



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

LUANA DAVID DO CARMO

**PROTEÍNAS ISOLADAS DO LÁTEX DE *HIMANTHUS DRASTICUS* (MART.)
PLUMEL APOCYNACEAE REDUZEM A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E
NOCICEPTIVA NA ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN EM CAMUNDONGOS**

Fortaleza

2015

LUANA DAVID DO CARMO

PROTEÍNAS ISOLADAS DO LÁTEX DE *HIMANTHUS DRASTICUS* (MART.)
PLUMEL APOCYNACEAE REDUZEM A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E
NOCICEPTIVA NA ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN EM CAMUNDONGOS

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. Nylane Maria Nunes de Alencar

2015

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

C285

Carmo, Luana David do.

Proteínas isoladas do látex de *himatanthus drasticus* (mart.) plumel apocynaceae reduzem a resposta inflamatória e nociceptiva na artrite induzida por zymosan em camundongos./ Luana David do Carmo. – 2015.

89f.: 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, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2015.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientação: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.

1. Artrite. 2. Apocynaceae. 3. Neutrófilos. 4. Látex. I. Título.

CDD 616.722

LUANA DAVID DO CARMO

PROTEÍNAS ISOLADAS DO LÁTEX DE *HIMANTHUS DRASTICUS* (MART.)
PLUMEL APOCYNACEAE REDUZEM A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E
NOCICEPTIVA NA ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN EM CAMUNDONGOS

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: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rondinelle Ribeiro Castro
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dedico...

À Deus e a minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre me mostrou que desistir nunca seria uma opção, que me deu forças e me mostrou que nem sempre o que eu queria era o melhor para mim, que sempre me permitiu enxergar soluções frente aos novos desafios e que me deu saúde para concluir mais essa etapa na minha vida.

Agradeço aos professores Márcio Viana Ramos e Rondinelle Ribeiro Castro por aceitarem participar da minha banca e contribuírem para o enriquecimento do meu aprendizado.

À professora Virgínia Cláudia Carneiro Girão por ter participado da minha banca de qualificação e pela imensa contribuição na elaboração desse trabalho.

À professora Mariana Lima Vale por ter participado da minha banca de qualificação e por fornecer condições para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao doutorando Fábio Bezerra que me ensinou, me apoiou e me ajudou nos experimentos, dizer obrigada é muito pouco pela tamanha contribuição nesse estudo.

À minha orientadora professora Nylane Maria Nunes de Alencar pela orientação, pelo apoio, por fornecer condições para o desenvolvimento desse trabalho, por me fazer enxergar novos caminhos na pesquisa e pela contribuição no meu crescimento profissional.

Aos companheiros de laboratório pela ajuda nos experimentos diretamente e indiretamente Patrícia Sâmara, Ingrid Figueiredo, Daniele Teixeira, Patrícia Bastos, Rachel Sindeaux e Larisse Marques.

Aos estudantes de iniciação científica pela ajuda nos experimentos Gisele, Yuri, Fábio e Marília.

Aos meus amigos pelo apoio, pelos momentos de descontração e desabafo, não sei o que seria de mim sem vocês Tamiris Goebel, Juliano Casemiro, Lívia Galvão, Anália Almeida, Daisy Lima, Anamaria Falcão e Bruna Ferreira. Vocês são essenciais em minha vida.

Aos meus amigos Marcizo Veimar e Raquel Alves que sempre me apoiaram e me orientaram ajudando no meu crescimento profissional e principalmente no pessoal. Espero que nossa amizade agradeça cada vez mais.

À minha família que muitas vezes mesmo não entendendo meu trabalho me deu suporte e me incentivou a seguir em frente e buscar meus objetivos. Em especial aos meus pais Antônia Maria e Francisco Otaviano fonte de inspiração de caráter e força de vontade, aos meus irmãos Jéssica, Jonathan e Jorgiana por acreditarem em meu potencial e me incentivarem e às minhas sobrinhas Ariadne e Ariela razão da minha alegria e motivo para querer ser uma pessoa melhor.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho. Meu muito obrigada!

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”
(Albert Einstein).

RESUMO

Himatanthus drasticus é uma planta laticífera pertencente à família Apocynaceae encontrada na América do Sul e conhecida popularmente como janaguba. Seu látex é conhecido como “leite de janaguba” e apresenta várias atividades farmacológicas. O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito das proteínas isoladas do látex de *Himatanthus drasticus* (HdLP) em modelo de artrite experimental induzida por zymosan (Zy). A artrite foi induzida em camundongos machos swiss (n=6) através da administração de 0,1 mg Zy i.a. Os animais foram tratados com HdLP (5 e 50 mg/kg i.v.) ou Salina i.v. 1 hora após o Zy e com HdLP (50 mg/kg v.o.) ou Dexametasona (2 mg/kg s.c.) 1 hora antes do Zy. Seis horas após a indução os animais foram eutanasiados, foi realizada a lavagem da articulação e o lavado articular coletado para avaliação do efeito de HdLP sobre a migração de leucócitos, atividade da mieloperoxidase (MPO) e liberação de mediadores inflamatórios (NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10). O edema foi avaliado pela medição do diâmetro transversal da articulação e pela avaliação da permeabilidade vascular. Além disso, foi avaliado o efeito de HdLP sobre processo inflamatório na membrana sinovial e sobre a hipernocicepção mecânica utilizando uma versão eletrônica (VonFrey). Para as análises estatísticas foi utilizado o teste ANOVA/Bonferroni ou Kruskal Wallis/Dunns; p <0,05 foi considerado significativo. Este estudo foi aprovado pela Comissão de ética em Pesquisas com Animais da UFC - CEPA (38/14). HdLP 50 mg/kg i.v. apresentou uma diminuição significativa na contagem de leucócitos, nos níveis de MPO e na liberação de mediadores inflamatórios (NO, IL-1 β , e IL-6). Também foi observado uma diminuição do edema e no dano à membrana sinovial. Na hipernocicepção mecânica os grupos (HdLP 50 mg/kg i.v. e 50 mg/kg v.o.) apresentaram um aumento no limiar nociceptivo. HdLP apresenta atividade antinociceptiva e anti-inflamatória no modelo de artrite induzida por Zy. O efeito parece estar relacionado com a diminuição da migração de neutrófilos e da liberação de mediadores inflamatórios, reduzindo o dano na membrana sinovial e a hipernocicepção.

Palavras chaves: Artrite, Apocynaceae, Neutrófilos, Látex.

**PROTEIN ISOLATED FROM *Himatanthus drasticus* LATEX (MART .) Plumel
APOCYNACEAE REDUCE INFLAMMATORY RESPONSE AND NOCICEPTIVE IN
ARTHRITIS INDUCED BY ZYMOSAN IN MICE**

ABSTRACT

Himatanthus drasticus is a laticiferous plant of the family Apocynaceae found in South America and popularly known as janaguba. Your latex is known as "janaguba milk" and has several pharmacological activities. This work aimed to study the effect of isolated proteins from *Himatanthus drasticus* latex (HdLP) zymosan (Zy) induced arthritis. Arthritis was induced in male Swiss mice (n = 6) by administering 0.1 mg Zy intra-articular. The animals were treated with HdLP (5 and 50 mg/kg i.v.) or Saline i.v. 1 hour after the Zy and HdLP (50 mg/kg v.o.) or Dexamethasone (2 mg/kg s.c.) 1 hour before Zy. After six hours of induction the animals were euthanized, the joint washing carried, and collected for leukocyte count, determination of the myeloperoxidase (MPO) activity and inflammatory mediators (NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10). The edema was evaluated by measuring the diameter articular and the vascular permeability through extravasation. In addition, we evaluated the effect of HdLP on synovial inflammation as well the mechanical hypernociception. For statistical analysis we used the ANOVA/Bonferroni or Kruskal Wallis/Dunns; p <0.05 considered significant. This study was approved by the Ethics Committee on Animal Research of the UFC - CEPA (38/14). HdLP (50 mg/kg i.v.) a significant decrease on the leukocyte count in MPO activity and levels (NO, IL-1 β , and IL-6). It was also observed a decrease in swelling and damage to the synovial membrane. The nociceptive threshold was increased by HdLP 50 mg/kg i.v. and 50 mg/kg v.o. HdLP has antinociceptive and anti-inflammatory activity in the model of arthritis induced by Zy. The effect seems to be related to the decreased migration of neutrophils and the release of inflammatory mediators, reducing damage to the synovial membrane and hypernociception.

