ± EPM de 6 animais por grupo. (A) leucócitos totais; (B) Neutrófilos polimorfonucleares. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ relação ao grupo controle (ANOVA, seguida de Newman-Keuls). ### representa diferença significativa entre os grupos controle e tratados e o *naive*.

Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre o influxo de leucócitos na artrite induzida por zymosan em joelho de rato

O tratamento com o OPCC nas doses de 100, 200 e 400mg/kg, durante 7 dias consecutivos antes da indução da AIZy inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) o influxo de leucócitos medido na 4ª hora ($8,86 \pm 0,21$; $7,65 \pm 0,86$; $4,53 \pm 1,20$, respectivamente) de artrite, em relação ao grupo controle ($14,88 \pm 2,04$) (**Figura 10A**). A administração da dexametasona na dose de 4mg/kg, via s.c., 2 horas antes de induzir a reação inflamatória, inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) o influxo de leucócitos, medido na 4ª hora de artrite ($5,45 \pm 0,49$) (**Figura 10**), sendo menor em relação ao grupo controle ($14,88 \pm 2,04$).

Quanto à contagem diferencial de leucócitos observou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de células polimorfonucleares de 72,47% para o grupo que recebeu a dose de 100mg/kg ($3,27 \pm 0,23$) de OPCC; 71,04% para o grupo que recebeu 200mg/kg ($3,44 \pm 0,36$) de OPCC; e 85,94% para o grupo que recebeu 400mg/kg de OPCC ($1,67 \pm 0,47$), durante 7 dias consecutivos antes da indução da AIZy, comparado ao grupo controle ($11,89 \pm 1,59$) (**Figura 10B**). Administração da dexametasona na dose de 4mg/kg ($1,60 \pm 0,18$), via s.c., 2 horas antes de induzir a reação inflamatória, inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) em 86,53% o influxo de células em relação ao grupo controle ($11,89 \pm 1,59$).

Figura 10: Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a migração celular para a cavidade articular de ratos submetidos à artrite por zymosan.

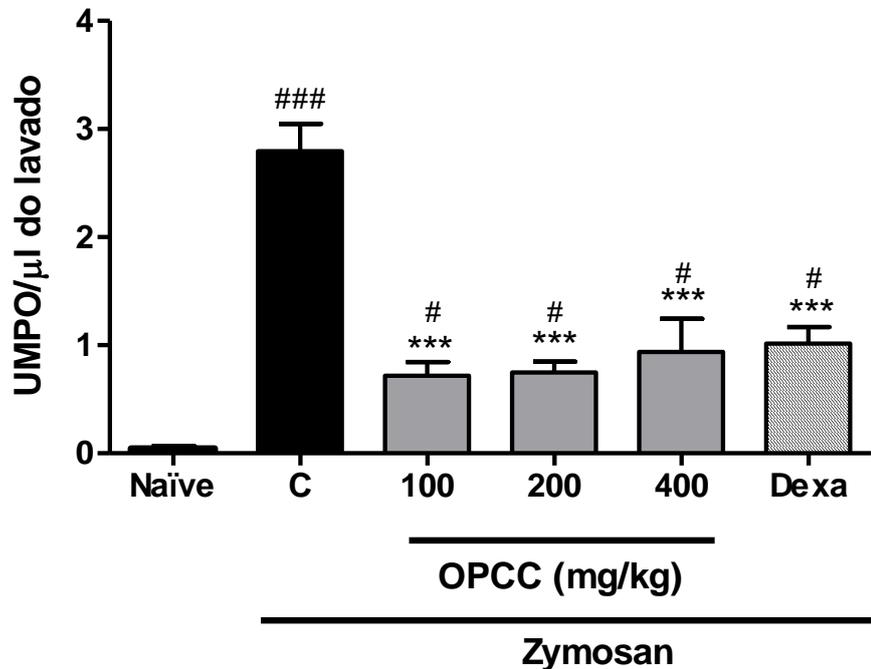


Todos os grupos foram submetidos à artrite induzida por zymosan (1 mg/animal; 50 µl, i.a). Água (Controle, C, 1ml/animal, v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes do zymosan), OPCC (100, 200 e 400mg/kg; v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes do zymosan). Dexametasona (Dexa, 4mg/kg, s.c.; 2h antes do zymosan). O grupo NAIVE representa os animais que não receberam nenhum estímulo intra-articular e nem tratamento. O número total de leucócitos foi quantificado no lavado articular após 4 horas. Os dados representam a média do número de células ± EPM de 6 animais por grupo. (A) leucócitos totais; (B) Neutrófilos polimorfonucleares. ***p<0,001 relação ao grupo controle (ANOVA, seguida de Newman-keuls). ### representa diferença significativa entre os grupos tratados e controle e o *naïve*.

Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre o a atividade de mieloperoxidase na artrite induzida por zymosan em joelho de rato

O tratamento com o OPCC (100, 200 e 400mg/kg), durante 7 dias consecutivos antes da indução da AIZy, comparado ao grupo controle ($2,79 \pm 0,25$) inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) a atividade de mieloperoxidase após a 4^a hora ($0,71 \pm 0,12$; $0,74 \pm 0,10$; $0,93 \pm 0,30$, respectivamente) de artrite. Administração da dexametasona na dose de 4mg/kg, via s.c., 2 horas antes de induzir a reação inflamatória, inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) a atividade de mieloperoxidase, após a 4^a hora ($1,01 \pm 0,15$) de artrite, comparado ao grupo controle ($2,79 \pm 0,25$), não havendo diferenças entre os grupos tratados com as diferentes doses do OPCC (**Figura 11**).

Figura 11: Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre o a atividade de mieloperoxidase (MPO) na artrite induzida por zymosan em joelho de rato.



Todos os grupos foram submetidos à artrite induzida por zymosan (1 mg/animal; 50 μ l, i.a). Água (Controle, C, 1ml/animal, v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes do zymosan), OPCC (100, 200 e 400mg/kg; v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes do zymosan). Dexametasona (Dexa, 4mg/kg, s.c.; 2h antes do zymosan). O grupo NAIVE representa os animais que não receberam nenhum estímulo intra-articular e nem tratamento. Avaliação da atividade de mieloperoxidase foi realizada no sobrenadante do líquido sinovial. Os resultados são expressos como unidade de MPO/ μ L do lavado. Os dados representam unidade de UMPO/ μ L do lavado \pm EPM de 6 animais por grupo. *** p <0,001 relação ao grupo controle (ANOVA, seguida de Newman-Keuls). ### representa diferença significativa entre o grupo controle e o *naïve*. # representa diferença significativa entre os grupos tratados e o *naïve*.

Efeito do pré-tratamento com óleo de pequi (OPCC), em dose única, sobre o edema articular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato

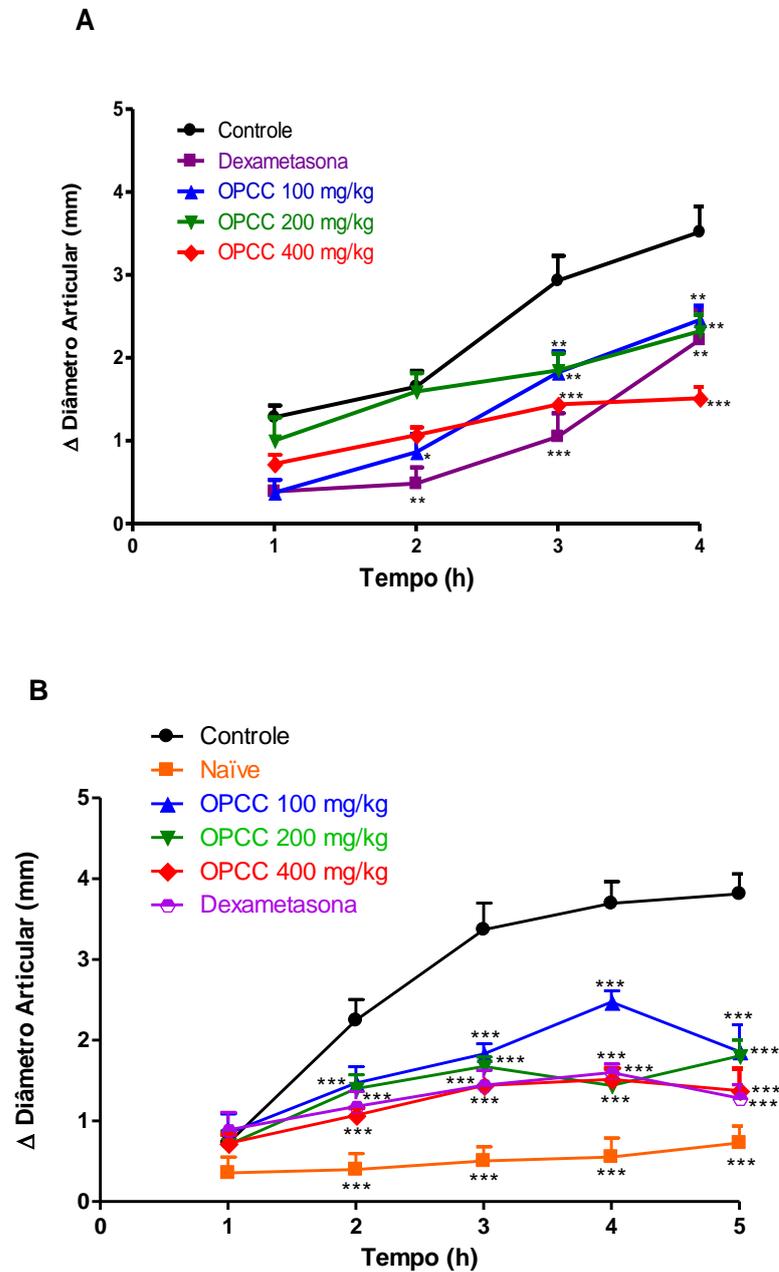
O edema foi mensurado na articulação do joelho injetado através da medida do diâmetro transversal de cada articulação. A dose do OPCC de 100mg/kg ($0,86 \pm 0,21$) administrada 45 minutos antes da indução da AIZy, apresentou redução significativa (p < 0,05) em relação ao grupo controle ($1,65 \pm 0,19$), a partir da 2ª hora, observando-se ainda uma redução significativa (p <0,05) na 3ª ($1,82 \pm 0,25$) e 4ª horas ($2,45 \pm 0,16$) em comparação ao grupo controle ($2,93 \pm 0,29$; $3,51 \pm 0,30$, respectivamente). Já as doses de 200mg/kg ($1,85 \pm 0,20$) e 400mg/kg ($1,43 \pm 0,06$) de OPCC, 45 minutos antes da AIZy, apresentaram redução

significativa em relação ao grupo controle ($2,93 \pm 0,29$) a partir da 3ª hora. Na 4ª hora as doses de 200mg/kg ($2,32 \pm 0,20$) e 400mg/kg ($1,51 \pm 0,13$) de OPCC reduziram o edema na 4ª hora em relação ao grupo controle ($3,51 \pm 0,30$). Administração da dexametasona ($0,48 \pm 0,19$) na dose de 4mg/kg, via s.c., 2 horas antes de induzir a reação inflamatória, inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) o edema a partir da 2ª hora em relação ao grupo controle ($1,65 \pm 0,19$). Na 3ª hora ($1,04 \pm 0,28$) e 4ª hora ($2,21 \pm 0,36$) também houve redução significativa em relação ao grupo controle ($2,93 \pm 0,29$; $3,51 \pm 0,30$, respectivamente) (**Figura 12A**).

Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre o edema na artrite induzida por zymosan em joelho de rato

As doses do OPCC de 200mg/kg ($1,40 \pm 1,17$) e 400mg/kg ($1,06 \pm 0,09$), administradas durante 7 dias consecutivos antes da indução da AIZy, apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) do edema em relação ao grupo controle ($2,24 \pm 0,25$), a partir da 2ª hora. Na 3ª hora as doses de 200mg/kg ($1,67 \pm 0,11$) e 400mg/kg ($1,43 \pm 0,06$) de OPCC também reduziram o edema em comparação ao grupo controle ($3,36 \pm 0,32$). A redução do edema foi observada ainda na 4ª hora nas doses de 200mg/kg ($1,43 \pm 0,21$) e 400mg/kg ($1,51 \pm 0,13$) de OPCC em relação ao grupo controle ($3,69 \pm 0,26$), assim como na 5ª hora onde foi observada redução significativa nas doses do OPCC de 200mg/kg ($1,80 \pm 0,19$) e 400mg/kg ($1,37 \pm 0,27$) em relação ao grupo controle ($3,96 \pm 0,25$). A dose de OPCC de 100mg/kg ($1,82 \pm 0,12$), apresentou redução significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($3,36 \pm 0,32$), a partir da 3ª hora, observando-se ainda uma redução significativa ($p < 0,05$) na 4ª ($2,47 \pm 0,13$) e 5ª horas ($1,85 \pm 0,33$) em comparação ao grupo controle ($3,69 \pm 0,26$; $3,96 \pm 0,25$, respectivamente). A administração da dexametasona ($1,17 \pm 0,18$) na dose de 4mg/kg, via s.c., 2 horas antes de induzir a reação inflamatória, inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) o edema a partir da 2ª hora em relação ao grupo controle ($2,24 \pm 0,25$). Na 3ª hora ($1,44 \pm 0,18$), na 4ª hora ($1,59 \pm 0,10$) e na 5ª hora ($1,28 \pm 0,16$) também houve redução significativa em relação ao grupo controle ($3,36 \pm 0,32$; $3,69 \pm 0,26$; $3,96 \pm 0,25$, respectivamente) (**Figura 12B**).

Figura 12: Efeito do pré-tratamento com óleo de pequi (OPCC), sobre o edema na artrite induzida por zymosan em joelho de rato.