Keywords: Arthritis, Apocynaceae, Neutrophils, Latex.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	<i>Himatanthus drasticus</i> e o “leite de janaguba”	32
Figura 2	HdLP reduz o influxo celular na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	47
Figura 3	HdLP reduz a atividade da mieloperoxidase (MPO) na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	49
Figura 4	HdLP reduz o edema na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	51
Figura 5	HdLP reduz o nível de nitrito/nitrato na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	54
Figura 6	HdLP modula a produção de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	56
Figura 7	HdLP reduz o processo inflamatório da membrana sinovial na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	58
Figura 8	Representação histológica da proliferação sinovial e comprometimento da membrana sinovial	59
Figura 9	Representação histológica do infiltrado celular na membrana sinovial	60
Figura 10	HdLP reduz a hipernocicepção na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
AINEs	Anti-inflamatórios Não Esteróides
HLA	Antígenos leucocitários Humanos
AP	Artrite Psoriática
AR	Artrite Reumatóide
CFA	Completo Adjuvante de Freund
CD	Célula Dendrítica
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
COX	Ciclooxigenase
DMARDs	Drogas Modificadoras da Doença
EA	Espondile Anquilosante
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
Hr	Hora
g	Gramas
HdLP	Proteínas isoladas do látex de <i>Himatanthus drasticus</i>
IFN- γ	Interferon gama
i.a.	Intra-articular
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
i.p.	Intraperitoneal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
kD	Kilodalton

kg	Quilograma
mBSA	Albumina de Soro Bovino metilada
mg	Miligrama
µL	Microlitros
ml	Mililitro
MPO	Mieloperoxidase
MMP	Metaloproteinase
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Nível de significância
PBS	Tampão Fosfato Salina
pg	Picograma
PGE2	Prostaglandina E2
RPM	Rotações por Minuto
s.c.	Subcutânea
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alpha
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
UMPO	Unidade de Mieloperoxidase
v.o.	Via Oral
Zy	Zymosan

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Artrite	16
1.2	Inflamação na articulação	20
1.3	Modelos experimentais de artrite	26
1.4	Potencial farmacológico de plantas laticíferas	28
1.5	<i>Himatanthus drasticus</i> (MART.) PLUMEL	30
2	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo Geral	35
3.2	Objetivos específicos	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	Animais	36
4.2	Drogas e reagentes	36
4.3	Equipamentos e materiais	37
4.4	Coleta do látex e Isolamento da fração proteica de <i>Himatanthus drasticus</i>	37
4.5	Administração da fração proteica de <i>Himatanthus drastricus</i> (HdLP)	38
4.6	Indução da artrite por zymosan (AZy)	39
4.7	Coleta do lavado articular	39
4.8	Contagem total de leucócitos no lavado articular	39
4.9	Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO) no lavado	40

	articular	
4.10	Análise do Edema na Articulação do Joelho	40
4.10.1	Medição do diâmetro transversal da articulação	40
4.10.2	Permeabilidade Vascular por Extravasamento de Azul de Evans na Articulação	41
4.11	Determinação dos níveis de nitrato/nitrito no lavado articular	42
4.12	Dosagem de citocinas no lavado articular	42
4.13	Histopatologia – Método H&E	43
4.14	Avaliação do efeito antinociceptivo de HdLP	44
4.15	Análises Estatísticas	44
5	RESULTADOS	46
5.1	HdLP reduz o influxo celular na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	46
5.2	HdLP reduz a atividade da mieloperoxidase (MPO) na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	48
5.3	HdLP reduz o edema na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	50
5.4	HdLP reduz nível de óxido nítrico na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	53
5.5	HdLP modula a produção de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	55
5.6	HdLP reduz o processo inflamatório da membrana sinovial na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	57
5.7	HdLP reduz a hipernocicepção na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	61

6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 Artrite

O termo artrite é utilizado na Saúde Pública para descrever mais de 100 condições que afetam as articulações e seus tecidos adjacentes. O padrão, a gravidade dos sintomas e localização pode variar, dependendo da forma específica da doença. Geralmente são caracterizadas por dor e rigidez em torno e uma ou mais articulações desenvolvendo-se gradualmente ou de repente. Estima-se que no ano de 2003 nos EUA, os gastos com doenças reumáticas chegaram a cerca de 128 milhões de dólares (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014). As principais artropatias inflamatórias que são encontrados na prática clínica são a artrite reumatóide, artropatia psoriática, artrite reativa e espondilite anquilosante (FLEMMING, BERNARD, 2013).

A artrite reumatóide (AR) é a artropatia crônica inflamatória mais prevalente e a maior responsável por invalidez, seja ela temporária ou permanente (JUNIOR e ROCHA, 2006). É uma doença autoimune ocorrendo por uma falha no sistema imune (sistema de defesa do corpo) acionando-o contra tecidos saudáveis, nesse caso contra as articulações (AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY, 2012).

Nos Estados Unidos o número de adultos acometidos pela doença chega a 50 milhões (22%) e baseando-se nos dados atuais acredita-se que no ano de 2030 esse número possa chegar a 67 milhões (25%) (Centers for Disease Control and Prevention, 2013). No Brasil estima-se que a AR acometa cerca de 1,3 milhão de pessoas e que estes números devem aumentar com o crescimento da população idosa (MOTA *et al.*, 2011). A AR é mais prevalente em mulheres numa proporção de 3:1 em relação aos homens, acomete diversos grupos populacionais e ocorre em

todas as etnias. Geralmente os primeiros sintomas aparecem depois dos 40 anos, no entanto nas mulheres esses sintomas podem aparecer mais precocemente (VAZ *et al.*, 2013).

A principal característica da AR é o acometimento simétrico das pequenas e das grandes articulações, sendo as articulações das mãos e dos pés as mais afetadas. O desenvolvimento da doença acarreta uma importante limitação funcional, podendo chegar a uma perda da capacidade laboral, além de deformidades irreversíveis, por isso a importância do diagnóstico ser feito na fase inicial da doença para iniciar o tratamento e o controle da doença, evitando o seu avanço e uma menor sobrevida (MOTA *et al.*, 2013). Entre as manifestações articulares estão: dor e entumecimento, derrames em grandes articulações, rigidez matinal, atrofia muscular periarticular, deformidades. Em relação às manifestações extra articulares podem ocorrer: febre, astenia, fadiga, modificações cutâneas e vasculares, linfadenopatia, esplenomegalia, manifestações oculares, cardíacas, respiratórias, neuropatias reumáticas, anemia e a presença de nódulos reumatóides subcutâneos (FERREIRA *et al.*, 2008).

Sabe-se que a AR inicia-se com a ativação dos linfócitos T CD4+ que recrutam antígenos artritogênicos no tecido sinovial. Estes linfócitos causam uma estimulação dos monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais que secretam metaloproteinases, enzimas envolvidas na erosão e degradação de ossos e cartilagens (HIRUMA-LIMA, 2012). Acredita-se também que o desenvolvimento da AR está relacionado a outros fatores como a influência de fatores genéticos e ambientais (MACGREGOR *et al.*, 2000). A hereditariedade é o fator de risco predominante estando relacionada aos antígenos leucocitários humanos (HLA). A presença dos alelos HLA-DRB1 é o fator genético mais importante de suscetibilidade

para a AR, sendo também um indicativo de maior gravidade da doença (USNAYO *et al.*, 2011).

O tratamento da AR tem como objetivo prevenir ou controlar a lesão articular, prevenir a perda de função e diminuir a dor, com intuito de melhorar a qualidade de vida dos pacientes (BÉRTOLO *et al.*, 2007). A remissão completa da doença com o tratamento raramente é alcançada, além disso, os medicamentos utilizados atualmente causam diversos efeitos adversos e necessitam de monitoramento cuidadoso (ARTHRITIS FOUNDATION, 2014). Atualmente, as classes de medicamentos utilizadas são: analgésicos, anti-inflamatórios não esteroides (AINES), corticosteroides, fármacos antirreumáticos modificadores da doença (DMARD) e terapias com agentes biológicos, como bloqueadores de TNF, depletors de linfócitos B e moduladores da co-estimulação (BRATS, 2012).

Os analgésicos são utilizados para aliviar as dores, os anti-inflamatórios reduzem a inflamação que acompanha a doença, os corticosteroides tratam a inflamação das articulações e órgãos, os medicamentos antirreumáticos modificadores da doença são utilizados para diminuir ou parar o desenvolvimento da doença e os agentes biológicos para controlar a resposta imune (ARTHRITIS FOUNDATION, 2014). Além disso, esses medicamentos também podem ocasionar diversos efeitos adversos, dentre eles os mais comuns são anemia, neutropenia, náuseas, diarreia, vômitos, mucosite, alterações das enzimas hepáticas, dor abdominal e exantema cutâneo. Já em relação aos agentes biológicos essas reações podem ser mais graves como aumento na chance de infecções, disfunção cardíaca, fenômenos autoimunes (produção de auto anticorpos), vasculites cutâneas, doença pulmonar entre outros (MOTA *et al.*, 2011).

A artrite psoriática (AP) pode ser definida como doença inflamatória crônica das articulações sinoviais associada à psoríase, uma afecção cutânea inflamatória poligênica com fatores desencadeantes como traumas, infecções e medicamentos caracterizada pela presença de placas eritematosas e descamativas de bordas bem definidas. Geralmente é negativa para o fator reumatoide (FR) e encontra-se atualmente classificada no grupo das espondiloartrites e as manifestações clínicas comuns são a artrite de articulações periféricas e do esqueleto axial. A Fundação Nacional de Psoríase na América do Norte, estima que a prevalência da AP esteja estimada em cerca de 0,25% na população americana (RUIZ, AZEVEDO, SANTOS, 2012; CHANDAN *et al.*, 2008).

Artrite reativa, conhecida antigamente como doença de Reiter, é uma espondiloartrite que ocorre frequentemente em pacientes do sexo masculino após uma doença infecciosa, por exemplo, doença sexualmente transmissível ou diarréica. Apresenta uma forte predileção pelos membros inferiores e como outras artropatias pode ser confundido com uma lesão esportiva. É auto-limitada na maioria dos pacientes, mas pode evoluir para a doença incapacitante grave (FLEMMING, BERNARD, 2013).

Espondilite anquilosante (EA) é uma doença inflamatória crônica que acomete preferencialmente a coluna vertebral, podendo evoluir com rigidez e limitação funcional progressiva do esqueleto axial. Geralmente inicia a partir dos 20 anos e preferencialmente em indivíduos do sexo masculino. O sintoma inicial é a lombalgia inflamatória, com rigidez matinal prolongada e predomínio dos sintomas axiais durante sua evolução (SAMPAIO-BARROS *et al.*, 2007).

1.2 Inflamação na articulação

A articulação é recoberta pela cartilagem articular, ligamentos e pela membrana sinovial que delimita a cavidade preenchida pelo líquido sinovial. Essa membrana é constituída por sinoviócitos do tipo A, macrófagos sinoviais, e do tipo B, fibroblastos sinoviais, vasos sanguíneos e nervos sensoriais, enquanto a cartilagem articular é composta por uma matriz extracelular (colágeno, proteoglicanos e ácido hialurônico) e pelos condrócitos (FERNANDES *et al.*, 2007).

O desenvolvimento da inflamação na articulação ocasiona inicialmente algumas alterações como danos nas células endoteliais, edema sinovial, deposição de fibrina, invasão de leucócitos polimorfonucleares e hiperplasia nas células de revestimento (CASSIM, MODY e BHOOLA, 2002).

Em resposta à inflamação, a membrana sinovial sofre mudanças que podem comprometê-la, ocorre hiperplasia do revestimento sinovial, proliferação de vasos sanguíneos e ativação de células endoteliais, as quais são estimuladas a produzir moléculas de adesão e quimiotaxinas que facilitam o influxo de células inflamatórias adicionais (FALEIRO, ARAÚJO e VARAVALLO, 2011). Os fibroblastos sinoviais são ativados por citocinas pró-inflamatórias e proliferam desenvolvendo um tecido hiperplásico. Esse tecido proliferativo cresce como um tumor benigno invadindo a cartilagem, ativando os condrócitos e liberando enzimas proteolíticas que degradam a cartilagem e o osso, além disso, ocorre um aumento da permeabilidade vascular o que gera um aumento no fluido sinovial, como resultado desse processo inflamatório ocorre erosão e destruição das articulações, do osso subcondral, dos tendões e ligamentos, o que leva a um quadro de dor e incapacitação (FERNANDES, 2008; FILIPPIN, 2008; KHURANA e BERNEY, 2005).

Uma articulação inflamada apresenta hiperplasia da sinóvia, aumento do fluido sinovial, grandes infiltrados celulares (neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, células T, células B e células dendríticas), levando a uma erosão e remodelamento do osso e da cartilagem da articulação (WIPKE e ALLEN, 2001).

As células T, células B e macrófagos infiltram a sinóvia e formam agregados linfóides, enquanto macrófagos e fibroblastos sinoviócitos causam hiperplasia de enzimas secretoras degradativas. No entanto, antes desses eventos ocorrerem, os neutrófilos migram para o líquido sinovial, onde eles atuam como fagócitos liberando proteases. Os neutrófilos fazem parte da imunidade inata e são importantes para a defesa patogênica. É o primeiro tipo de célula a chegar aos locais de inflamação, seguido por monócitos (CASCÃO *et al.*, 2010). Os neutrófilos geram sinais quimiotáticos que atraem monócitos e células dendríticas (CD), além de influenciar na diferenciação de macrófagos com a produção de citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- α). TNF- α também é um estimulador de linfócitos B, ajudando na sua proliferação e maturação e juntamente com o IFN- γ também atua na diferenciação de células T (NATHAN, 2006).

A função principal dos neutrófilos é reconhecer, fagocitar e destruir microorganismos invasores protegendo o hospedeiro de infecções, conseqüentemente ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio e uma variedade de proteases, as quais são citotóxicas podendo causar danos teciduais (WIPKE e ALLEN, 2001). Essas células de defesa são atraídas até as articulações por meio de quimioatraentes, onde são expostas a uma variedade de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-6, que alteram sua ativação, função e processo apoptótico (DOMINICAL *et al.*, 2010).

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, responsáveis pela comunicação direta entre as células, participam das respostas fisiológicas e são importantes no desenvolvimento da inflamação e da resposta do sistema imune (CASSIM, MODY e BHOOLA, 2002).

As citocinas provenientes de macrófagos e fibroblastos apresentam-se em grandes quantidades na membrana sinovial, onde se observa um predomínio da atividade das células Th1 e uma baixa atividade de células Th2. Portanto, na artrite ocorre um desequilíbrio na regulação da amplitude e duração da inflamação, as citocinas pró-inflamatórias predominam, onde TNF- α , IL-1 β e IL-6 apresentam maior destaque. No entanto, mesmo com esse predomínio de citocinas pró-inflamatórias também se observa a presença de mediadores anti-inflamatórios como a IL-10, mas em níveis insuficientes para suprimir a inflamação (CHOY, 2012; TAYLOR, MEHTA e TULL, 2010; FURTADO *et al.*, 2012).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória que exerce efeito sobre diferentes tipos de células e desempenha papel crítico na patogênese das doenças inflamatórias crônicas como a AR. Exerce ação citotóxica sobre diferentes tipos de linfócitos e células endoteliais, estimulando sua apoptose (MOTA *et al.*, 2014). Esta citocina pode ser secretada por macrófagos, células linfoides e endoteliais, adipócitos, fibroblastos dentre outras. (AZEVEDO, FAVRETTO e SANTOS JUNIOR, 2010). O TNF- α é capaz de induzir a secreção de outras citocinas inflamatórias como a IL-1 e IL-6. Além disso, a presença do TNF- α em altas concentrações no líquido sinovial induz a sua própria produção pelos monócitos e macrófagos. Esta citocina, juntamente com a IL-1, estimula fibroblastos, condrócitos e osteoclastos a liberarem metaloproteinases da matriz que agem diretamente na destruição da cartilagem articular. TNF- α também inibe a produção

de alguns mediadores teciduais que têm como função inativar as metaloproteinases da matriz, gerando uma maior destruição articular (CHOY e PANAYI, 2001). Essas duas citocinas também promovem a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais do tecido sinovial levando ao recrutamento de neutrófilos para dentro das articulações, onde esses neutrófilos atuam liberando uma série de enzimas que degradam a cartilagem. Por fim, essa sequência de eventos resulta em um dano articular intenso quando se soma a produção aumentada de metaloproteinases da matriz e o recrutamento de polimorfonucleares, os quais promovem a destruição da cartilagem articular podendo levar a uma erosão óssea (KAY, CALABRESE, 2004).

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos, sendo crucial para o desenvolvimento da artrite. Essa citocina é capaz de ativar vários tipos de células como células T e B, fibroblastos, osteoblastos, células endoteliais e epiteliais, além de estimular a produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-6 e TNF- α . Estimula a produção das células T, levando a uma ativação de células B o que favorece a uma produção de anticorpos ocasionando a perpetuação da doença. IL-1 β também está envolvida na diferenciação de células Th17. (BURGUER *et al.*, 2006).

A IL-6 é uma citocina que atua em diferentes células, sendo encontrada em altos níveis em diversas doenças inflamatórias. A IL-6 atua estimulando hepatócitos a produzirem proteínas de fase aguda, por exemplo, a proteína C reativa, fibrinogênio e proteína amiloide A, além de atuar na diminuição da produção de albumina (SOUZA *et al.*, 2010). Possui efeitos sobre a maturação e ativação de células B e T, macrófagos, condrócitos, osteoclastos, e células endoteliais, também apresenta efeitos sobre a hematopoiese na medula óssea (BRENNAN e MCLNNES, 2008). Na artrite a produção da IL-6 resulta no recrutamento de células inflamatórias

mononucleares. Além disso, promove o recrutamento de células T através da regulação da secreção de quimiocinas durante a inflamação e contribui para o desenvolvimento de células B, desempenhando assim um papel importante em várias doenças inflamatórias (CHOY, 2011).