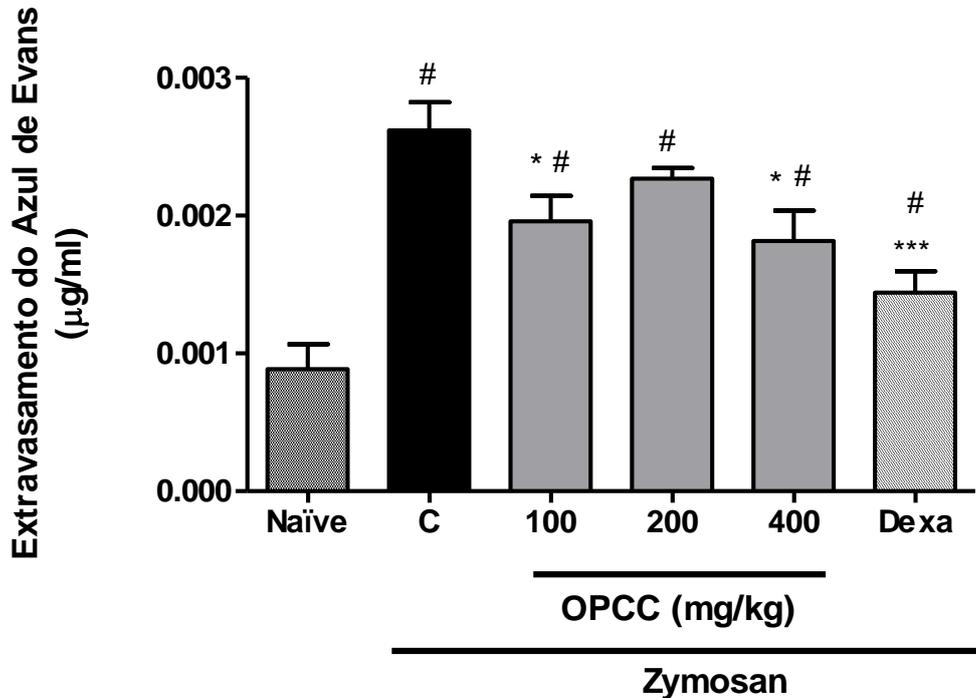
Todos os grupos foram submetidos à artrite induzida por zymosan (1 mg/animal; 50 μ l, i.a). Água (Controle, C, 1ml/animal, v.o.), OPCC (100, 200 e 400mg/kg, v.o.; 45 min antes, dose única) ou as doses de OPCC (100, 200 e 400mg/kg; v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes do zymosan) ou Dexametasona (Dexa, 4mg/kg, s.c.; 2h antes do zymosan). O grupo NAIVE representa os animais que não receberam nenhum estímulo intra-articular e nem tratamento. (A) diferença do edema das articulações (tratamento dose única); (B) diferença do edema das articulações (tratamento 1 vez ao dia, durante 7 dias). Os dados representam a média da diferença do edema \pm EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ relação ao grupo controle (ANOVA, seguida de Newman-Keuls).

Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a permeabilidade vascular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato

O influxo celular no líquido sinovial é acompanhado de aumento da permeabilidade vascular no joelho dos animais, apresentando pico de extravasamento plasmático na 6ª h após indução da AIZy de forma significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

A AIZy no joelho dos ratos aumentou significativamente a permeabilidade vascular do grupo controle ($0,0026 \pm 0,0002$), quando comparado ao grupo naïve ($0,0008 \pm 0,0001$). Por outro lado o pré-tratamento com OPCC nas doses de 100mg/kg ($0,0019 \pm 0,0001$) e 400mg/kg ($0,0018 \pm 0,0002$), administradas durante 7 dias consecutivos, reduziu significativamente ($p < 0,05$) a permeabilidade vascular comparados ao grupo controle ($0,0026 \pm 0,0002$). Administração da dexametasona ($0,0014 \pm 0,0001$) na dose de 4mg/kg, via s.c., 2 horas antes de induzir a reação inflamatória, inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) o aumento da permeabilidade vascular, medida na 6ª hora após a indução da artrite em comparação ao grupo controle ($0,0026 \pm 0,0002$) (**Figura 13**).

Figura 13: Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a permeabilidade vascular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato.

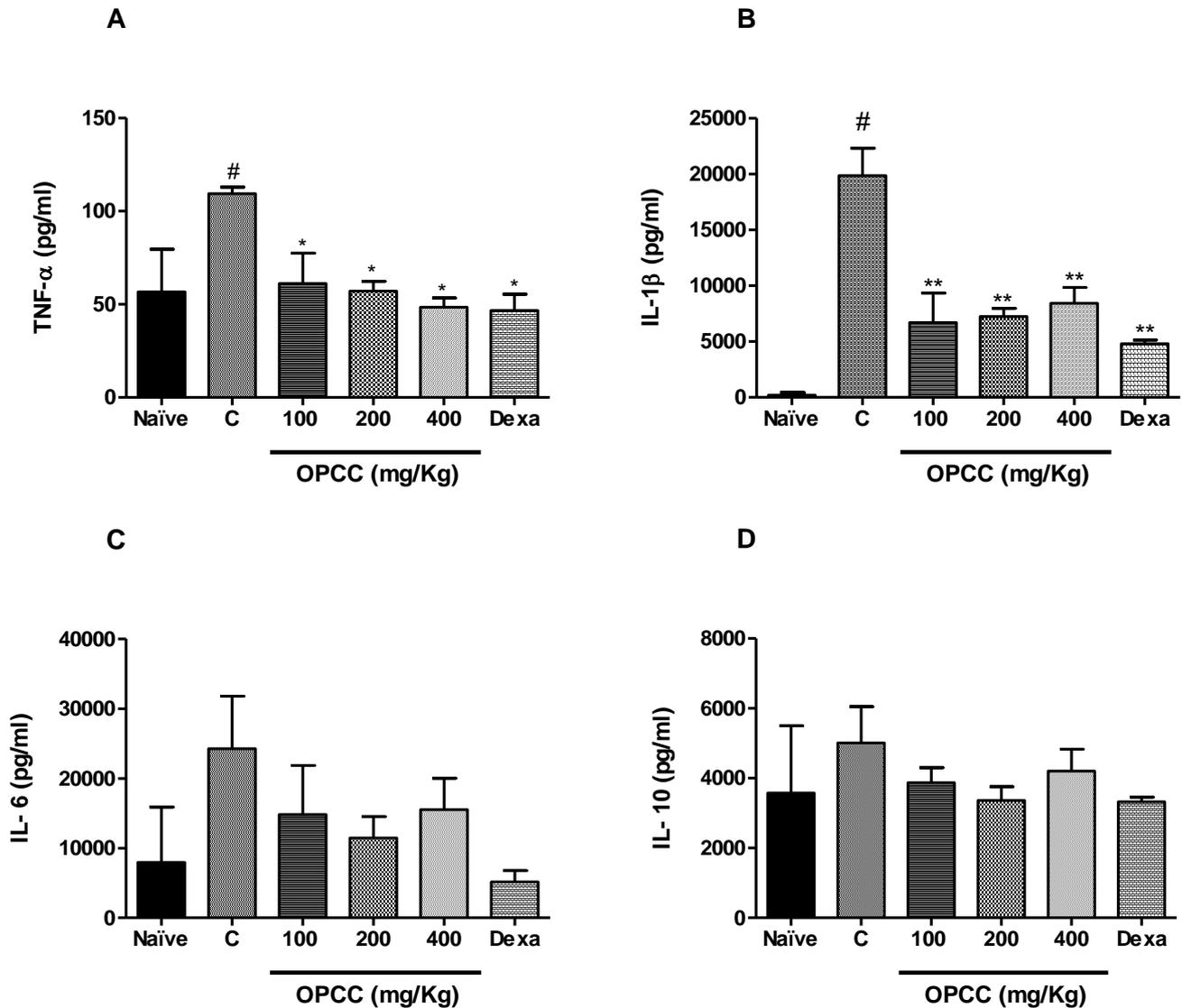


Todos os grupos foram submetidos à artrite induzida por zymosan (1 mg/animal; 50 µl, i.a). Água (Controle, C, 1ml/animal, v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes do zymosan), OPCC (100, 200 e 400mg/kg; v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes do zymosan). Dexametasona (Dexa, 4mg/kg, s.c.; 2h antes do zymosan). O grupo NAIVE representa os animais que não receberam nenhum estímulo intra-articular e nem tratamento. Os resultados estão expressos em µg/ml. Os dados representam a média da quantidade do extravasamento de azul de Evans ± EPM de 6 animais por grupo. * p<0,05 ***p<0,001 relação ao grupo controle (ANOVA, seguida de Newman-Keuls). # representa diferença estatística entre o grupos controle e tratados do *naïve*.

Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a liberação de citocinas na artrite induzida por zymosan em joelho de rato

A AIZy aumentou significativamente ($p < 0,05$) os níveis de TNF- α ($109,40 \pm 3,49$) e IL-1 β (19874 ± 2450), quando comparado ao grupo *naïve* ($79,44 \pm 4,33$; 4248 ± 4054 , respectivamente). As doses de 100mg/kg ($61,15 \pm 16,27$; 6691 ± 2655), 200mg/kg ($57,04 \pm 5,27$; $7233 \pm 733,1$) e 400mg/kg ($57,62 \pm 9,85$; 8435 ± 1403) de OPCC, administradas durante 7 dias consecutivos antes da indução da AIZy, bem como a administração de 4mg/kg de dexametasona ($46,68 \pm 8,72$; $4811 \pm 319,6$), via s.c., 2 horas antes da reação inflamatória, reduziu significativamente ($p < 0,05$) os níveis de TNF- α e IL-1 β no líquido sinovial de joelho de rato submetidos AIZy comparados ao grupo controle ($109,40 \pm 3,49$; 19874 ± 2450 , respectivamente) (**Figuras 14A e 14B**, respectivamente). Quando comparado ao grupo *naïve* os níveis de TNF- α e IL-1 β dos grupos tratados não apresentaram diferença significativa, no entanto, os níveis de IL-6 (**Figura 14C**) apesar de apresentarem-se diminuídos não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados comparado ao grupo controle e grupo *naïve*. Os níveis de IL-10 foram semelhantes nos grupos tratados com OPCC (100, 200 e 400mg/kg) e dexametasona (4mg/kg), entretanto não apresentou diferença significativa em ambos, o grupo *naïve* bem como o grupo controle (**Figura 14D**). As citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4 e GM-CSF, não foram detectadas nas amostras.

Figura 14: Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a produção de citocinas na artrite induzida por zymosan em joelho de rato

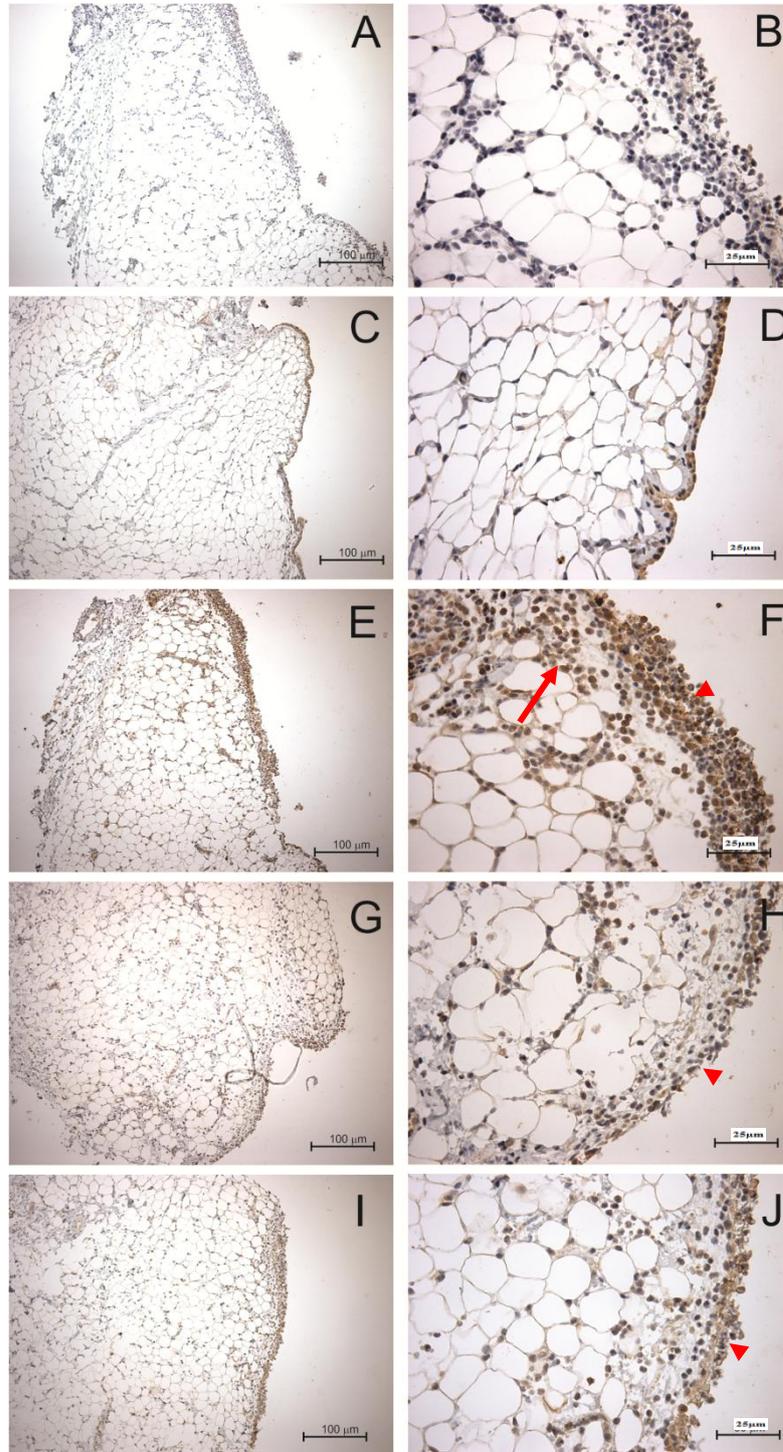


Todos os grupos foram submetidos à artrite induzida por zymosan (1 mg/animal; 50 μ l, i.a). Água (Controle, C, 1ml/animal, v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes do zymosan), OPCC (100, 200 e 400mg/kg; v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes do zymosan). Dexametasona (Dexa, 4mg/kg, s.c.; 2h antes do zymosan). O grupo NAÏVE representa os animais que não receberam nenhum estímulo intra-articular e nem tratamento. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os dados representam a média da concentração de citocinas (TNF- α (A); IL-1 β (B); IL-6 (C); e IL-10(D) \pm EPM de 6 animais por grupo. * p <0,05 e ** p <0,01 relação ao grupo controle (ANOVA, seguida de Newman-keuls). # representa diferença estatística entre o grupo controle e o *naïve*.

Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a imunexpressão de TNF- α e COX-2 em tecido sinovial

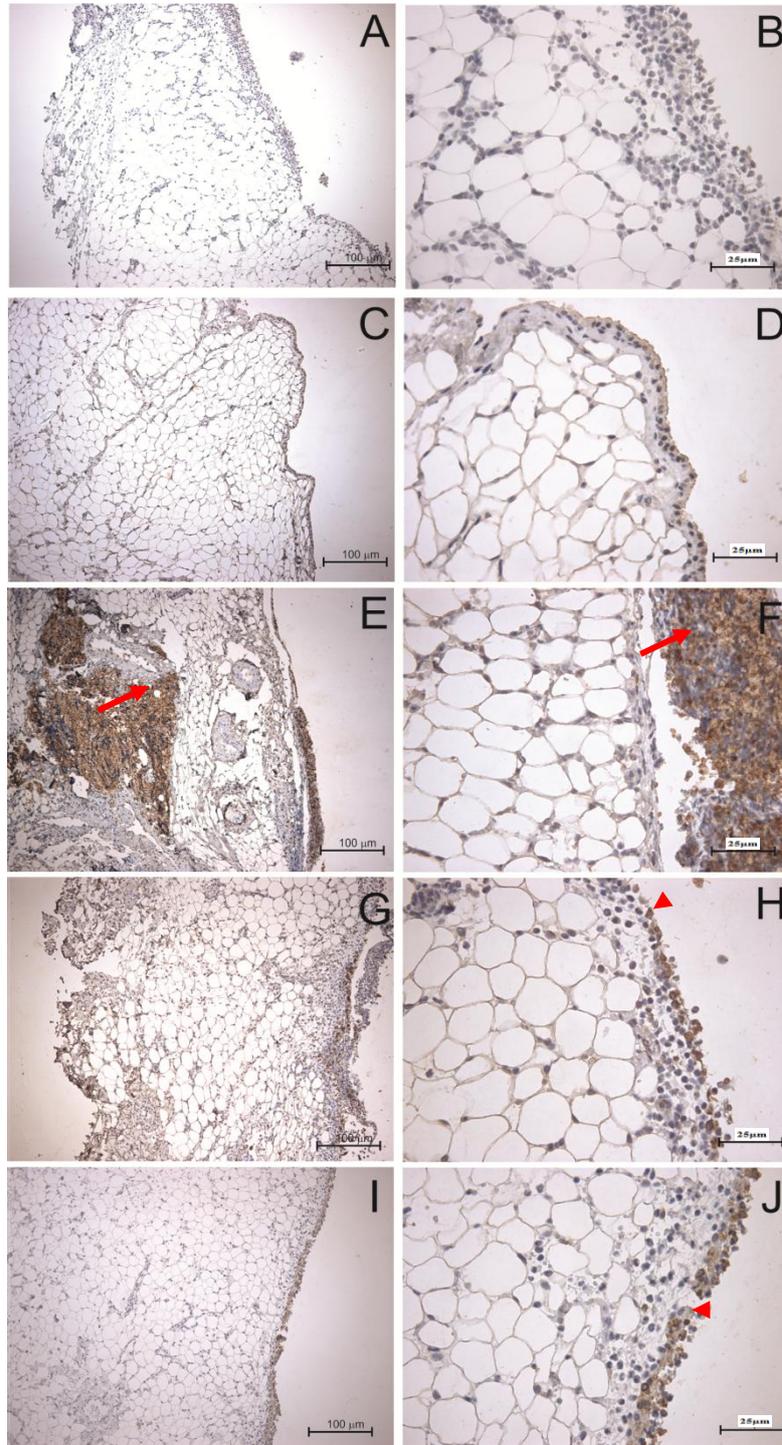
A análise imunohistoquímica das sinovias dos grupos testados demonstrou perfis imunológicos distintos entre os grupos. Membranas sinoviais de animais do grupo naïve ($0,50 \pm 0,22$; $0,33 \pm 0,21$) apresentaram estrutura normal, com pouca presença de infiltrado celular com uma leve imunexpressão de TNF- α (**Figura 15, C e D**) e COX-2 (**Figura 16, C e D**) em relação ao grupo controle ($1,83 \pm 0,16$; $2,16 \pm 0,30$). Membranas do grupo controle (AIZy, $1,83 \pm 0,16$; $2,16 \pm 0,30$) apresentaram intenso infiltrado celular com marcada expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α (**Figura 15, E e F**) e da isoforma induzida da enzima COX-2 (**Figura 16, E e F**), quando comparado ao grupo naïve ($0,50 \pm 0,22$; $0,33 \pm 0,21$). A **figura 15 (G e H)** e a **figura 16 (G e H)** representam cortes imunohistoquímica de membrana sinovial de animal submetido à AIZy e tratado durante 7 dias consecutivos com doses de 200mg/kg ($1,33 \pm 0,21$; $1,50 \pm 0,34$) de OPCC, onde foi observada diminuição do infiltrado celular com consequente diminuição da expressão de TNF- α e COX-2 em comparação ao grupo controle ($1,83 \pm 0,16$; $2,16 \pm 0,30$). A análise por imunohistoquímica das membranas sinoviais de animais tratadas com dexametasona ($1,33 \pm 0,21$; $1,16 \pm 0,30$) na dose de 4mg/kg, via s.c., 2 horas antes de induzir a reação inflamatória demonstrou diminuição da expressão de TNF- α e COX-2 (**Figuras 15 e 16, I e J**, respectivamente) coparado ao grupo controle ($1,83 \pm 0,16$; $2,16 \pm 0,30$). As **figuras 15 e 16 A e B** representam o controle positivo. A diminuição ($p < 0,05$) da expressão de TNF- α e COX-2 pode ser observada na **figura 17A e 17B**, respectivamente.

Figura 15: Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a reação de imunohistoquímica em tecido sinovial para TNF- α , em aumento de 100 e 400x, respectivamente



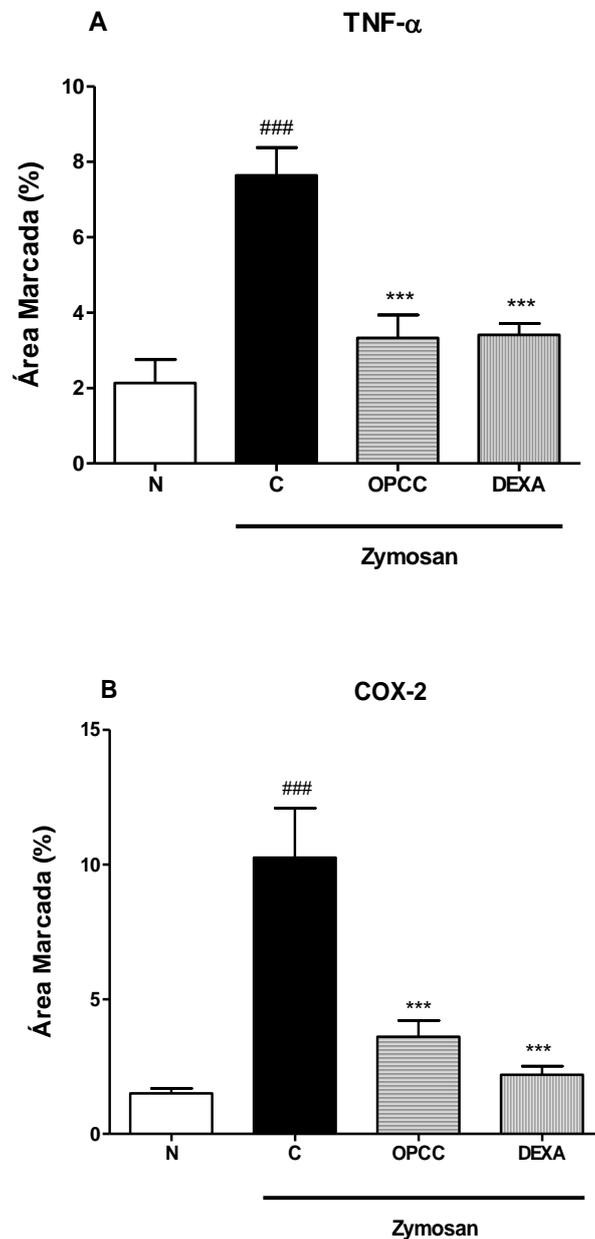
(A e B) representam grupo controle negativo (sem anticorpo primário); (C e D) representam grupo naïve. (E e F) representam grupo controle, cabeças de seta indicam espessamento da membrana sinovial e a seta indica presença de infiltrado inflamatório; (G e H) representam o grupo tratado com OPCC 200mg/kg (I e J) representam grupo tratado com dexametasona, 4mg/kg.

Figura 16: Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a reação de imunohistoquímica em tecido sinovial para COX-2, em aumento de 100 e 400x, respectivamente



(A e B) representam grupo controle negativo; (C e D) representam grupo naïve. (E e F) representam grupo controle, cabeças de seta indicam espessamento da membrana sinovial e a seta indica presença de infiltrado inflamatório; (G e H) representam o grupo tratado com OPCC 200mg/kg (I e J) representam grupo tratado com dexametasona, 4mg/kg.

FIGURA 17: Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a imunoexpressão de TNF- α e COX-2, em tecido sinovial de ratos submetidos a artrite induzida por zymosan

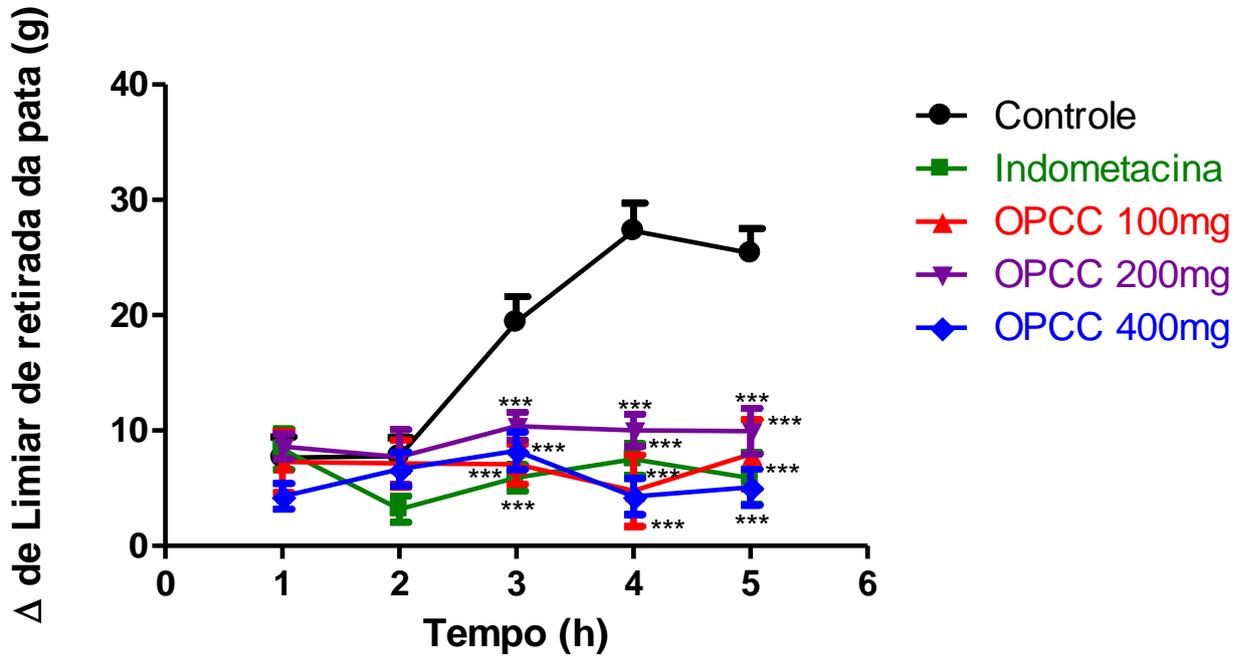


Todos os grupos receberam injeção intrarticular de zymosan (1mg/50 μ L). Água (Controle, 1ml/animal, v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes do zymosan) ou OPCC (200mg/kg; v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes do zymosan). Dexametasona (Dexa, 4mg/kg, s.c.; 2h antes do zymosan). O grupo NAIVE (N) representa os animais que não receberam nenhum estímulo intra-articular e nem tratamento. Os dados representam a porcentagem de área marcada \pm EPM de 6 animais por grupo. (A) TNF- α ; (B) COX-2. *** $p < 0,001$ relação ao grupo controle (ANOVA, seguida de Newman-keuls). ### representa diferença significativa entre o grupo controle e o *naïve*.

Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a hipernocicepção mecânica plantar induzida por carragenina

Todas as doses do OPCC de 100mg/kg ($7,95 \pm 3,00$), 200mg/kg ($9,93 \pm 1,97$) e 400mg/kg ($5,08 \pm 1,56$), administradas durante 7 dias consecutivos antes da indução do estímulo inflamatório pela carragenina (300 μ g/pata, via i.pl.), foram capazes de prevenir de forma significativa ($p < 0,001$), a partir da 3^a hora, a hipernocicepção mecânica plantar, que foi mensurada através do aumento do limiar nociceptivo do animal, quando comparadas ao grupo controle ($25,38 \pm 2,13$). A indometacina ($5,88 \pm 2,24$) na dose de 10mg/kg, v.o., 45 minutos antes de induzir a reação inflamatória, inibiu de forma significativa ($p < 0,001$) a partir da 3^a hora, a hipernocicepção, sendo que os valores obtidos para esse grupo foram menores em relação aos valores obtidos do grupo controle ($25,38 \pm 2,13$) (**Figura 18**).

Figura 18: Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a hipernociceção mecânica plantar induzida por carragenina.

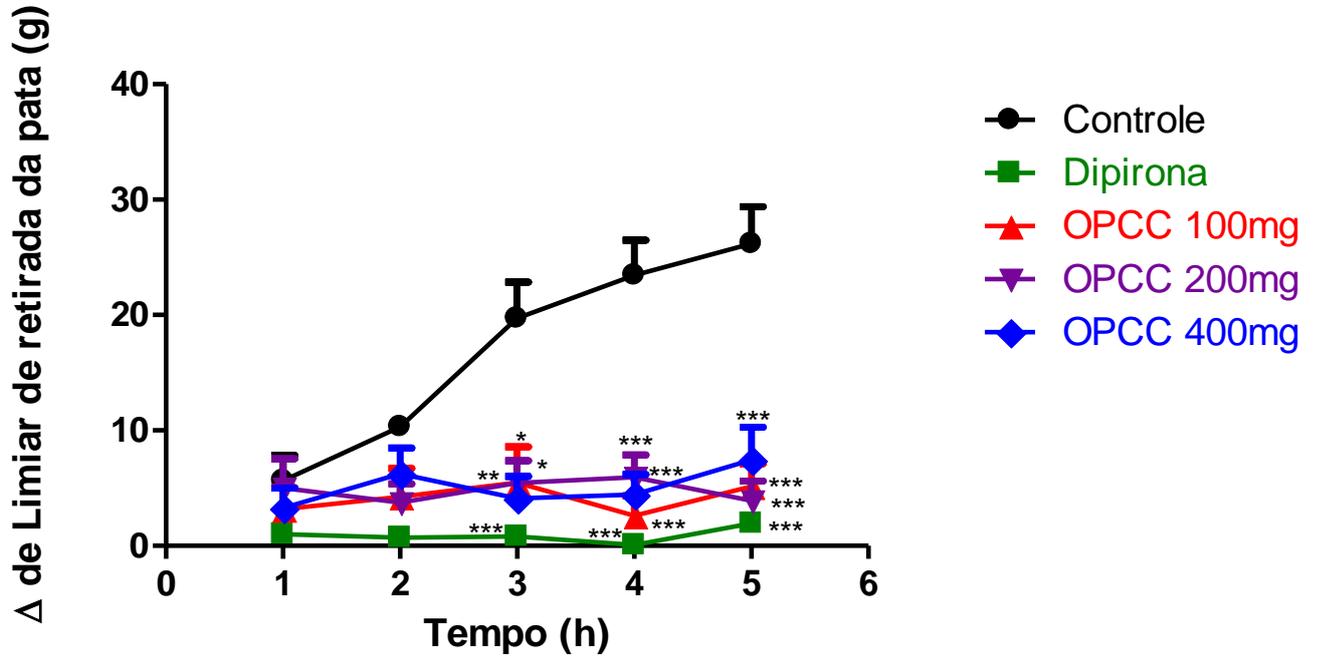


Todos os grupos receberam injeção intraplantar de carragenina (300 μ g/pata). Água (Controle, 1ml/animal, v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes da carragenina) ou OPCC (100, 200 e 400mg/kg; v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes da carragenina). Indometacina (10mg/kg, v.o.; 45 min antes da carragenina). O teste nociceptivo (hipernociceção mecânica plantar - Von-Frey Eletrônico) foi realizado a cada 1 hora até a 5ª hora. Os dados representam a média do limiar de retirada da pata em gramas (intensidade da hipernociceção) \pm EPM de 6 animais por grupo. ***p<0,001 relação ao grupo controle (ANOVA, seguida de Newman-Keuls).

Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a hipernocicepção mecânica plantar induzida por PGE2

Todas as doses do OPCC 100mg/kg ($4,90 \pm 1,80$), 200mg/kg ($3,93 \pm 1,67$) e 400mg/kg ($7,56 \pm 2,89$), administradas durante 7 dias consecutivos antes da indução do estímulo nociceptivo (PGE2, 400ng/pata, via i.pl.), foram capazes de prevenir de forma significativa ($p < 0,05$), a partir da 3^a hora, a hipernocicepção mecânica plantar, que foi mensurada através do aumento do limiar nociceptivo do animal, quando comparadas ao grupo controle ($26,68 \pm 3,27$). O grupo tratado com dipirona ($1,96 \pm 0,92$) na dose de 80mg/kg, v.o., 45 minutos antes de induzir a o estímulo nociceptivo, inibiu de forma significativa ($p < 0,001$), a partir da 3^a hora, a hipernocicepção, sendo que os valores obtidos para esse grupo foram menores em relação aos valores obtidos do grupo controle ($26,68 \pm 3,27$) (**Figura 19**).

Figura 19: Efeito do óleo de pequi (OPCC), em doses repetidas, sobre a hipernociceção mecânica plantar induzida por PGE2.



Todos os grupos receberam a injeção intraplantar de PGE2 (400ng/pata; via i.pl.). Água (Controle, 1ml/animal; v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes da PGE2), OPCC (100, 200 e 400mg/kg; v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes da PGE2). Dipirona (80mg/kg; v.o.; 45 min antes da PGE2). O teste nociceptivo (hipernociceção mecânica plantar - Von-Frey Eletrônico) foi realizado a cada 1 hora até a 5ª hora. Os dados representam a média do limiar de retirada da pata em gramas (intensidade da hipernociceção) \pm EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $P < 0,001$ relação ao grupo controle (ANOVA, seguida de Newman-Keuls).

5. DISCUSSÃO

A análise do OPCC através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas revelou a presença de ácidos graxos saturados e insaturados. Esta espécie, bem como outras do mesmo gênero, distribuídos por outras regiões, como por exemplo, *C. brasiliense*, mostra o conteúdo de ácidos graxos variáveis, isso pode ser atribuído, principalmente, devido à localização geográfica e as condições climáticas. Os constituintes identificados no *C. caryocar* (OPCC) foram os ácidos graxos seguintes: ácido oleico, ácido palmítico, ácido heptadecenoico, ácido linoleico e ácido esteárico. Sendo o principal ácido graxo encontrado no OPCC, o ácido oleico, seguido pelo ácido palmítico. Estudos mostram que a constituição do OPCC não muda sendo variável apenas a porcentagem dos constituintes, mas que as proporções dos mesmos não se alteram permanecendo o ácido oleico e palmítico os constituintes majoritários (COSTA *et al.*, 2011).

O zymosan, produz uma sinovite grave e erosiva associada a aumentos na permeabilidade vascular aguda, formação de edema, migração de leucócitos e hipernocicepção (ROCHA *et al.*, 1999). A utilização do modelo experimental de artrite induzida por zymosan se justifica pela sua proximidade em relação as principais características clínicas encontradas na artrite reumatoide em seres humanos. Os efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivo do OPCC foram verificados no modelo de artrite induzida por zymosan em ratos e o teste de hipernocicepção mecânica plantar. Para avaliar o efeito antinociceptivo do OPCC na artrite induzida por zymosan, utilizamos o teste de incapacitação articular no joelho de ratos. Esse teste foi desenvolvido para estudar a incapacitação articular, definida como a incapacidade do animal, com artrite induzida experimentalmente, de deambular normalmente, mensurada através do tempo de suspensão de pata (TONUSSI e FERREIRA, 1992). No presente estudo, assumimos que a incapacitação articular reflete hipernocicepção na sequência de um insulto inflamatório na articulação.

Na hipernocicepção causada pela artrite induzida por zymosan, apenas a dose de 400mg/kg (tratamento agudo) do OPCC apresentou uma diminuição do tempo de suspensão da pata. O grupo tratado com OPCC (400mg/kg) conseguiu prevenir à incapacitação, refletindo um efeito antinociceptivo do óleo. Avaliamos então o pico de incapacitação, que corresponde ao maior valor da 3ª ou 4ª hora. Verificamos que os grupos tratados com OPCC 200 e 400mg/kg demonstraram inibição da incapacitação articular, quando comparado ao grupo controle (animais não tratados e com artrite). Saraiva e colaboradores (2009) relatam que o uso tópico do OPCC tem efeito anti-inflamatório nos modelos de edema de orelha induzido por diferentes agentes irritantes (óleo de cróton, a capsaicina, o ácido araquidônico,

o fenol e histamina), apontando possíveis propriedades terapêuticas do OPCC no tratamento de inflamações cutâneas agudas, fornecendo indícios de propriedades importantes, como a absorção e a possível ação local, devido a sua aplicação direta no foco inflamatório. Esse dado pode corroborar com este estudo, uma vez que, possuindo atividade anti-inflamatória local, há grande possibilidade de o OPCC também possuir atividade anti-inflamatória sistêmica. Além do pré-tratamento em dose única antes da artrite induzida por zymosan, realizamos também um pré-tratamento em doses diárias de OPCC (100, 200 e 400mg/kg), v.o., durante 7 dias consecutivos antes da indução da artrite por zymosan. Esse protocolo de tratamento crônico através de injeções diárias adotado no nosso estudo foi sugerido tendo em vista o trabalho realizado por Saraiva (2009), onde foi observado que as doses orais únicas não inibiram o edema de pata induzido por carragenina, mas supõe-se que uma administração crônica poderia ser eficaz. Com o protocolo de injeções diárias de OPCC, o tempo de suspensão da pata foi inibido em todos os grupos tratados com diferentes doses do OPCC. Quando avaliamos o pico de incapacitação articular, verificamos que todas as doses de OPCC foram eficazes na prevenção da incapacitação articular. Observamos que a dose de 400mg/kg obteve o melhor resultado entre os grupos tratados com o OPCC.

Originalmente, a artrite induzida por zymosan foi descrita por Keystone, em 1977, este agente é amplamente utilizado em estudos experimentais como agente flogístico, causando inflamação aguda ou subaguda em várias espécies animais. O processo inflamatório agudo é caracterizado por um aumento na permeabilidade vascular, infiltração celular e produção de eicosanóides. Os processos subagudos, especialmente nas articulações sinoviais, caracterizam-se por infiltração de células mononucleares, liberação de enzimas lisossomiais a partir de células inflamatórias migradas para o local, e proliferação de fibroblastos com formação de pannus (GEGOUT *et al.*, 1994). Através da aplicação do modelo de artrite induzida por zymosan, foi demonstrado que a incapacitação articular gerada nesse modelo está associada à ativação de nociceptores localizados em estruturas periarticulares e não na sinóvia. Foi demonstrado ainda, que o desenvolvimento da incapacitação articular (hipernocicepção) se associou diretamente com a migração de neutrófilos para a cavidade articular (ROCHA *et al.*, 1999). A hipernocicepção tem sido o principal componente investigado nesse modelo. A inibição da migração de células polimornucleares e, conseqüentemente a inibição da sequência de liberação de mediadores da hipernocicepção inflamatória iniciados pelo TNF- α , provoca liberação de IL-1 β e quimiocinas que por sua vez estimulam a liberação direta de mediadores como prostaglandinas, que atuam no nociceptor,

sendo elementos importantes para a produção de hipernocicepção (CUNHA FQ *et al.*, 1992; ZARPELON *et al.*, 2013). Eicosanóides e TNF- α estão envolvidos na gênese da incapacitação articular do joelho (TONUSSI e FERREIRA, 1992; ROCHA *et al.*, 1999). Gegout e colaboradores (1995) sugerem que glicocorticóide pode ser uma droga poderosa para prevenir destruição da cartilagem e para diminuir os primeiros sinais de inflamação no modelo de artrite induzida por zymosan. Mas os benefícios devem ser interpretados com cautela, devido à observação de efeitos indesejáveis, como, alterações de peso, inibição do anabolismo, da síntese de proteoglicanos na cartilagem saudável, bem como o efeito prejudicial na matriz óssea. Sugerem ainda que nesse modelo possam ser utilizadas ainda drogas que tem seu efeito sobre as vias da COX ou LOX, sem os efeitos colaterais dos esteroides. Antagonistas e inibidores de LTB₄, também podem ser de grande relevância deste alvo farmacológico para proteger a cartilagem em artrites crônicas (ROCHA *et al.*, 2004).

Os dados do presente trabalho sugerem uma ação antinociceptiva do OPCC, o qual pode agir através da inibição de mediadores hipernociceptivos intermediários, tais como citocinas/quimiocinas e hipernociceptivos finais. Tolver e colaboradores (2012) relatam que a dexametasona modula a resposta inflamatória inibindo mediadores pró-inflamatórios, tais como interleucinas e TNF- α e também a migração de leucócitos. A comparação entre os dados sobre o tratamento de dose única e doses repetidas sugere que a administração de doses diárias de OPCC pode levar a um acúmulo da substância no organismo prevenindo o aparecimento de hipernocicepção, tendo em vista que quando tratados diariamente com as diferentes doses do OPCC os animais apresentaram diminuição do quadro de hipernocicepção. Que por outro lado, quando tratados com uma única dose, apenas as doses mais elevadas do OPCC conseguiram prevenir a hipernocicepção causada pela artrite induzida por zymosan.

A ação antinociceptiva do OPCC pode ainda ser o resultado de uma atividade anti-inflamatória que pode ser desempenhada pela ação de ácidos graxos presentes no OPCC. Sales, Oliviero e Spinella (2009) relatam que a dieta do mediterrâneo, que é fundamentada em azeite de oliva (rico em ácido oleico), sendo este constituinte provavelmente o responsável por reduzir a dor e rigidez em pacientes com artrite. OPCC também possui como principal constituinte o ácido oleico, é provável que este consiga inibir a hipernocicepção causada por artrite induzida por zymosan. Nossos dados estão de acordo com os dados encontrados na literatura, que tem demonstrado que óleos ricos em ácidos graxos com presença do ácido

palmítico, que no OPCC é o segundo constituinte majoritário, apresenta atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (SHAH e ALAGAWADI, 2011).

Os leucócitos são muito importantes no processo inflamatório uma vez que são essas células responsáveis pela fagocitose e remoção de patógenos, no caso em que a inflamação é decorrente da presença ou ação de um agente infeccioso. Além disso, liberam mediadores químicos que estimulam o crescimento celular e a regeneração tecidual (SCHMID-SCHONBEIN, 2006). Os neutrófilos desempenham um papel importante nos distúrbios inflamatórios, como na artrite, contribuindo para o dano tecidual associado a estas doenças. Eles são as primeiras células do sistema imunológico a chegarem ao local do dano e são responsáveis pela eliminação do agente infeccioso (KITSIS e WEISSMANN, 1991).

Uma etapa fundamental do processo inflamatório é a migração dos leucócitos da circulação sanguínea para o tecido afetado. O recrutamento de leucócitos ocorre através da interação entre moléculas de adesão presentes nos mesmos e nas células endoteliais e por fatores quimioatraentes produzidos em resposta à infecção (FUHLBRIGGE e WEISHAUP, 2007). Há aumento da expressão das moléculas de rolamento na superfície das células endoteliais, as selectinas em resposta aos patógenos ou a citocinas produzidas pelos macrófagos ativados, principalmente TNF- α e IL-1 β , (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). O TNF- α e IL-1 β também promovem aumento da expressão endotelial de ligantes das integrinas, principalmente VCAM-1, ligante para integrina VLA-4, e ICAM-1, ligante para as integrinas LFA-1 e Mac-1 (FUHLBRIGGE e WEISHAUP, 2007). As quimiocinas então atuam sobre os leucócitos aderentes e estimulam as células a migrarem através dos espaços entre as células endoteliais em direção ao local da infecção, caracterizando a transmigração endotelial (ABBAS e LICHTMAN, 2012).