A IL-17 é uma citocina pro-inflamatória e também está relacionada com o desenvolvimento da artrite, um estudo demonstrou que essa citocina é bastante produzida no tecido sinovial acometido por essa doença (CHABAUD *et al.*, 1999). A IL-17 atua sobre vários tipos de células incluindo células do sistema imunológico, células epiteliais e fibroblastos. Essa citocina induz a produção de outras citocinas inflamatórias, por exemplo, IL-1 β e TNF- α , levando ao recrutamento e ativação de neutrófilos, linfócitos e macrófagos, resultando em uma inflamação local e danos nos tecidos. A IL-17 também pode induzir diretamente uma lesão no tecido pela hiper-regulação da expressão de metaloproteinases na matriz (BURMESTER, FEIST e DONER, 2014).

A regulação da inflamação ocorre predominantemente pelas citocinas pró-inflamatórias, no entanto essa regulação também pode ser influenciada pelas citocinas anti-inflamatórias, tais como a Interleucina-4 (IL-4) e Interleucina-10 (IL-10). Estes mediadores podem atuar inibindo a atividade de células Th1. Além disso, eles também podem ter um efeito inibidor direto sobre a atividade de macrófagos na membrana sinovial (LUBBERTS e BERG, 2000). IL-4 é produzida por células Th2 e participa da diferenciação de células B, enquanto a IL-10 é produzida por monócitos, macrófagos, células T e B. Essas citocinas podem atuar inibindo a produção de IL-1 β e TNF- α , resultando na inibição da degradação da cartilagem (CHOY e PANAYI, 2001). A IL-4 tem um efeito inibidor sobre a degradação de proteoglicanos na cartilagem articular, inibindo a secreção de metaloproteinases e reduzindo a

produção de proteoglicanos. Já a IL-10 está envolvida na estimulação da síntese de colágeno do tipo II e na inibição da produção de metaloproteinases. Além disso, tanto a IL-10 como a IL-4 inibem a apoptose dos condrócitos (PIOTR, PONIATOWSKI e SZUKIEWICZ, 2014).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula produzida endogenamente que desempenha um papel crítico na sinalização celular, e que está envolvida em vários processos fisiológicos como na regulação do tônus muscular e na modulação do sistema imunológico, além de sua ação bactericida. O NO é produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual possui três isoformas a NOS neuronal (nNOS), NOS induzível (iNOS) e NOS endotelial (eNOS). Essa enzima sintetiza o NO a partir da L-arginina e oxigênio, utilizando a nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) (ROCHA *et al.*, 2003; DUSSE, VIEIRA, CARVALHO, 2003).

Em artropatias inflamatórias as células residentes articulares como sinoviócitos e condrócitos, além dos osteoblastos são capazes de liberar NO, seja pela forma constitutiva, ou por estímulo de citocinas inflamatórias como TNF e IL-1 (LEITE *et al.*, 2009).

NO atua ativando metaloproteinases da matriz, inibindo a síntese do colágeno e proteoglicano pelos condrócitos, e promovendo a vasodilatação, levando ao influxo de fluido e células para o sítio inflamatório, o que resulta em destruição articular, edema e dor (BINGHAM, 2002).

Na inflamação das articulações ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de radicais livres (RLs), levando ao estresse oxidativo, o qual pode provocar fenômenos autoimunes e destruição do tecido conjuntivo no interior da sinóvia (ALI *et al.*, 2014). As espécies reativas de oxigênio representam os mediadores e efetores da lesão da cartilagem, pois quando produzidos em excesso

podem levar a uma aceleração no dano à cartilagem articular e ativação de osteoclastos (FILIPPIN *et al.*, 2008). NO combinado com ânion superóxido também pode produzir peroxinitrito, que promove a apoptose dos condrócitos (BINGHAM, 2002).

1.3 Modelos experimentais de artrite

Os modelos de artrite em animais auxiliam na elucidação da fisiopatologia da doença, além de permitir o estudo de possíveis tratamentos para reduzir ou bloquear o processo inflamatório desenvolvido na artrite. Para induzir a artrite experimentalmente são utilizadas algumas substâncias como o adjuvante completo de Freund (CFA), antígenos, colágeno ou zymosan (CARDOSO *et al.*, 2010).

O modelo de artrite induzida por adjuvante é um modelo que reproduz em animais os sinais e sintomas semelhantes à artrite em humanos. O modelo imita a patologia da doença, incluindo alterações histopatológicas, infiltração, hipersensibilidade e inchaço da articulação afetada (GOMES *et al.*, 2014; BARTON *et al.*, 2007). O modelo de indução por antígeno (AIA) também é utilizado por mimetizar características da artrite em humanos, por exemplo, hiperplasia da membrana sinovial, infiltração inflamatória das articulações e destruição da cartilagem. AIA pode ser induzida por uma imunização sistêmica com albumina de soro bovino metilada (mBSA), ovalbumina (OVA), ácido hialurônico entre outros, desencadeando uma reação inflamatória aguda (ROTH *et al.*, 2005; POHLERS *et al.*, 2004). O modelo de indução por colágeno também apresenta vários dos parâmetros clínicos e imunológicos observados na doença humana. Esse modelo é bastante reprodutível e tem sido utilizado para identificar os mecanismos

patogênicos da doença e para teste de novas terapêuticas (BRAND, LATHAM, ROSLONIEC, 2007).

A artrite induzida por zymosan (Zy) é um modelo de baixo custo operacional, possui início definido e permite a reprodução da lesão em um pequeno prazo, podendo ser utilizado em modelos agudos. O modelo mimetiza a inflamação que ocorre na fase aguda da doença em humanos. O zymosan é um polissacarídeo derivado da parede celular de um fungo *Saccharomyces cerevisiae*, onde a β -glucana é seu componente estrutural principal. A β -glucana caracteriza-se por suas propriedades de imunoestimulação, sendo bastante utilizada para estudar o efeito dos leucócitos em modelos inflamatórios (JUNIOR e ROCHA, 2006; FRASNELLI *et al.*, 2004).

O Zy pode ser injetado em tecidos, na pele, cavidade peritoneal ou intra-articular produzindo uma reação inflamatória. Os mecanismos de ativação dessa reação inflamatória são vários podendo ativar a via alternativa do complemento, induzir a degranulação de mastócitos para liberação de aminas vasoativas como serotonina e histamina, capaz de gerar produtos do metabolismo do ácido araquidônico, além de estimular a liberação de mediadores inflamatórios por macrófagos, neutrófilos e células sinoviais (CHAVES *et al.*, 2011).

A injeção intra-articular de Zy ocasiona a incapacitação articular e a partir da terceira hora após a administração do Zy pode-se observar a presença de hiperalgesia. A partir de sexta hora após a administração do Zy ocorre o aumento da permeabilidade vascular, edema e intenso influxo leucocitário na cavidade articular, levando a uma sinovite progressiva com infiltrado celular e ativação de fibroblastos. Também ocorre a participação do NO nesse modelo experimental, observando-se

um aumento dos níveis de nitrato/nitrito nos exsudatos articulares (LEITE *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2008).

O modelo também pode ser utilizado para estudar a fase crônica da artrite. JUNIOR e ROCHA (2003) evidenciaram que até o 28º dia após a injeção do zymosan a sinovite persiste, havendo formação de células gigantes e intensa proliferação linfocitária na membrana sinovial. As células gigantes podem ser observadas a partir do 14º dia de artrite e a inflamação ocasionada na articulação lembra o pannus reumatóide, levando à lise da cartilagem articular e do osso subcondral. Inicialmente, a inflamação associada à injeção do zymosan foi atribuída à ativação do complemento e liberação de enzimas lisossomiais a partir de células inflamatórias migradas para o local. O estudo de Frasnelli *et al.*,(2005) utilizando camundongos *knockout* para o receptor do tipo *type II toll-like receptors* (TLR2), demonstrou uma redução significativa da sinovite, quando comparados a animais normais. Esse resultado sugere um importante componente de imunidade adquirida participando na fisiopatologia da artrite induzida por zymosan.

1.4 Potencial farmacológico de plantas laticíferas

São chamadas plantas laticíferas as espécies vegetais produtoras de látex, uma suspensão ou emulsão de pequenas partículas de terpenos (óleos essenciais, resinas) e ceras dispersas em uma solução que contém sais, polissacarídeos, ácidos orgânicos, alcaloides entre outros. Geralmente o látex apresenta coloração branca e consistência leitosa sendo encontrado abundante em todas as partes da planta. Nas plantas laticíferas é ressaltada a importância do látex como um mecanismo de defesa do vegetal para selar lesões e contra organismos, por exemplo, fungos e insetos. O látex é armazenado em células ou fileiras de

células especializadas chamadas de laticíferos (RANGEL, NASCIMENTO, 2011; JACOMASSI, MOSCHETA, MACHADO, 2007).

No látex vegetal também podem ser encontradas proteases, enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas. Essas enzimas proteolíticas são de grande relevância para o estudo dos fenômenos biológicos, porque apresentam semelhanças estruturais e funcionais entre as enzimas de plantas e animais. As proteases estão envolvidas em uma grande variedade de processos metabólicos, incluindo a digestão de proteínas de alimentos e diversos mecanismos, por exemplo, a coagulação do sangue, apoptose, diferenciação de tecidos, mecanismos de tumores invasivos, entre outros mecanismos reguladores (COSTA *et al.*, 2010).