Os neutrófilos desempenham papel fundamental para a hiperalgesia. Pode-se sugerir, então, que a utilização de drogas que inibem a migração de neutrófilos para o foco inflamatório provavelmente seria uma alternativa para o controle da dor, já que tais substâncias também são potencialmente capazes de modificar o processo fundamental de certas doenças inflamatórias que levam à lesão dos tecidos (FERREIRA *et al.*, 2009). O que foi evidenciado no estudo de Cunha JM e colaboradores (2003) essas drogas que inibem a síntese ou que antagonizam os receptores de leucotrieno B4 (LTB4), um dos mediadores responsáveis pela migração de neutrófilos para o foco inflamatório, além de inibirem efetivamente a migração de neutrófilos, previnem o desenvolvimento da hiperalgesia

inflamatória observada em processos inflamatórios que apresentam características de imunidade adaptativa, bem como em alguns modelos experimentais de artrite. A importância da presença dos neutrófilos na resposta inflamatória inata intensa ou na que acompanha as respostas adaptativas (por exemplo, artrite reumatoide) mostra a necessidade do desenvolvimento de drogas de ação imediata de curta duração (para não bloquear totalmente a defesa imunológica inata) para o controle dos sintomas e das lesões de várias doenças crônicas de origem imune (FERREIRA *et al.*, 2009).

O tratamento com todas as doses do OPCC, administradas uma única vez inibiu o influxo de leucócitos, evidenciando assim uma ação inibitória do OPCC na migração celular para o foco inflamatório. A inibição do número de leucócitos e neutrófilos pelo OPCC em doses diárias ocorreu de maneira mais acentuada do que a que foi observada no tratamento com apenas uma dose. Também foi observado uma diminuição da migração de neutrófilos com o tratamento do OPCC, evidenciado durante a contagem diferencial. No tratamento crônico com OPCC, a redução no influxo de leucócitos foi mais evidente do que o tratamento em dose única. Na contagem diferencial de leucócitos observamos uma diminuição de células polimorfonucleares com o tratamento do OPCC. O influxo de leucócitos totais no líquido sinovial do joelho dos animais foi acompanhado pelo aumento da atividade de mieloperoxidase, uma enzima presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos e que é utilizada como marcador indireto da infiltração neutrofílica local (BRADLEY *et al.*, 1982). No entanto, o tratamento crônico com todas as doses de OPCC, inibiu a atividade de mieloperoxidase na artrite induzida por zymosan, não havendo diferenças entre os grupos tratados com as diferentes doses do OPCC.

As primeiras citocinas descritas como participante do desenvolvimento de dor inflamatória foram a IL-1 β , o TNF- α , a IL-6, e a quimiocina humana (IL-8), que em ratos a correspondente é a quimiocina induzida por neutrófilo quimioatratador-1 (CINC-1) e em camundongos, corresponde a quimiocina derivada de queratinócito (KC). Posteriormente, foi demonstrado que a IL-18 e IL-12 também induzem hipernocicepção inflamatória (VERRI *et al.*, 2006). Embora a IL-17 seja uma citocina importante na fisiopatologia e na gênese de nocicepção da artrite reumatoide, no modelo de artrite induzida por zymosan esta citocina não participa da hipernocicepção (PINTO *et al.*, 2010). Por outro lado, existem também citocinas anti-inflamatórias e anti-hiperalgésicas, tais como a IL-10 (CUNHA FQ, MONCADA e LIEW, 1992), IL-4 (CUNHA FQ *et al.*, 1999), IL-13 (VALE *et al.*, 2003). Essas citocinas inibem a produção de citocinas hipernociceptivas e/ou mediadores hipernociceptivos finais,

impedindo a instalação ou aumento da hipernocicepção (VALE *et al.*, 2003). No modelo de artrite por zymosan foi demonstrado o efeito antinociceptivo dessas três citocinas, bem como a importância da sua produção endógena para o controle da incapacitação articular induzida por zymosan (VALE *et al.*, 2003)

No presente estudo foram mensurados os níveis de citocinas no líquido sinovial que podem ter influência na resposta inflamatória desencadeada pela artrite reumatoide. O TNF- α e a IL-1 β desempenham papel chave na imunopatogenia na artrite gerando degradação da cartilagem e promovendo ativação endotelial e celular (BRENNAN e MCINNES, 2008; BEVAART, VERVOORDELONK e TAK, 2010). Já está estabelecido que o TNF- α tem um papel pivô na gênese da hipernocicepção mecânica inflamatória em ratos (CUNHA FQ *et al.*, 1992) e a resposta nociceptiva nas contorções em camundongos (RIBEIRO *et al.*, 2000). Estudos confirmam que o TNF- α tem um papel importante na dor inflamatória articular e que drogas, que inibem a produção dessa citocina, como a talidomida (MOREIRA *et al.*, 1993), tem uma ação analgésica eficaz devido a sua capacidade de inibir a produção de TNF- α pelas células sinoviais (VALE *et al.*, 2006). Smolen (2009), em uma revisão sobre o infliximab, um antagonista do TNF- α , relata que o seu uso apresenta uma rápida redução de sinais e sintomas, bem como rápida normalização da proteína C reativa (CRP) nos pacientes com artrite reumatoide que responderam ao tratamento. O etanercept (receptor solúvel do TNF- α) outro agente bloqueador de TNF- α , também é bastante usado no tratamento da artrite reumatoide. Recentes revisões acerca do uso do etanercept relatam que sua administração diminui a progressão de erosões ósseas. Mas que seu uso concomitante com drogas modificadoras da doença proporcionam uma melhor resposta ao tratamento, sendo evidenciado um retardo na progressão radiográfica das articulações depois de até três anos de tratamento para todos os participante (LETHABY *et al.*, 2013; LISBONA *et al.*, 2013). Vale e colaboradores (2004) relatam ainda que o pré-tratamento com pentoxifilina reduz a hipernocicepção devido a uma inibição da produção de TNF e IL-1 β no modelo de artrite por zymosan, demonstrando que essa citocina também contribui para o surgimento desse processo.

Como o tratamento crônico do OPCC se mostrou mais eficaz, na inibição de hipernocicepção e migração de neutrófilos, em relação ao tratamento com dose única, foi decidido quantificar os níveis de citocinas apenas nesses grupos. O TNF- α e a IL-1 β sequencialmente precedem a liberação de eicosanóides para induzir hipernocicepção em ratos (VERRI *et al.*, 2006). As doses do OPCC podem estar inibindo a ação dessas citocinas fazendo com que não ocorra a liberação de mediadores hipernociceptivos finais, dentre os

mais importantes estão os eicosanóides (prostaglandinas e prostaciclina), as aminas simpáticas, os leucotrienos, o fator de agregação de plaquetas (PAF), a histamina e a serotonina (FERREIRA *et al.*, 2009). O OPCC também pode estar impedindo que estes atuem nos receptores presentes nas membranas dos neurônios nociceptivos periféricos que estão na articulação.

IL-6 é uma citocina pleiotrópica com uma abrangente gama de atividades biológicas em diversos alvos celulares, dentre os quais se destacam a regulação das respostas imune e inflamatórias (NAKA, NISHIMOTO e KISHIMOTO, 2002). Verri e colaboradores (2006) relatam que a inibição da IL-6 melhora a artrite induzida por colágeno, mimetizando uma doença que apresenta uma acentuada inflamação o que gera hipernocicepção. A IL-6 induz a produção de IL-1 β na hipernocicepção mecânica inflamatória em ratos. No estudo de Cunha e colaboradores (1992) foi demonstrado ainda que a inibição da IL-6, através da utilização de anti-corpo contra a IL-6 inibiu o TNF- α , responsável pela hipernocicepção mecânica plantar. O efeito antinociceptivo é devido a inibição da cascata de citocina subjacente à IL-6 (CUNHA FQ *et al.*, 1992). Desta forma, parece que o TNF- α , IL-6 e IL-1 β sequencialmente antecedem a liberação de eicosanóides para induzir hipernocicepção em ratos. A IL-6 pode ser uma alternativa para controlar a hipernocicepção inflamatória (VERRI *et al.*, 2006). No nosso estudo a dosagem de IL-6 no lavado articular, não observamos alteração significativa. Não foi possível ver uma diferença estatística entre o grupo *naïve* e o grupo com artrite e nem dos grupos tratados.

A IL-10 é uma citocina pluripotente e pode ser considerada como a mais importante citocina anti-inflamatória encontrada na resposta imune em seres humanos. A IL-10 é produzida por diferentes tipos celulares, incluindo linfócitos B e linfócitos T, macrófagos, monócitos e células dendríticas (MARLOW *et al.*, 2013). A IL-10 demonstrou importante atividade antinociceptiva no modelo de incapacitação articular induzida por zymosan, após a injeção do estímulo inflamatório. Tal efeito se deve a inibição, pelo menos em parte, devido à inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α (VALE *et al.*, 2003). Apesar da comprovação do efeito antinociceptivo da IL-10, nós não observamos que o OPCC foi eficiente em induzir a liberação de IL-10. Provavelmente o efeito do OPCC não se deve a um aumento da produção de IL-10 no líquido articular. As citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4 e GM-CSF não foram detectadas na amostra, pois essas citocinas estão relacionadas a inflamação crônica.

A ciclooxigenase (COX) é uma enzima que realiza o primeiro passo na síntese das prostaglandinas a partir do ácido araquidônico, participando assim do processo inflamatório. As prostaglandinas são importantes mediadores pró-inflamatórios. Durante a fase inicial da inflamação a PGE₂ é o principal produto da ciclooxigenase (KAPOOR *et al.*, 2005). Há três isoformas principais da COX, a COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 é constitutivamente expressa em tecidos como o gastrointestinal, enquanto a COX-2 é uma isoforma induzida sobre a estimulação pró-inflamatória de várias citocinas. Na cascata da inflamação, IL-1 β e TNF- α estimulam a transcrição do gene de COX-2 (AKARASEREENONT *et al.*, 1995; DIAZ *et al.*, 1998). COX-3 é a isoforma mais recentemente encontrada. Aparenta ser codificada pelo mesmo gene da COX-1 e foi demonstrado ser importante nos estados de febre e dor (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

Os aspectos imunohistoquímicos do tecido sinovial dos animais dos grupos testados demonstrou perfis imunológicos distintos. As membranas sinoviais de animais do grupo *naïve* apresentaram estrutura normal, com pouca presença de infiltrado celular com uma leve imunoposição de TNF- α e COX-2. Enquanto as membranas do grupo controle apresentaram intenso infiltrado celular com marcada expressão de TNF- α e COX-2. O tratamento crônico com o OPCC (200mg/kg) diminuiu o infiltrado celular com consequente diminuição da expressão de TNF- α e COX-2. As doses de 100 e 400mg/kg de OPCC não apresentaram diminuição de expressão de TNF- α e COX-2. Segundo Cardoso (2009) a inibição de liberação de TNF- α , CXCL-8, IL-6, e a inibição da COX-2, pode atenuar a dor inflamatória.

A inflamação causada pela administração de zymosan na articulação, além de provocar incapacitação articular também causa a formação de edema (ROCHA *et al.*, 1999). O aumento de permeabilidade vascular é a primeira alteração que ocorre na microvasculatura durante a inflamação, levando ao extravasamento de fluido rico em proteínas para o interstício, e à formação de edema. Estes eventos são iniciados e mantidos através da liberação sequencial de mediadores inflamatórios, originados no plasma ou em células (MORAIS, 2008). Os dados do presente estudo demonstraram que a injeção intra-articular de zymosan (1mg), induziu uma inflamação característica, com hipernocicepção, edema e aumento da permeabilidade vascular, corroborando com os dados da literatura (ROCHA *et al.*, 2003; KANASHIRO *et al.*, 2009).

Verificamos que o OPCC foi capaz de prevenir o edema articular, assim como a dexametasona. O que pode indicar ação antiedematogênica do OPCC. Os glicocorticóides atuam por diferentes mecanismos de ação e, dentre eles, a inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-1 β , o qual é de grande importância no tratamento de diversos processos inflamatórios, incluindo os artríticos (BAUGHMAN *et al.*, 2003) e também através da inibição da degranulação mastocitária. Assim como no tratamento agudo, no tratamento crônico, todas as doses do OPCC, também foram capazes de prevenir o edema. No entanto, nesses grupos a inibição foi mais intensa do que a observada nos grupos tratados com dose única. Os dados desse estudo estão de acordo com os resultados encontrados por Saraiva e colaboradores (2011), onde os pesquisadores usando vários agentes inflamatórios demonstraram relevante efeito antiedematogênico do OPCC na orelha de rato indicando que sua aplicação tópica pode ser um potencial medicamento utilizado em doenças inflamatórias da pele.

O tratamento crônico com o OPCC, antes da artrite induzida por zymosan no joelho dos ratos, também foi eficaz na redução da permeabilidade vascular, a semelhança da dexametasona. No processo inflamatório, a PGE2 é um forte dilatador da musculatura lisa presente nos vasos que resulta em vasodilatação e eritema. A vasodilatação aumenta o fluxo sanguíneo no tecido inflamado e age como a bradicinina e histamina, que aumentam a permeabilidade vascular, ocasionando extravasamento de fluido. Os dados do presente estudo sugerem que o OPCC tem uma ação na inibição da permeabilidade vascular e consequente inibição na inibição da formação de edema.

No presente estudo, foi demonstrado um efeito anti-hipernociceptivo do OPCC em diferentes modelos de hipernocicepção inflamatória. O OPCC foi capaz de inibir hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina e PGE2 (mediador de ação direta). Vivancos e colaboradores (2004) demonstraram que o dispositivo Von Frey Eletrônico era mais sensível que o Von Frey Filamentos e o Randall Selitto para a detecção da hipernocicepção induzida pelos agentes inflamatórios carragenina ou PGE2 em ratos. Os autores observaram uma diminuição do limiar de nocicepção, de maneira dose-dependente, a partir da primeira hora após a administração dessas substâncias. Os mesmo autores demonstraram ainda que o Von Frey Eletrônico é uma ferramenta útil para caracterização de novos mediadores nociceptivos e também para avaliar novas classes de analgésicos periféricos, que são inibidores de COX ou bloqueadores diretos do nociceptor em curso de hipernocicepção.

Os dados mostram que o tratamento crônico com o OPCC antes da indução do estímulo inflamatório pela carragenina, foi capaz de prevenir a hipernocicepção mecânica plantar, bem como o grupo tratado com indometacina. Experimentalmente, foi demonstrado que a carragenina induz hipernocicepção mecânica em ratos, ativando uma cascata de sequencial citocinas (CUNHA FQ *et al.*, 1992). A cascata começa com o TNF- α que estimula duas vias distintas. Na primeira a IL-1 β é ativada e que por sua vez ativa a COX para produzir eicosanoides. A segunda ocorre produção CXCL1/CINC-1 que estimula a liberação de aminas simpáticas (VERRI *et al.*, 2006). Eicosanoides e aminas simpáticas são em última análise responsável pela sensibilização do nociceptor (CUNHA TM *et al.*, 2005). Deste modo, drogas que inibem a produção de citocinas, tais como corticosteróides, talidomida (MOREIRA *et al.*, 1993; RIBEIRO *et al.*, 2000), pentoxifilina (VALE *et al.*, 2004) e produtos naturais (FIGUEIREDO *et al.*, 2010) são agentes antinociceptivos em modelos de inflamação.

Quando utilizamos a PGE₂ observamos que o tratamento crônico do OPCC, foi capaz de prevenir a hipernocicepção, assim como o grupo tratado com dipirona. Estudos *in vivo* demonstram que a PGE₂ injetada perifericamente produz hipernocicepção e alodinia em modelos experimentais em animais, essas condições também são observadas em seres humanos (FERREIRA, 1972; KUHN, 1973). A PGE₂ atua diretamente sobre os receptores presentes nas membranas dos nociceptores, provocando sua sensibilização (CUNHA FQ *et al.*, 1992). Logo, a hipernocicepção induzida por PGE₂ é independente a produção de outros mediadores inflamatórios ou o recrutamento de células, tais como neutrófilos (CUNHA TM *et al.*, 2008b,c). O fato de que o tratamento com OPCC também inibiu hipernocicepção induzida por PGE₂, pode sugerir que o OPCC reduza diretamente a sensibilização do nociceptor ou que OPCC possa até induzir um mediador endógeno através desta ação. É importante citar que os analgésicos que atuam através da inibição da COX, da produção de citocinas, por exemplo, talidomida ou a migração de neutrófilos (fuço idina) não são capazes de afetar a hipernocicepção induzida por PGE₂ (CUNHA TM *et al.*, 2008b,c; RIBEIRO *et al.*, 2000). Desconfiamos que um mediador endógeno, que possivelmente pode estar envolvido na ação do OPCC, seja o óxido nítrico (NO). Sabendo-se que sua atividade gastroprotetora, tem a participação de NO e K⁺ATP (QUIRINO *et al.*, 2009) e que essa via também está bem descrita como uma via analgésica periférica, acredita-se que esse efeito possa estar ocorrendo pela via neuronal L-arginina/NO/GMPc/K_{ATP}. De fato, o bloqueio direto da hipernocicepção induzida em curso por PGE₂ pode ser alcançada através da utilização de analgésicos periféricos, como a dipirona, diclofenaco e outras substâncias (DUARTE *et al.*, 1992;

FERREIRA, 1993; FERREIRA *et al.*, 1991). Todavia acreditamos que a participação de um mediador endógeno seja a opção que se mostra mais provável. Levando em consideração a ação do OPCC na gastroproteção através da via L-arginina/NO/GMPc/K_{ATP}. Outra hipótese que correlaciona com o efeito anti-hipernociceptivo do OPCC no experimento com PGE2 é a que o tratamento prolongado possa estar estimulando a produção de opióides endógenos, como a beta-endorfina. Sabe-se que o sistema opióide endógeno bem como o sistema endocanabinoide são sistemas supressores da dor e pode ser ativados por fármacos e por produtos naturais (GERTSCH, PERTWEE e MARZO, 2010). Entretanto, experimentos adicionais devem ser realizados para confirmar a hipótese.

6. CONCLUSÃO

Diante dos dados apresentados no nosso trabalho, concluímos que o OPCC exibe efeito anti-inflamatório evidenciado pelo modelo de artrite induzida por zymosan em ratos, que pode ser associada com a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β). Aparentemente essa ação pode estar envolvida com a inibição da migração de neutrófilos. Sugerimos ainda que o OPCC previne o desenvolvimento da hipernocicepção inflamatória mecânica evocada por carragenina e PGE2 (bloqueio direto da hipernocicepção) em ratos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; **Imunologia Celular e Molecular**. 7 ed. São Paulo: Elsevier, 2012. 560p.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114-140, mar. 2007.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 18, n. 3, p. 472-508 , set. 2008.

AGRA, M. F; FREITAS, P. F; BARBOSA FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, 2007.

AKARASEREENONT, P.; BAKHLE, Y. S.; THIEMERMANN, C.; VANE, J. Cytokine-mediated induction of cyclo-oxygenase-2 by activation of tyrosine kinase in bovine endothelial cells stimulated by bacterial lipopolysaccharide. **Br J Pharmacol.**, v. 3, n. 115, p.401-408, jun. 1995.

AKIRA, S.; HIRANO, T.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). **FASEB J.**, v. 11, n.4, p. 2860-2867, ago. 1990.

ALEY, K. O.; LEVINE, J. D. Role of Protein Kinase A in the Maintenance of Inflammatory Pain. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 6, p. 2181-2186, mar. 1999.

ASCARI, J.; BOAVENTURA, M. A.; TAKAHASHI, J. A.; DURÁN-PATRÓN, R.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R.; MACÍAS-SÁNCHEZ, A. J.; COLLADO, I. G. Biotransformation of bioactive isocaryolanes by *Botrytis cinerea*. **J Nat Prod.**, v. 8, n. 74, p. 1707-1712, ago. 2011.

ATHANASAKIS, K.; PETRAKIS, I.; KYRIOPOULOS, J. Investigating the value of abatacept in the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review of cost-effectiveness studies. **ISRN Rheumatology**, 2013.

AUGUSTO, L. G. S.; GÓES, L. Integrated understanding for health surveillance in a forest environment: the case of the Araripe Plateau in Ceará State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, sup 4, p. S549-S558, 2007.

BARROT. M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience.**, v. 211, p. 39-50, jun. 2012.

BATISTA, J. S; SILVA, A. E; RODRIGUES, C. M. F; COSTA, K. M. F. M; OLIVEIRA, A. F; PAIVA, E. S; NUNES, F. V. A; OLINDA, R. G. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.3, jul., 2010.

BEVAART, L.; VERVOORDELDONK, M. J.; TAK, P.P. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? **Arthritis Rheum.**, v. 62, n. 8, p. 2192-205, ago. 2010.

BHUTANI, T.; WONG, J. W.; BEBO, B. F.; ARMSTRONG, A. W. Access to health care in patients with psoriasis and psoriatic arthritis: data from national psoriasis foundation survey panels. **JAMA Dermatol.**, v. 149, n. 6, p. 717-721, jun. 2013.

BLACKWELL, T. S.; CHRISTMAN, J. W. Sepsis and cytokines: current status. **Br J Anaesth.**, v. 1, n. 77, p. 110-117, jul. 1996.

BOMBINI, G.; CANETTI, C.; ROCHA, F. A.; CUNHA, F.Q. Tumour necrosis factor-alpha mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. **Eur J Pharmacol.**, v. 1-3, n. 496, p. 197-204, ago. 2004.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G.; Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood.**, v. 3, n.60, p. 618-622, 1982.

BRANDAO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; GRAEL, C. F. F.; NETTO-JUNIOR, N. L.; MONTE-MÓR, R. L. M. Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 19, n. 2, p. 478-487, jun. 2009.

BRAQUET, P.; ROLA-PLESZCZYNSKI, M. The role of PAF in immunological responses: a review. **Prostaglandins.**, v. 2, n. 34, p.143-148, ago. 1987.

BRENNAN, F. M.; MCINNES, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest.**, v. 118, n. 11, p. 3537-3545, nov. 2008.

BURNSTOCK, G. A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain. **Lancet.**, v. 9015, n. 347, p. 1604-1605, jun. 1996.

BURNSTOCK, G.; WOOD, J. N. Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. **Curr Opin Neurobiol.**, v.4, n. 6, p. 526-532, ago. 1996.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **J. Ethnofarmacol.**, v. 1-2, n.100, p. 131-134, ago. 2005.

CANETTI, C.; SILVA, J. S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **Br J Pharmacol.**, v. 8, n. 134, p. 1619-1628, dez. 2001.

CARDOSO, Mirlane Guimarães de Melo. **Paclitaxel potencia a hipernociceção inflamatória: evidências da participação de citocinas e do receptor toll tipo 4 (tlr-4)**. Tese de doutorado (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

CARTER, J. D.; HUDSON, A. P. Reactive arthritis: clinical aspects and medical management. **Rheum Dis Clin North Am.**, v. 31, n. 1, p. 21-44, fev. 2009.

CATERINA, M. J.; ROSEN, T. A.; TOMINAGA, M.; BRAKE, A. J.; JULIUS, D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. **Nature**, v. 6726, n. 398, p. 436-441, abr. 1999.

CESARE, P.; MCNAUGHTON, P. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin (pain sensory transduction protein kinase C sensory neuron). **Neurobiology**, v. 93, p. 15435-15439, dez. 1996.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 21, n. 99, out. 2002.

CHAPMAN, P. B.; LESTER, T. J.; CASPER, E. S.; GABRILOVE, J. L.; WONG, G. Y.; KEMPIN, S. J.; GOLD, P. J.; WELT, S.; WARREN, R. S.; STARNES, H. F.; SHERWIN, S. A.; OLD, L. J.; OETTGEN, H. F. Clinical pharmacology of recombinant human tumor necrosis factor in patients with advanced cancer. **J Clin Oncol.**, v. 12, n. 5, p. 1942-1951, 1987.

CHOI, J. H.; CHA, D. S.; JEON, H. Anti-inflammatory and anti-nociceptive properties of *Prunus padus*. **J Ethnopharmacol.**, v. 2, n. 144, p. 379-386, nov. 2012.

COLLIER, H. O. J.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; A., SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol Chemother.** v. 2, n. 32, p. 295-310, fev. 1968.

COSTA, J. G. M.; BRITO, S. A.; NASCIMENTO, E. M. M.; BOTELHO, M. A. C.; RODRIGUES, F. F. G.; COUTINHO, H. D. M. Antibacterial Properties of Pequi Pulp Oil (*Caryocar coriaceum* WITTM.). **International Journal of Food Properties**, v. 14, p. 411-416, 2011.

COURTENAY, J. S.; DALLMAN, M. J.; DAYAN, A. D.; MARTIN, A.; MOSEDALE B. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. **Nature**, v. 283, p. 666-668, fev. 1980.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta**, v. 6, n. 1830, p. 3670-3695, jun. 2013.

CRONSTEIN, B. N.; SUNKUREDDI, P. Mechanistic aspects of inflammation and clinical management of inflammation in acute gouty arthritis. **J Clin Rheumatol.**, v. 19, n. 1, p. 19-29, jan. 2013.

CRONSTEIN, B. N.; WEISSMANN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis Rheum.**, v. 2 n. 36, p. 147-157, fev. 1993.

CUNHA, F. Q.; MONCADA, S.; LIEW, F. Y. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 3, n. 182, p. 1155-1159, fev. 1992.

CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; VEIGA, F. H.; FERREIRA, S. H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. **Br J Pharmacol.**, v. 1, n. 126, p. 45-50, jan. 1999.

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

CUNHA, J. M.; SACHS, D.; CANETTI, C. A.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. CUNHA, F. Q. The critical role of leukotriene B4 in antigen-induced mechanical hyperalgesia in immunised rats. **Br J Pharmacol.**, V. 6, N. 139, P. 1135-1145, JUL. 2003.

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

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. J.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 5, n. 102, p. 1755-1760, fev. 2005.

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

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. J.; VIVANCOS, G. G.; MOREIRA, I. F.; REIS, S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J Med Biol Res.** v. 3, n. 37, p. 401-407, mar. 2004.

CUNHA, T.M, DAL-SECCO, D.; VERRI, W. A. J.; GUERRERO, A. T.; SOUZA, G. R.; VIEIRA, S. M.; LOTUFO, C. M.; NETO, A. F.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. **Eur J Pharmacol.**, v. 1-3, n, 590, p. 127-135, ago. 2008c.

CURIEL, R. V.; GUZMAN, N. J. Challenges associated with the management of gouty arthritis in patients with chronic kidney disease: a systematic review. **Semin Arthritis Rheum.**, v. 42, n. 2, p. 166-178, out. 2012.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J Pathol.**, v. 1, n. 104, p. 15-29, mai. 1971.

DIAZ, A.; CHEPENIK, K.P.; KORN, J.H.; REGINATO, A. M.; JIMENEZ, S. A. Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta 1 in human lung fibroblasts. **Exp Cell Res.**, v. 1, n. 25, p. 222-229, mai. 1998.

DINARELLO, C. A. Interleukin 1 as mediator of the acute-phase response. **Survey of Immunologic Research**, v. 3, p. 29-33, mar. 1984.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest.**, v. 112, p. 321-329, dez. 1997.

DRAYTON, D. L.; LIAO, S.; MOUNZER, R. H.; RUDDLE, N. H. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. **Nature Immunol.**, v. 7, p. 344-353, 2006.

DREXLER, S. K.; KONG, P. L.; WALES, J.; FOXWELL, B. M. Cell signalling in macrophages, the principal innate immune effector cells of rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther.**, v. 10, n. 5, p. 216, out. 2008.

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

ERNST, E. Complementary treatments in rheumatic diseases. **Rheum Dis Clin North Am.**, v. 34, n.2, p. 455-467, maio, 2008.