Tem sido relatado que o látex pode ser encontrado em cerca de 12.500 espécies de plantas representando 22 famílias, onde as famílias Euphorbiaceae e Apocynaceae estariam entre as maiores detentoras de espécies laticíferas (HAGEL, YEUNG, FACCHINI, 2008; LEWINSOHN, 1991). A família Euphorbiaceae inclui cerca de 11000 espécies e aproximadamente 300 gêneros. Estudos farmacológicos realizados com extratos brutos e compostos isolados das espécies do gênero *Alchornea* demonstram atividades antibacteriana, anti-inflamatória, antiespasmódica, antitripanossômica e antidiarreica e citotóxica (MESQUITA, OLIVEIRA, 2010; CONEGERO *et al.*, 2006). A família Apocynaceae compreende aproximadamente 250 gêneros presentes em duas subfamílias, Apocynoideae e Plumerioideae e 2000 espécies vegetais. O látex dessas espécies geralmente é branco leitoso, mas também pode ser avermelhado ou amarelado. No látex podem-se encontrar hidrocarbonetos poliisoprênicos (borracha), triterpenos, ácidos graxos, fitoesteróis, alcalóides entre outros. No gênero *Himatanthus* a espécie *Himatanthus*

sucuuba apresenta compostos químicos chamados iridóides, encontrados no caule e no látex e estudos farmacológicos evidenciam suas atividades anti-inflamatória e analgésica (SANTOS, LIMA, MACHADO, 2014; DEMARCO, KINOSHITA, CASTRO, 2006).

Nesse contexto, as espécies vegetais produtoras de látex registram grande importância nos estudos etnobotânicos, por serem um grupo de ampla distribuição e terem espécies com usos diferenciados (SANTOS *et al.*, 2013).

1.5 *Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL

As espécies vegetais do gênero *Himatanthus* podem ser encontradas em alguns países da América do Sul dentre eles no Brasil. No território brasileiro a maioria dessas espécies aparece na região amazônica, mas também podem ser encontradas na costa e no centro oeste do país. Já a espécie *Himatanthus drasticus* apresenta uma distribuição mais restrita, podendo ser encontrada no cerrado, caatinga e mata atlântica (LUCETTI *et al.*, 2010). No Ceará essa espécie é encontrada mais frequentemente na Chapada do Araripe, sendo chamada popularmente de janaguba. No Rio Grande do Norte é conhecida como joanaguba, no Piauí como pau-de-leite, na Amazônia como sucúba e como tiborna e em Minas Gerais e na Bahia como jasmim-manga e raivosa (SOUSA, 2009).

Himatanthus drasticus pertence à família Apocynaceae que compreende aproximadamente 2000 espécies, as quais estão distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Essa espécie arbórea cresce até 7 metros de altura e apresenta folhagem densa nas extremidades dos ramos (FIGURA 1A), é chamada de planta laticífera por produzir um látex branco chamado de “leite de janaguba” (FIGURA 1B), o qual é utilizado popularmente em diversas doenças como câncer de

pulmão e linfático, vermes intestinais, febre, úlceras gástricas, analgésico, anti-inflamatório, (FIGURA 1B) (LUZ, 2014; BALDAUF e SANTOS, 2013; AMARO *et al.*, 2006).

FIGURA 1 - *Himatanthus drasticus* e o “leite de janaguba”



Fonte: <http://www.plantaslaticiferas.ufc.br/photomadness/gallery1.html>

Leite *et al.* (2008) demonstraram que o látex da *Himatanthus drasticus* apresenta efeito gastroprotetor no modelo de úlcera induzida por etanol em animais. Outro estudo mostra que o acetato de lupeol isolado do látex apresenta atividade antinociceptiva que pode ser explicada pela sua capacidade de mimetizar os opióides endógenos e atividade anti-inflamatória que pode estar relacionada com a diminuição da expressão de TNF- α e iNOS, além de diminuir as atividades da mieloperoxidase, que resulta na inibição da migração leucocitária para o foco da

inflamação (LUCETTI *et al.*, 2010). Lima (2011) mostrou que o extrato bruto hidroalcoólico apresenta atividade anti-helmíntica em pequenos ruminantes, atividade observada através da redução de ovos e larvas de nematódeos gastrintestinais em ovinos.

No estudo de Sousa *et al.* (2010) foi demonstrado que o extrato metanólico obtido das folhas de *Himatanthus drasticus* possui atividade antitumoral significativa quando administrado pela via oral, apresentando também baixa toxicidade em animais.

Nosso grupo de estudo vem utilizando uma fração proteica isolada do látex de *Himatanthus drasticus* denominada (HdLP) com o intuito de elucidar suas propriedades farmacológicas. Já temos como resultado o estudo de Mousinho *et al.*, (2011) *que* demonstra o efeito antitumoral das proteínas isoladas do látex em modelos de Sarcoma 180 e Carcinoma 256 de Walker e acredita-se que esse efeito possa estar relacionado com as suas propriedades imunoestimulatórias. Outro estudo mostra a atividade gastroprotetora de HdLP, onde essa fração proteica foi eficiente em reduzir as lesões gástricas causadas pelo etanol tendo seu o efeito relacionado com a via NO/GMP/K_{atp}, além de apresentar ação antioxidante (MARQUES, 2011). E o resultado mais recente do nosso grupo de pesquisa demonstra o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do látex administrado por via oral em diferentes modelos de inflamação sem indicativos de toxicidade (MATOS, 2013).

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A artrite é caracterizada por ser uma doença incapacitante que afeta a qualidade de vida dos pacientes, impedindo a realização de suas atividades habituais e profissionais com impacto econômico significativo para o paciente e para a sociedade (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2002). Portanto, tornam-se necessários estudos sobre novas terapias que sejam eficazes, pois os tratamentos disponíveis atualmente não proporcionam a cura apenas objetivam diminuir a atividade da doença, prevenir a ocorrência de dano irreversível nas articulações, aliviar a dor e melhorar a qualidade de vida, além disso, apresentam diversos efeitos adversos e estes influenciam negativamente a vida desses pacientes (BRATS, 2012).

Atualmente, os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica como fonte de novos padrões moleculares úteis para descoberta de fármacos. (VIEGAS JUNIOR, BOLZANI e BARREIRO, 2006). O uso de produtos naturais para o desenvolvimento de novos medicamentos oferece inúmeras vantagens, por exemplo, conhecimento da biodiversidade local e do seu potencial, favorecimento do crescimento econômico, além de proporcionar melhora no nível científico do país (FERRO, BONACELLI e ASSAD, 2006).

Neste contexto, o estudo do efeito das proteínas laticíferas faz-se necessário por estas serem detentoras de atividades anti-inflamatórias, inibindo a produção de mediadores inflamatórios, conseqüentemente, a migração de neutrófilos para o foco inflamatório, um dos fatores iniciais no desenvolvimento da inflamação nessa doença. O estudo desse efeito anti-inflamatório de HdLP poderá tornar possível a utilização destas proteínas como agente farmacológico na

produção de novas terapias capazes de reduzir ou inibir a reação inflamatória na artrite, diminuindo a severidade da inflamação e o quadro clínico.

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral:

Avaliar o efeito de uma fração proteica isolada do látex de *Himatanthus drasticus* (HdLP) na artrite induzida por zymosan em camundongos.

3.2 - Objetivos específicos:

- Estudar o efeito de HdLP sobre o influxo celular através da contagem total de células e atividade da mieloperoxidase (MPO);
- Estudar o efeito de HdLP sobre o edema pela medição do diâmetro transversal da articulação e avaliação da permeabilidade vascular;
- Avaliar o envolvimento de HdLP sobre a liberação de mediadores inflamatórios (NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10);
- Avaliar o processo inflamatório através do padrão histológico na membrana sinovial;
- Estudar o efeito de HdLP sobre a nocicepção mecânica;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) machos, pesando entre 20 a 25 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC e mantidos no Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Todos foram acondicionados em gaiolas apropriadas, sob condições adequadas de luz e temperatura, permanecendo nas mesmas condições ambientais durante os experimentos. Os experimentos foram conduzidos após aprovação da comissão de ética para animais de experimentação da Universidade Federal do Ceará (N° 38/14).

4.2 Drogas e reagentes

Anticorpo biotinilado de interleucina 1 (Dako);

Anticorpo biotinilado de TNF- α (Dako);

Anticorpo biotinilado de interleucina 6 (Dako);

Anticorpo biotinilado de interleucina 10 (Dako);

Dexametasona (Aché);

NADPH (Sigma);

Need (Sigma);

Nitrato redutase;

Nitrito de sódio;

O-dianisidine (Sigma);

Peróxido de hidrogênio, H₂O₂

Solução salina – Cloreto de sódio estéril a 0,9% (Gaspar Viana S/A);

Zymosan.

4.3 Equipamentos e materiais

Agitador para tubos de ensaio mod. TE089 (MARCON);

Balança analítica digital, modelo Ay220 (Shimadzu);

Balança para pesagem dos animais, modelo SF-400 (Kitchenscale);

Banho-maria, modelo 100 (FANEN);

Centrífuga refrigerada, modelo marathon 26 KMR (Fisher Scientific)

Citocentrífuga, modelo 2000D (Cientec);

Estufa, modelo MA033 (Marconi)

Homogeneizador (Ultra SIRRER);

Microscópio óptico binocular, modelo 021 (Quimis®);

Paquímetro digital (Digimatic Caliper, Mitsutoyo Corporation, Japão);

Von Frey eletrônico (Insight).

4.4 Coleta do látex e Isolamento da fração proteica de *Himatanthus drasticus*

Himatanthus drasticus (Mart.) Plumel pertencente à família Apocynaceae foi a espécie vegetal utilizada para a coleta do fluido laticífero. A exsicata foi identificada com o número 40408 pelo taxonomista Edson Paulo Nunes e está depositada no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará.

A coleta do látex foi realizada através de incisões no ápice caulinar de plantas saudáveis e gotejamento em tubos do tipo Falcon diluído em água destilada (1:1 v/v). Em seguida, os tubos foram levemente agitados e mantidos à temperatura ambiente até o seu processamento (MATOS, 2013).

O látex recém-coletado, segundo o descrito acima, foi inicialmente submetido à centrifugação (8.680 x g, 25 minutos, 10 °C). Este procedimento permitiu a precipitação da fração insolúvel rica em dímeros de isopreno (borracha), a qual foi denominada “Hdp” (*Himatanthus drasticus precipitate*). Tal fração foi posteriormente analisada. O sobrenadante obtido foi exaustivamente dialisado contra água destilada por 72 horas, a 25 °C, sob suave agitação. Após a primeira hora de diálise (volume 1:1) a fração não retida pela membrana de diálise (8 kDa) foi coletada e denominada “Água da diálise”. Esta fração é constituída por metabólitos hidrofílicos e de pequeno tamanho molecular ($M_r < 8$ kDa). A fração retida no interior da membrana de diálise foi novamente centrifugada, nas condições anteriormente descritas; o sobrenadante foi recuperado e liofilizado (MATOS, 2013). Esta fração foi denominada “HdLP” (*Himatanthus drasticus látex proteins*) e utilizada no modelo experimental de artrite. A caracterização desta fração proteica foi realizada por Matos (2010) que demonstrou a presença de saponinas, esteróides e taninos, além da ausência de borracha, do triterpeno acetato de lupeol, de fenóis e de flavonoides. A quantificação de polissacarídeos demonstrou que a fração apresenta 45% de polissacarídeos.

4.5 Administração da fração protéica de *Himatanthus drasticus* (HdLP)

Os camundongos foram distribuídos em seis grupos com seis animais cada um. Dois grupos receberam HdLP nas doses de 5 mg/kg e 50 mg/kg dissolvido em salina pela via intravenosa (i.v.) uma hora depois da administração do Zymosan intra-articular (i.a.). Outro grupo recebeu HdLP 50 mg/kg pela via oral (v.o.) através da gavagem uma hora antes do Zymosan. Um grupo foi tratado com a Dexametasona na dose de 2 mg/kg pela via subcutânea (s.c.) uma hora antes do

Zymosan. O grupo controle recebeu apenas o Zymosan (i.a.) e o grupo veículo recebeu apenas salina (i.a.).

4.6 Indução da artrite por zymosan (AZy)

Camundongos foram imobilizados e, em seguida, foi induzida a artrite através da injeção intra-articular (i.a.), no joelho direito, de 0,1 mg de zymosan dissolvido em 10 μ L de solução salina estéril apirogênica em cada animal, utilizando seringa de 1mL e agulha 8 x 0,3 mm. O grupo veículo recebeu apenas salina no joelho direito. Após 6 horas os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

4.7 Coleta do lavado articular

Após a eutanásia dos animais, as cavidades articulares foram lavadas através de duas injeções intra-articulares, seguidas de aspiração, de 10 μ L de salina estéril apirogênica, contendo EDTA 10 mM, utilizando seringa de 1mL e agulha 8 x 0,3 mm, em seguida o lavado coletado foi diluído em salina estéril apirogênica com EDTA para a obtenção de 100 μ L. O lavado articular foi centrifugado (500 g/10 min), o sobrenadante aliquoteado e conservado a -20° C para posterior contagem total de leucócitos, dosagem de citocinas, mieloperoxidase (MPO) e óxido nítrico.

4.8 Contagem total de leucócitos no lavado articular

A contagem do número total de células no lavado articular foi feita em câmara de Neubauer utilizando 10 μ L do lavado articular diluído em 90 μ L da solução de Turk (diluição de 1:10). 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.

4.9 Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO) no lavado articular

A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares e tem sido usada como índice quantitativo para avaliar a inflamação em vários tecidos (SOUZA *et al.*,2001). Para isso, as amostras colhidas previamente foram descongeladas e centrifugadas a 4.500 rpm, durante 10 min a uma temperatura de 4° C e o sobrenadante foi 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 em um leitor de ELISA à 450nm. Os resultados foram expressos como UMPO/µL de lavado.

4.10 Análise do Edema na Articulação do Joelho

4.10.1 Medição do diâmetro transversal da articulação

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 nos tempos 1h, 3h e 6h após a administração. 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 antes da injeção de zymosan (Variação do Diâmetro Articular, mm).

4.10.2 Permeabilidade Vascular por Extravasamento de Azul de Evans na Articulação

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, ficando restritas ao compartimento vascular. No entanto, quando as 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, ou seja, na quinta hora após o zymosan. Após 6 h da injeção de zymosan, os animais foram eutanasiados, e a sinovia e tecidos periarticulados foram dissecados de cada joelho. 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 (1 ml) em tubos de vidro

e foi incubado a 40° C *overnight* para a extração do corante. Cada tubo foi centrifugado durante 10 min a 2.000 rpm, e 100µL do sobrenadante foi separado para a medição da absorbância a 620 nm usando um leitor de ELISA. 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 preparada antes da realização da leitura.

4.11 Determinação dos níveis de nitrito no lavado articular

A detecção de nitrito nos exsudatos sinoviais foi realizada através de kit comercial e baseada na reação de Griess para determinação indireta do óxido nítrico. Os níveis totais de NO² foram determinados com o NO³ nas amostras (0,08 mL) convertido a NO² pela incubação de 0,01 mL de nitrato redutase de espécies de *Aspergillus* (1 unidade/mL) e 0,01 mL de NADPH (1 mM) por 30 minutos a 37°C. Os níveis de NO² foram determinados por espectrofotômetro (540 nm) comparando a absorbância de 0,01 mL de amostra após adição de 0,1 mL do reagente de Griess (ácido sulfanílico a 1% peso/volume, N-1naftil-etilenodiamino 0,1% peso/volume e ácido fosfórico a 5%) aquela aos padrões de nitrito (1-100 µM). A concentração de nitrito foi expressa em mM.

4.12 Dosagem de citocinas no lavado articular

Para determinação das citocinas IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α foi utilizado o sobrenadante coletado do lavado articular, conforme descrito anteriormente. Placas de 96 poços foram incubadas por 12h a 4°C com anticorpo anti-IL-1β, anti-IL-6, anti-IL-10 e anti-TNF-α murino (kit da R&D systems- Cat. Nº DY501 ou DY510, respectivamente). Os anticorpos foram retirados e as placas foram lavadas três

vezes com solução tampão PBS/Tween-20 (0,05% SIGMA), foi adicionado 290µL de BSA para o bloqueio das placas e estas foram incubadas por 1h a 4°C. Após o bloqueio as placas foram lavadas e 100µL das amostras foram adicionadas, a curva padrão foi adicionada em várias diluições e incubada por 2h a 4°C. As placas foram lavadas e incubadas com anticorpo monoclonal biotinilado anti-IL-1β, anti-IL-6, anti-IL-10 e anti-TNF-α diluídos (1:1000 com BSA/Tween 1%). Após o período de incubação à 4°C por 2h, as placas foram lavadas e 100 µL do complexo HRP-avidina diluído 1:5000 foram adicionados. Decorridos 20 minutos, o reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD, 100µL) foi adicionado e as placas foram incubadas na ausência de luz a temperatura ambiente por 20 min. A reação enzimática foi interrompida com 50µL de H2SO4 (1M) e a densidade óptica medida a 450 nm no ELISA. As concentrações de citocinas contidas nas amostras foram calculadas a partir de uma curva obtida por uma diluição seriada. Os resultados foram expressos em picograma de citocinas/mL de sobrenadante.

4.13 Histopatologia – Método H&E

Após o sacrifício dos animais, as membranas sinoviais foram retiradas cirurgicamente, fixadas em formol a 10% e inclusas em parafina. Lâminas foram confeccionadas e coradas por hematoxilina-eosina e avaliadas ao microscópio óptico. A análise histopatológica foi avaliada por uma professora do Departamento de Histologia da Universidade Federal do Ceará baseada em um grau de escores que variou de 0 a 3 (0 – ausente; 1 - suave; 2 - moderado; 3 - severo), sem o conhecimento dos grupos experimentais, considerando: influxo celular, hiperplasia sinovial, estágio e fibrose (ROCHA *et al.*, 2008).

4.14 Avaliação do efeito antinociceptivo de HdLP

A análise comportamental do efeito nociceptivo acarretado pelo Zymosan foi realizada pelo método de determinação da hipernocicepção articular, utilizando-se o teste de *Von Frey* eletrônico, como descrito por Pinto *et al.*, (2010). Para a realização do teste, os animais foram colocados em gaiolas plásticas, com fundo de arame, para permitir acesso às patas. Os animais foram colocados nestas gaiolas 30 minutos antes do início dos testes, para adaptação comportamental. Neste experimento, uma medida de pressão eletrônica foi mensurada através de um transdutor de pressão adaptado por um cabo a um contador digital de força (em gramas) (Insight Equipamentos Ltda., Ribeirão Preto, Brasil). O contato do transdutor de pressão à pata foi realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com área de 4.15 mm² que permite avaliar a hipernocicepção articular. Uma força perpendicular crescente foi aplicada na área central da superfície plantar do membro posterior direito dos animais, para indução da região fêmur-tibial, seguida da retirada da pata. O aparelho de medida de pressão eletrônica registra automaticamente a intensidade da força aplicada quando o membro é retirado. O teste foi repetido até a obtenção de três medidas subsequentes. Os animais foram submetidos à análise da sensibilidade dolorosa nos tempos 1, 3 e 6 horas após a administração intra-articular de zymosan.

4.15 Análises Estatísticas

Os dados experimentais foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguido do teste corretivo de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

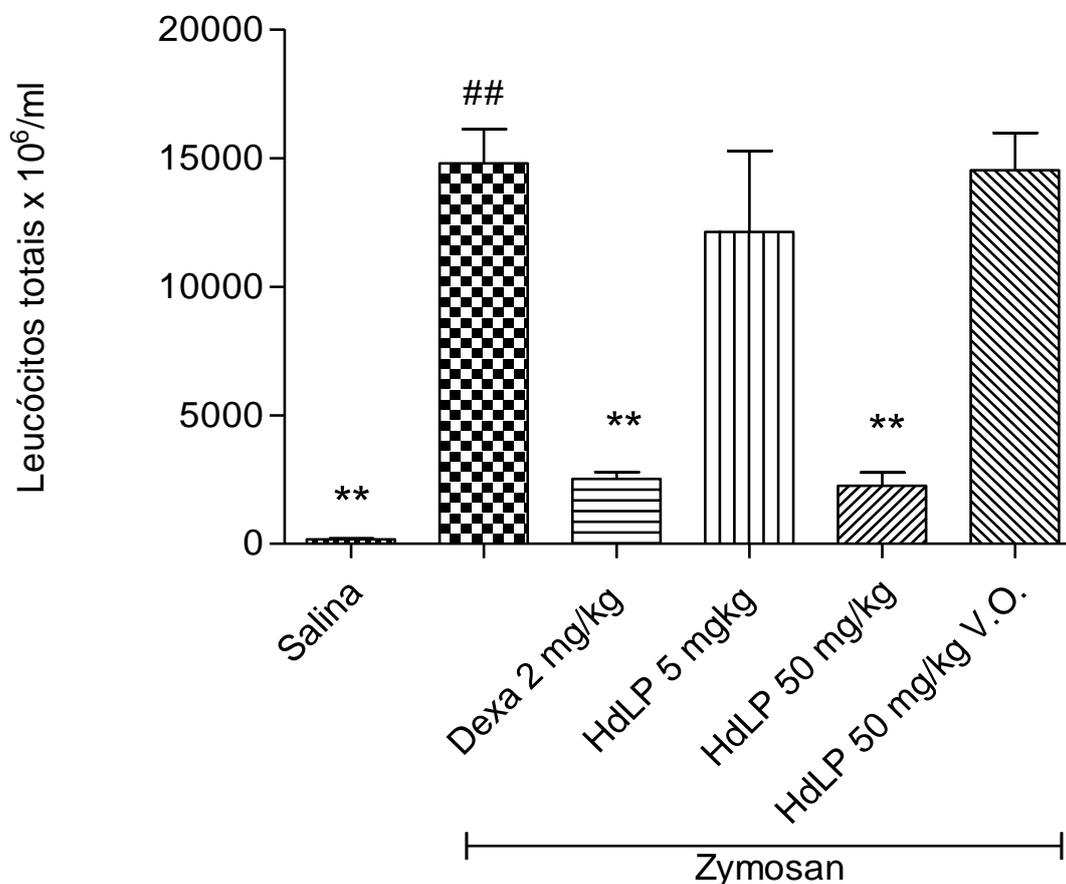
Os resultados das análises histopatológicas foram expressos em medianas e comparados utilizando o teste de Kruskal-Wallis, seguido de Dunn's. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1 HdLP reduz o influxo celular na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

Os animais do grupo controle que receberam apenas o zymosan (Zy), apresentaram um aumento no influxo celular na sexta hora após administração do Zy ($14794 \times 10^6/\text{ml} \pm 1330$). Foi possível verificar uma diminuição desse influxo celular no grupo que recebeu o tratamento com HdLP 50 mg/kg (i.v.) ($2260 \times 10^6/\text{ml} \pm 514,8$) uma hora após a administração do Zy. Também foi observada uma diminuição no influxo celular no grupo tratado com Dexametasona 2 mg/kg (s.c.) ($2260 \times 10^6/\text{ml} \pm 274,6$) tratado uma hora antes do Zy. Os grupos HdLP 5 mg/kg (i.v.) ($12130 \times 10^6/\text{ml} \pm 3143$) e HdLP 50 mg/kg (v.o) ($14530 \times 10^6/\text{ml} \pm 1443$) não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo Zy. (FIGURA 2).

Figura 2 – HdLP reduz o influxo celular na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

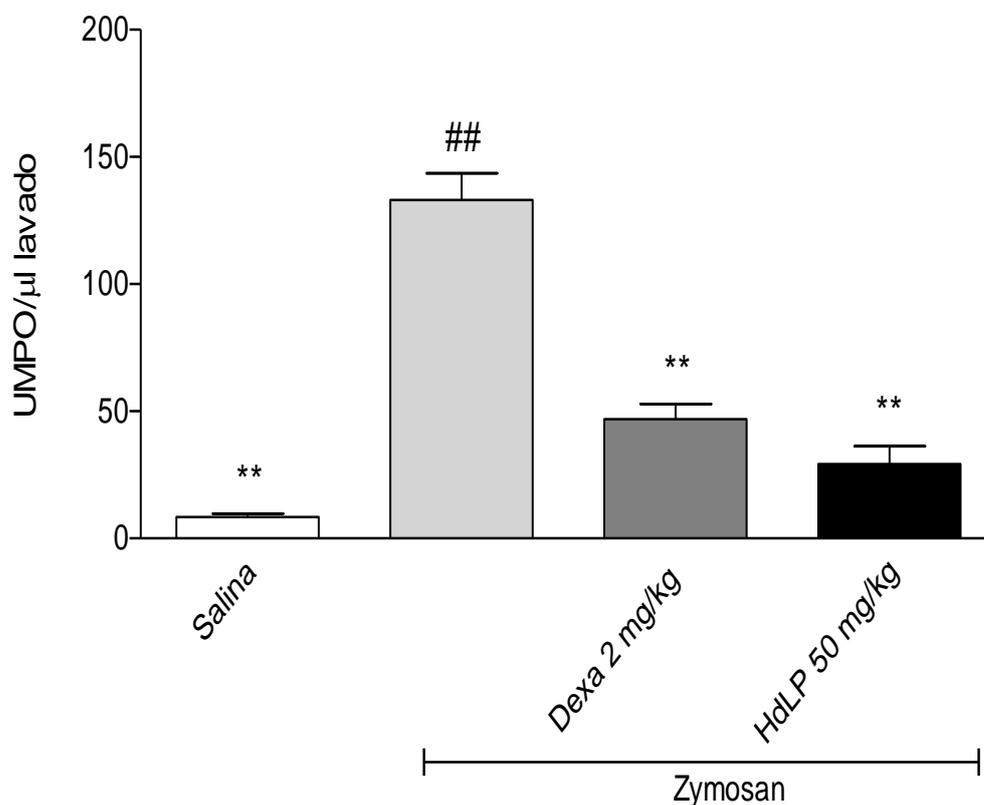


O influxo celular foi avaliado através da contagem total de leucócitos no lavado articular em animais tratados com HdLP 5 e 50 mg/kg (i.v.), HdLP 5mg/kg (v.o.), Dexametasona 2 mg/kg ou Salina na sexta hora após a administração do Zy. Grupo salina recebeu apenas salina (i.a.). Os resultados representam a média \pm e.p.m. dos leucócitos totais em $\times 10^6$ /ml de lavado articular (n=6 animais por grupo).). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Zy ** $p < 0,0001$ em relação ao grupo Zy # $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina ## $p < 0,0001$ em relação ao grupo Salina (ANOVA, seguido do teste de Bonferroni).

5.1.2 HdLP reduz a atividade da mieloperoxidase (MPO) na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

Foi avaliada a atividade da mieloperoxidase (MPO), enzima presente nos neutrófilos utilizada para determinar a presença dos neutrófilos no lavado articular. No grupo zymosan foi observado um aumento da atividade da MPO (133 UMPO/ml \pm 10,5). Observou-se que o tratamento com HdLP 50 mg/kg i.v. diminuiu a atividade da mieloperoxidase (MPO) no lavado articular (29,2 UMPO/ml \pm 6,9) quando comparado ao grupo que recebeu apenas Zy. Essa diminuição também foi observada no grupo tratado com Dexametasona (46,91 UMPO/ml \pm 5,9) (FIGURA 3).

Figura 3 – HdLP reduz a atividade da mieloperoxidase (MPO) na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos



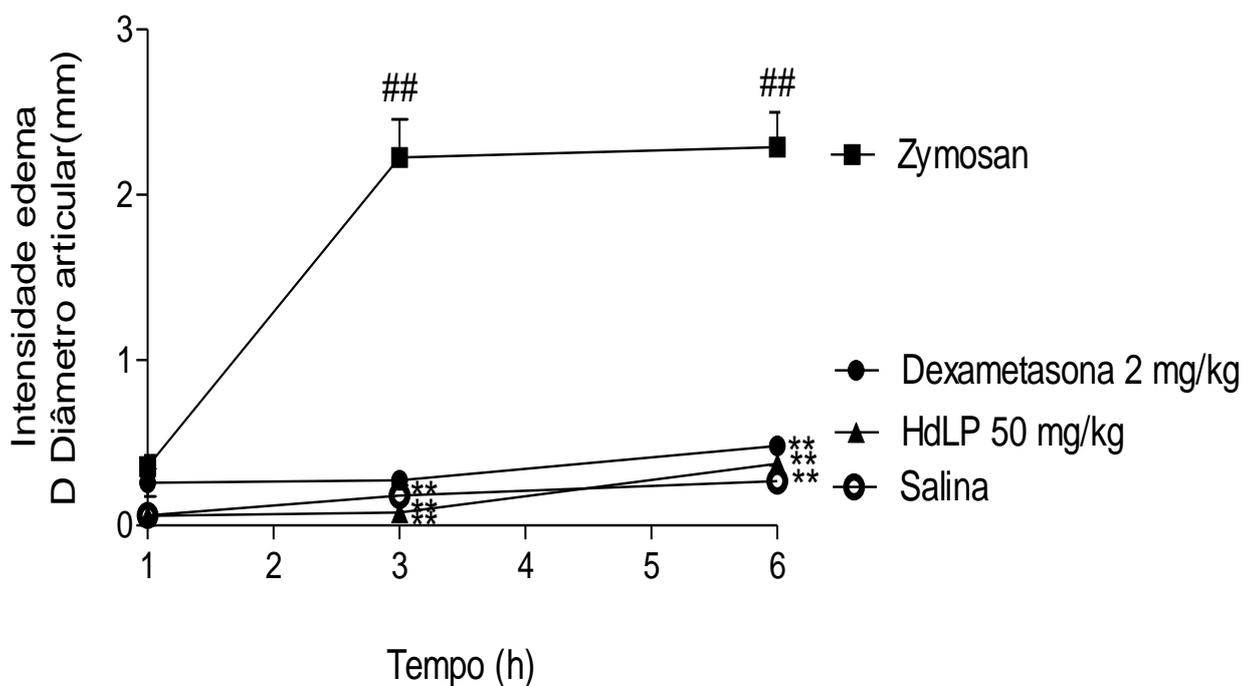
Foi avaliada a atividade da MPO para determinação de neutrófilos no lavado articular de camundongos tratados com HdLP 50 mg/kg, Dexametasona 2 mg/kg ou salina na artrite em camundongos induzida por Zy. Os resultados representam a média ± e.p.m. de UMPO/μL de lavado articular (n=6 animais por grupo). *p<0,05 em relação ao grupo Zy **p<0,0001 em relação ao grupo Zy #p<0,05 em relação ao grupo Salina ##p<0,0001 em relação ao grupo Salina (ANOVA, seguido do teste de Bonferroni).

5.2 HdLP reduz o edema na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

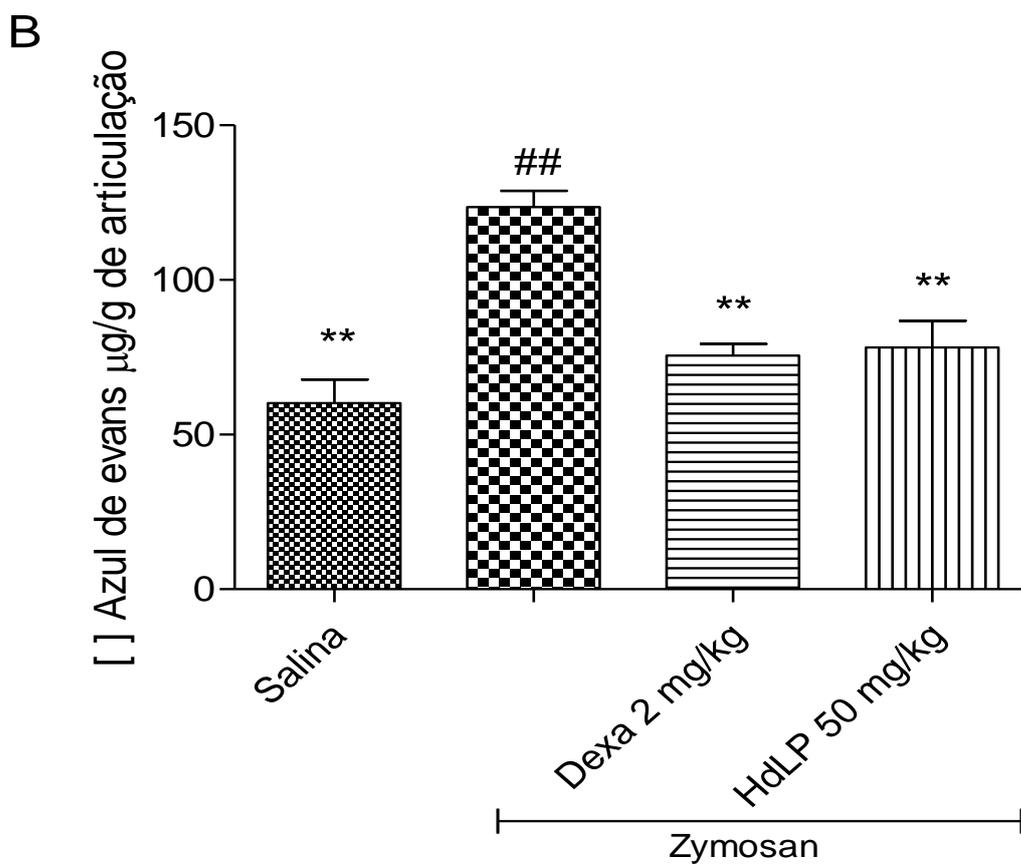
O edema foi avaliado através da medição da articulação e pelo método de extravasamento de Azul de Evans. No modelo da medição da articulação o grupo Zy apresentou um aumento nas medições do edema na terceira ($2,2 \text{ mm} \pm 0,2$) e na sexta hora ($2,28 \text{ mm} \pm 0,02$). O grupo tratado com HdLP 50 mg/kg apresentou uma redução na medição do edema na terceira ($0,07 \text{ mm} \pm 0,05$) e na sexta hora ($0,3 \text{ mm} \pm 0,07$) quando comparado ao grupo que recebeu apenas Zy. Foi observado que o grupo tratado com Dexametasona também apresentou uma redução na medição do edema na terceira ($0,27 \text{ mm} \pm 0,02$) e na sexta hora ($0,48 \text{ mm} \pm 0,05$) quando comparado ao grupo Zy (FIGURA 4A). Também foi avaliado o efeito de HdLP sobre a permeabilidade vascular no modelo de Extravasamento de Azul de Evans. Todos os grupos receberam Azul de Evans na dose de 25mg/kg uma hora antes do sacrifício. No grupo Zy foi observado um aumento na permeabilidade vascular ($123,6 \mu\text{g/g} \pm 5,2$) quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina. No grupo tratado com HdLP ocorreu uma diminuição na permeabilidade vascular ($78,19 \mu\text{g/g} \pm 8,6$) quando comparado aos animais que receberam apenas Zy. Da mesma forma o grupo tratado com Dexametasona também apresentou uma diminuição da permeabilidade vascular ($75,5 \mu\text{g/g} \pm 3,7$) quando comparado ao grupo Zy (FIGURA 4B).

Figura 4 – HdLP reduz o edema na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

A



Foi avaliado o edema na articulação dos camundongos no modelo de artrite induzida por Zy em animais tratados com HdLP 50 mg/kg i.v., Dexametasona 2 