ERNST, E. The efficacy of Phytodolor for the treatment of musculoskeletal pain a systematic review of randomized clinical trials. **Nat Med J**, 1999.

EVANS, A. R.; VASKO, M. R.; NICOL, G. D. The cAMP transduction cascade mediates the PGE2-induced inhibition of potassium currents in rat sensory neurones. **J Physiol.**, v. 516, n. 1, p. 163-178, abr. 1999.

FANG, J. Q.; DU, J. Y.; LIANG, Y.; FANG, J. F. Intervention of electroacupuncture on spinal p38 MAPK/ATF-2/VR-1 pathway in treating inflammatory pain induced by CFA in rats. **Mol Pain.**, v. 9, p. 13, mar. 2013.

FERREIRA, S. H. Inflammatory pain: the role of cytokines and its control by drugs which release nitric oxide. **Ann Ist Super Sanita.**, v. 3, n. 29, p. 367-373, 1993.

FERREIRA, S. H., Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nat New Biol.**, v. 102, n. 240, p. 200-2003, dez. 1972.

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

FERREIRA, S. H.; ROMITELLI, M.; NUCCI, G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **J Cardiovasc Pharmacol.**, s. 5, 1989.

FERREIRA, S.H.; FERRARI, L. F.; CUNHA, T. M.; NASCIMENTO, P. G. B. D.; CUNHA, F. Q. In: SIQUEIRA *et al.* Dor - **Princípios e Prática**. 1. ed. São Paulo: Artmed, 2009, p. 265-279.

FIGUEIREDO, J. G.; BITENCOURT, F. S.; CUNHA, T. M.; LUZ, P. B.; NASCIMENTO, K. S.; MOTA, M. R.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S.; CUNHA, F. Q.; ALENCAR, N. M. Agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh reduces

inflammatory hypernociception: involvement of nitric oxide. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 4, n. 96, p. 371-377, out. 2010.

FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, E. A. T. Propriedades físicoquímicas e composição dos ácidos graxos da fração lipídica da polpa e amêndoa do piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm). **Revista de Ciências Agronômicas**, Fortaleza, v.20, n. 1/2, p. 135-139 jun. 1989.

FLEMMING, D. J.; BERNARD, S. A. Arthritis mimicking sports-related injuries. **Clin Sports Med.**, v. 32, n. 3, p.577-97, mai. 2013.

FLORES, D.; MARQUEZ, J.; GARZA, M.; ESPINOZA, L. R. Reactive arthritis: newer developments. **Rheum Dis Clin North Am.**, v.29, n.1, p. 37-59, fev. 2003.

FORD-HUTCHINSON, A. W.; BRUNET, G.; SAVARD, P.; CHARLESON, S. Leukotriene B4, polymorphonuclear leukocytes and inflammatory exudates in the rat. **Prostaglandins.**, v. 1, n. 28, p. 13-27, jul. 1984.

FRANCO, E. A. P; BARROS, R. F. M. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 8, n. 3, 2006.

FRASNELLI, M. E.; TARUSSIO, D.; CHOBASZ-PÉCLAT, V.; BUSSO, N.; SO, A. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Res Ther.**, v. 2, n.7, p. 370-379, jan. 2005.

FUHLBRIGGE, R. C.; WEISHAUPT, C. Adhesion molecules in cutaneous immunity. **Semin Immunopathol.**, v. 1, n.29, abr. 2007.

GADÓ, K.; GIGLER, G. Zymosan inflammation: a new method suitable for evaluating new antiinflammatory drugs. **Agents Actions.**, v. 1-2, n. 32, p. 119-121, jan. 1991.

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

GERTSCH, J.; PERTWEE, R. G.; MARZO, V. Phytocannabinoids beyond the Cannabis plant - do they exist? **Br J Pharmacol.**, v. 3, n. 160, p. 523-529, jun. 2010.

GRANSTEIN, R. D.; MARGOLIS, R.; MIZEL, S. B.; SAUDER, D. N. In vivo inflammatory activity of epidermal cell-derived thymocyte activating factor and recombinant interleukin 1 in the mouse. **J Clin Invest.**, v. 3, n. 77, p. 1020-1027, mar. 1986.

GOLD, M. S.; LEVINE, J. D.; CORREA, A. M. Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. **J Neurosci**, v. 24, n. 18, p. 10345-10355, dez. 1998.

GUARIM-NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

GUERRERO, A. T.; ZARPELON, A. C.; VIEIRA, S. M.; PINTO, L. G.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; VERRI, W. A. J.; CUNHA, T. M. The role of PAF/PAFR signaling in zymosan-induced articular inflammatory hyperalgesia. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 1, n. 386, jan. 2013.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Mol Aspects Med.**, v. 1, n. 27, p. 1-93, fev. 2006.

HAMILTON, J. A. Hypothesis: in vitro evidence for the invasive and tumor-like properties of the rheumatoid pannus. **J Rheumatol.**, v. 10, n.6, p. 845-851, dez. 1983.

HAROON, N.; INMAN, R. D.; LEARCH, T. J.; WEISMAN, M. H.; LEE, M.; RAHBAR, M. H.; WARD, M. M.; REVEILLE, J. D.; GENSLER, L. S. The impact of TNF-inhibitors on radiographic progression in ankylosing spondylitis. **Arthritis Rheum.**, jul. 2013.

HARPER, A. A.; LAWSON, N. S. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. **J Physiol.**, fev. v. 359, p. 31-46, 1985

HILLIGES, M.; WEIDNER, C.; SCHMELZ, M.; SCHMIDT, R.; ØRSTAVIK, K.; TOREBJÖRK, E.; HANDWERKER, H. ATP responses in human C nociceptors. **Pain**, v. 1-2, n. 98, jul. 2002.

HOPKINS, S. J. The pathophysiological role of cytokines. **Leg Med.**, v. 5, p. 45-57, mar. 2003.

HUNSKA, A. R. S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J Neurosci Methods.**, v. 1, 14, p. 69-76, jun. 1985.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature.**, v. 6852, 413, p. 203-210, set. 2001.

KADIR, S. L.; YAAKOB, H.; MOHAMED, Z. R. Potential anti-dengue medicinal plants: a review. **J Nat Med.**, 2013.

KANASHIRO, A. PESSINI, A. C. MACHADO, R. R.; MALVAR, D. D. O. C.; AGUIAR, F. A.; SOARES, D. M.; VALE, M. L.; SOUZA, G. E. Characterization and pharmacological evaluation of febrile response on zymosan-induced arthritis in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 5, n. 296, mai. 2009.

KANASHIRO, A.; PESSINI, A. C.; MACHADO, R. R.; MALVAR, D. D. O. C.; AGUIAR, F. A.; SOARES, D.M.; VALE, M. L.; SOUZA, G. E. Characterization and pharmacological evaluation of febrile response on zymosan-induced arthritis in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 5, n. 269, p. 1631-1640, mai. 2009.

KAPOOR, M.; CLARKSON, A. N.; SUTHERLAND, B. A.; APPLETON I. The role of antioxidants in models of inflammation: emphasis on L-arginine and arachidonic acid metabolism. **Inflammopharmacology.**, v. 5, n. 12, p. 505-519, 2005.

KHASAR, S. G.; LIN, Y. H.; MARTIN, A.; DADGAR, J.; MCMAHON, T.; WANG, D.; HUNDLE, B.; ALEY, K. O.; ISENBERG, W.; MCCARTER, G.; GREEN, P.G.; HODGE, C.

W.; LEVINE, J. D.; MESSING, R. O. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. **Neuron.**, v. 1, n. 24, p. 253-260, set. 1999.

KEYSTONE, E. C.; SCHORLEMMER, H. U.; POPE, C.; ALLISON, A. C. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis Rheum.**, v. 7, n. 20, p. 1396-1401, out. 1977.

KIM, P. K.; DEUTSCHMAN, C. S. Inflammatory responses and mediators. **Surg Clin North Am.**, n. 80, v. 3, p. 885-894, jun. 2000.

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

KLOOSTER, P. M.; VONKEMAN, H. E.; VAN DE LAAR, M. A. Disability due to gouty arthritis. **Curr Opin Rheumatol.**, v. 24, n. 2, p. 139-144, mar. 2012.

KULKARNI, S. K.; MEHTA, A. K.; KUNCHANDY, J. Anti-inflammatory actions of clonidine, guanfacine and B-HT 920 against various inflammagen-induced acute paw oedema in rats. **Arch Int Pharmacodyn Ther.**, v. 2, n. 279, p. 324-334, fev. 1986.

LAM, F. Y.; FERRELL, W. R. Specific neurokinin receptors mediate plasma extravasation in the rat knee joint. **Br J Pharmacol.**, v. 1, n. 103, p. 1263-1267, mai. 1991.

LAM, F. Y.; FERRELL, W. R. Specific neurokinin receptors mediate plasma extravasation in the rat knee joint. **Br J Pharmacol.**, v. 1, n. 103, p. 1263-1267, mai. 1991.

LASKIN, D. L.; PENDINO, K. J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 35 p. 655-677, 1995.

LEE, M.; TRACEY, I. Neuro-genetics of persistent pain. **Curr Opin Neurobiol**, v. 1, n. 23, p. 127-132, fev. 2013.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev.**, v. 4, n. 53, p. 597-652, dez. 2001.

LEEM, J. W.; WILLIS, W. D.; CHUNG, J. M. Cutaneous sensory receptors in the rat foot. **J Neurophysiol.**, v.5, n. 69, p. 1684-1699, mai. 1993.

LEITE, G. O.; PENHA, A. R. S.; QUIRINO, G. S.; COLARES, A. V.; RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M.; CARDOSO, A. L. H.; CAMPOS, A. R. Gastroprotective effect of medicinal plants from Chapada do Araripe, Brazil. **Journal of Young Pharmacists**, v.1, 2009.

LETHABY, A.; LOPEZ-OLIVO, M. A.; MAXWELL, L.; BURLS, A.; TUGWELL, P.; WELLS, G. A. Etanercept for the treatment of rheumatoid arthritis. **Cochrane Database of Systematic Reviews.**, mai. 2013.

LEVINE, J. D.; LAU, W.; KWIAT, G.; GOETZL, E. J. Leukotriene B4 produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. **Science**, v. 4663, n. 225, p. 743-745, ago. 1984.

LEVINE, J. D.; GOODING, J.; DONATONI, P.; BORDEN, L.; GOETZL, E. J. The role of the polymorphonuclear leukocyte in hyperalgesia. **J Neurosci.**, v. 11, n. 5, p. 3025-3029, nov. 1985.

LINLEY, J. E.; ROSE, K.; OOI, L.; GAMPER, N. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. **Pflugers Arch.**, v. 5, n.459, p. 657-669, abril 2010.

LISBONA, M.; MAYMÓ, J.; SOLANO, A.; ALMIRALL, M.; NAVALLAS, M.; ARES, J.; CARBONELL, J. Repair of erosions in patients with rheumatoid arthritis treated with etanercept: magnetic resonance imaging findings after 1 year of follow-up. **Scand J Rheumatol.**, abr. 2013.

LOPES, R. R. A; LAMIM, R; FREITAS, R. A; BÜRGER, C; BRESOLIN, T. M. B. Estudo de toxicidade aguda oral (dose única) de N-carboximetilquitosana. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.24, n.2, 2005.

MACHADO, M. A.; BARBOSA, M. M.; ALMEIDA, A. M.; ARAÚJO, V. E.; KAKEHASI, A. M.; ANDRADE, E. I.; CHERCHIGLIA, M. L.; ACURCIO, F. D. Treatment of ankylosing spondylitis with TNF blockers: a meta-analysis. **Rheumatol Int.**, mai. 2013.

MAGALHÃES, J. F. G; VIANA, C. F. G; ARAGÃO, J. R. A. G; MORAES, V. G; RIBEIRO, R. A; VALE, M. R. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Ageratum conyzoides* in rats. **Phytoterapy Research**, v.2, 1997.

MAIA, Paula Virgínia Mendes. **Efeitos do óleo essencial de *Croton sonderianus* muell. arg. sobre a contratilidade do músculo liso traqueal de ratos.** Dissertação. (Mestrado em Fisiologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

MARLOW, G. J.; VAN GENT, D.; FERGUSON, L. R. Why interleukin-10 supplementation does not work in Crohn's disease patients. **World J Gastroenterol.**, v. 25, n. 19, p. 3931-3941, jul. 2013.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil.** 3 ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007.

MAVROGENI, S.; DIMITROULAS, T.; FIKAKISC, P. P.; KITAS, G. D. Heart involvement in rheumatoid arthritis: Multimodality imaging and the emerging role of cardiac magnetic resonance. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, 2013.

MCCLESKEY, E. W.; GOLD, M. S. Ion channels of nociception. **Annu Rev Physiol.**, v. 61, p. 835-856, 1999.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.

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

MOREIRA, A. L.; SAMPAIO, E. P.; ZMUIDZINAS, A.; FRINDT, P.; SMITH, K. A.; KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. **J Exp Med.**, v. 6, n. 177, p. 1675-1680, jun. 1993.

MORETTO, E; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos.** São Paulo: Livraria Varela, 1998.

MOYNA, P.; HEINZEN, H. Lípidos: química y productos naturales que los contienen. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

NAKA, T.; NISHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. **Arthritis Res.**, s. 3, p. 233-242, mai. 2002.

NAGY, I.; RANG, H. Noxious heat activates all capsaicin-sensitive and also a sub-population of capsaicin-insensitive dorsal root ganglion neurons. **Neuroscience**, v. 88, n. 4, p. 995-997, 1999a.

NAGY, I.; RANG, H. P. Similarities and differences between the responses of rat sensory neurons to noxious heat and capsaicin. **J Neurosci.**, v. 24, n. 19, p. 10647-10655, dez. 1999b.

NG, T. H.; BRITTON, G. J.; HILL, E. V.; VERHAGEN, J.; BURTON, B. R.; WRAITH, D. C. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. **Front Immunol.**, v. 4, p. 129, maio 2013.

NIGROVIC, P. A.; LEE, D. M. Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis. **Immunol Rev.**, v. 217, p. 19-37, 2007.

OLIVEIRA, I. G.; CARTAXO, S. L.; SILVA, M. A. P. Plantas medicinais utilizadas na Farmacopéia Popular em Crato, Juazeiro e Barbalha (Ceará, Brasil). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, s. 1, jul. 2007.

OLIVEIRA, M. E. B. Características físicas, químicas e compostos bioativos em pequis (*Caryocar coriaceum* Wittm.) nativos da Chapada do Araripe-Ce. **Tese de doutorado**, UFPE, Recife, 2009.

OLIVEIRA, M. L.; NUNES-PINHEIRO, D. C.; TOMÉ, A. R.; MOTA, E. F.; LIMA-VERDE, I. A.; PINHEIRO, F. G.; CAMPELLO, C. C.; MORAIS, S. M. In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. seeds. **J Ethnopharmacol.**, v. 2, n. 129, p. 215-219, mai. 2010.

PARTRICK, D. A.; MOORE, F. A.; MOORE, E. E.; BIFFL, W. L.; SAUAIA, A.; BARNETT, C. C. J. The inflammatory profile of interleukin-6, interleukin-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in postinjury multiple organ failure. **Am J Surg.**, v. 5, n. 172, p. 425-429, nov. 1996.

PINTO, L. G.; CUNHA, T. M.; VIEIRA, S. M.; LEMOS, H. P.; VERRI, W. J.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. **Pain**, v. 148, n. 2, p. 247-256, fev. 2010.

PROGRAMA PARQUE VIVO. **APA da Chapada do Araripe**. Disponível em: <<http://www.parquevivo.ufc.br/oktiva.net/1364/?idWebSite=1364&pagOrigem=pagCapa&acao=mostrarSecao&idSecao=4301>>. Acesso em: 11 maio de 2013.

QUIRINO, Glauberto da Silva. **Atividade cicatrizante e gastroprotetora de *caryocar coriaceum* wittm.** Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) – Universidade Regional do Cariri, Crato, 2009.

QUIRINO, G. S.; LEITE, G. O.; REBELO, L. M.; TOME, A. R.; COSTA, J. G. M.; CARDOSO, A. H.; CAMPOS, A. R. Healing potential of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) fruit pulp oil. **Phytochemistry Letters**, p. 179-183, 2009.

RATHORE, B.; ALI MAHDI, A.; NATH PAUL, B.; NARAYAN SAXENA, P.; KUMAR, S. Indian herbal medicines: possible potent therapeutic agents for rheumatoid arthritis. **J Clin Biochem Nutr.**, v. 1, n. 41, p. 12-17, jul. 2007.

REBOUÇAS, F. Chapada do Araripe. **Infoescola**, 2013. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/geografia/chapada-do-araripe/>>. Acesso em: 11 maio de 2013.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur J Pharmacol.**, v.1, n. 387, p. 111-118, jan. 2000.

ROCHA, F. A. C.; ARAGÃO, A. G. J.; OLIVEIRA, R. C.; POMPEU, M. M.; VALE, M. R, RIBEIRO, R. A. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflamm Res.**, v. 9, n. 48, p. 485-490. 1999.

ROCHA, F. A. C.; ROCHA, J. C. S.; PEIXOTO, M. E. B.; JANCAR, S.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Efeito de inibidores da sintase de óxido nítrico na dor inflamatória articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos. **Rev. Bras. Reumatol.** v.43, p.206-217, 2003.

ROCHA, F. A. C.; TEIXEIRA, M. M.; ROCHA, J. C.; GIRÃO, V. C.; BEZERRA, M. M.; RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q. Blockade of leukotriene B4 prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. **Eur J Pharmacol.**, v. 1, n. 497, p. 81-86, ago. 2004.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102-123, jan./fev., 2001.

ROSA, A.; RESCIGNO, A.; PIRAS, A.; ATZERI, A.; SCANO, P.; PORCEDDA, S.; ZUCCA, P.; ASSUNTA, DESSÌ, M. a. Chemical composition and effect on intestinal Caco-2 cell viability and lipid profile of fixed oil from *Cynomorium coccineum* L. **Food Chem Toxicol.**, v. 10, n. 50, p. 799-807, out. 2012.

SALES, C.; OLIVIERO, F.; SPINELLA, P. The mediterranean diet model in inflammatory rheumatic diseases. **Reumatismo.**, v.1, n.61, p. 10-14, jan. 2009.

SALGADO, E.; MANEIRO, J. R.; CARMONA, L.; GÓMEZ-REINO, J. Rheumatoid factor and response to TNF antagonists in rheumatoid arthritis: Systematic review and meta-analysis of observational studies. **Joint Bone Spine.**, maio, 2013.

SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D.; LEITE, G. O.; KERNTOPF, M. R.; COSTA, J. G.; ROCHA, J. B.; TOMÉ, A. R.; CAMPOS, A. R.; MENEZES, I. R. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **J Ethnopharmacol.**, v. 3, n. 136, p. 504-510, jul. 2011.

SARAIVA, R. A.; MATIAS, E. F.F.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SOUZA, H. H. F.; FERNANDES, C. N.; ROCHA, J. B. T.; MENEZES, I. R. A. Synergistic action between *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed oil with aminoglycosides in vitro. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 113, p. 967-972, ago. 2011.

SARAIVA, Rogério de Aquino. **Efeito anti-inflamatório do óleo fixo de mesocarpo interno de *Caryocar coriaceum* Wittm. em edemas induzidos por agentes flogísticos em modelos animais.** Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) – Universidade Regional do Cariri, Crato, 2009.

SCHLESINGER, N.; THIELE, R. G. The pathogenesis of bone erosions in gouty arthritis. **Ann Rheum Dis.**, v. 69, n. 11, p. 1907-1912, nov. 2010.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annu Rev Biomed Eng.** v. 8, p. 93-131, 2006.

SHAH, A. S.; ALAGAWADI, K. R. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties of *Thespesia populnea* Soland ex. Correa seed extracts and its fractions in animal models. **J Ethnopharmacol.**, v. 3, n.137. p. 1504-1509, out. 2011.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol.**, v. 3, n. 18, p. 385-405, set. 2004.

SILVA, M. A. P.; MEDEIROS FILHO, S. Emergência de plântulas de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.). **Revista Ciência Agrônômica**, v. 37, n. 3, 2006.

SILVA-JUNIOR, F. S.; ROCHA, F. A. C. artrite induzida por zymosan em ratos mecanismos envolvidos na hipernocicepção e na lise da cartilagem articular. **ACTA REUM PORT.**, v. 31, p. 143-149, 2006.

SMOLEN, J. S. Ten years of infliximab: Insights from clinical trials in rheumatoid arthritis. **Eur J Pharmacol.**, s. 1, nov. 2009.

SMOLEN, J. S. Ten years of infliximab: Insights from clinical trials in rheumatoid arthritis. **Eur J Pharmacol.**, s. 1, p. 623, nov. 2009

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA-FILHO J. M.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios

nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 18, n. 4, p. 642-654, dez. 2008.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

SOUZA, G. R.; TALBOT, J.; LOTUFO, C. M.; CUNHA, F. Q.; CUNHA, T. M.; FERREIRA, S. H. Fractalkine mediates inflammatory pain through activation of satellite glial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 27, n. 110, p. 11193-11198, jul. 2013.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell.**, v. 2, n. 76, p. 301-314, jan. 1994.

TAYLOR, P. R.; BROWN, G. D.; REID, D. M.; WILLMENT, J. A.; MARTINEZ-POMARES, L.; GORDON, S.; WONG, S. Y. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. **J Immunol.**, v. 7, n. 169, p. 3876-3882, out. 2002.

TODD, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nature Reviews Neuroscience.**, v. 11, p. 823-836, dez. 2010.

TOLVER, M. A.; STRANDEFELT, F.; BRYLD, E. B.; ROSENBERG, J.; BISGAARD, T. Randomized clinical trial of dexamethasone versus placebo in laparoscopic inguinal hernia repair. **Br J Surg.**, v. 10, n. 99, p. 1374-1380, out. 2012.

TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Rat-knee joint incapacitation test: na objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, v. 3, n. 48, p. 421-427, mar. 1992.

TRACEY, K. J.; BEUTLER, B.; LOWRY, S. F.; MERRYWEATHER, J.; WOLPE, S.; MILSARK, I. W.; HARIRI, R. J.; FAHEY, T. J.; ZENTELLA, A.; ALBERT, J. D.; SHIRES, T.; CERAMI, A. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. **Science.**, v. 234, n. 4775, p. 470-474, out. 1986.

VALE, M. L.; CUNHA, F. Q.; BRITO, G. A.; BENEVIDES, V. M.; FERREIRA, S. H.; POOLE, S.; RIBEIRO, R. A. Anti-nociceptive effect of thalidomide on zymosan-induced experimental articular incapacitation. **Eur J Pharmacol.**, v. 3, n. 536, p. 309-319, mai. 2006.

VALE, M. L.; MARQUES, J. B.; MOREIRA, C. A.; ROCHA, F. A. C.; FERREIRA, S. H.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 1, n. 304, p. 102-108, jan. 2003.

VALE, M. L.; BENEVIDES, V. M.; SACHS, D.; BRITO, G. A.; DA ROCHA, F. A.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Antihyperalgesic effect of pentoxifylline on experimental inflammatory pain. **Br J Pharmacol.** n. 143, v. 7, dez. 2004.

VALÉRIO, D. A.; FERREIRA, F. I.; CUNHA, T. M.; ALVES-FILHO, J. C.; LIMA, F. O.; OLIVEIRA, J. R.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; QUEIROZ, R. H.; VERRI, W. A. J. Fructose-1,6-bisphosphate reduces inflammatory pain-like behaviour in mice: role of adenosine acting on A1 receptors. **Br J Pharmacol.**, v. 158, n. 2, p. 558-568, set. 2009.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. páginas 519-528 jun. 2005.

VERA, R. *et al.* Caracterização física e química de frutos do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) oriundos de duas regiões no estado de goiás, brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 2, p. 93-99, jun. 2007.

VERRI, W. A. J.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?. **Pharmacol Ther.**, v. 1, n. 112, p. 116-138, out. 2006.

VIANA C. F. G, ARAGÃO, J. R. A. G. M; RIBEIRO, R.A., MAGALHÃES J.F.G; VALE, M. R. Effect of *Ageratum conyzoides* in nociception and inflammatory response induced by zymosan. **Fitoterapia volume LXIX**, n. 4, 1998.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 1, n. 166, p. 96-103, mar. 1969.

VIVANCOS, G. G.; VERRI, W. A. J.; CUNHA, T. M.; SCHIVO, I. R.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Braz J Med Biol Res.**, v. 3, n. 37, p. 391-399, mar. 2004.

WANG, L.; ZHAO, D.; DI, L.; XU, T.; LIN, X.; YANG, B.; ZHOU, X.; YANG, X.; LIU, Y. The analgesic and anti-rheumatic effects of *Thladiantha dubia* fruit crude polysaccharide fraction in mice and rats. **J Ethnopharmacol.**, v. 137, n. 3, p. 1381-1387, out. 2011.

WANG, T. Y.; ZHOU, H.; WONG, Y. F.; WU, P. K.; HSIAO, W. L.; LEUNG, E. L.; LIU, L. The Predicted Proteomic Network Associated with the Antiarthritic Action of Qingfu Guanjieshu in Collagen-II-Induced Arthritis in Rats. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2013.

WANKOWICZ, Z.; MEGYERI, P.; ISSEKUTZ, A. Synergy between tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 in the induction of polymorphonuclear leukocyte migration during inflammation. **J Leukoc Biol.**, v. 4, n. 43, abr. 1988.

WAXMAN, S. G.; DIB-HAJJ, S.; CUMMINS, T. R., BLACK, J. A. Sodium channels and pain. **Proc Natl Acad Sci**, v. 96, n. 14, p. 7635-7639, jul. 1999.

WEBER, E. S. Fish analgesia: pain, stress, fear aversion, or nociception?. **VET CLIN NORTH AM EXOT ANIM PRACT.**, v. 1, n. 14, p.21-32, jan. 2011.

WILLMENT, J. A.; LIN, H.; REID, D. M.; TAYLOR, P. R.; WILLIAMS, D.; WONG, S. C.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Dectin-1 Expression and Function Are Enhanced on Alternatively Activated and GM-CSF-Treated Macrophages and Are Negatively Regulated by IL-10, Dexamethasone, and Lipopolysaccharide **J Immunol**, v. 171, n. 9, p. 4569-4573, 2003.

WHITE, F.A.; BHANGOO,S. K.; MILLER, R. J. Chemokines: integrators of pain and inflammation. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 10, n. 4, 834-844, out. 2005.

XU, W. D.; ZHANG, M.; ZHANG, Y. J.; YE, D. Q. IL-33 in rheumatoid arthritis: Potential role in pathogenesis and therapy. **Hum Immunol.**, jun. 2013.

YAMAMOTO, T. Angiogenic and inflammatory properties of psoriatic arthritis. **ISRN Dermatol.**, mai. 2013.

ZARPELON, A. C.; SOUZA, G. R.; CUNHA, T. M.; SCHIVO, I. R.; MARCHESI, M.; CASAGRANDE, R.; PINGE-FILHO, P.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H.; MIRANDA, K. M.; VERRI, W. A. J. The nitroxyl donor, Angeli's salt, inhibits inflammatory hyperalgesia in rats. **Neuropharmacology.**, v. 71, p. 1-9, mar. 2013.

ZHOU, Z. H.; WANG, J. X.; LIU, B. J.; LI, M.; LU, Y.; CHEN, H. S. Contribution of the spinal P2X7 receptors to bee venom-induced nociception and inflammation in conscious rats. **Neurosci Lett.**, v. 2, n. 531, p. 145-148, dez. 2012.

ZHU, Y. J.; LU, T. J. A multi-scale view of skin thermal pain: from nociception to pain sensation. **Philos Trans A Math Phys Eng Sci.**, v. 1912, n. 368, p. 521-559, fev. 2010.

ANEXO



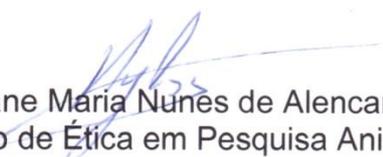
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº83/11, sobre o projeto intitulado: **“INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO ÓLEO DA POLPA DE PEQUI *Caryocar coriaceum Wittm* EM MODELOS EXPERIMENTAIS.”**, de responsabilidade da Prof^ª. Dra. Mariana Lima Vale, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 07 de dezembro de 2011.

Fortaleza, 26 de março de 2012


Prof.ª Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA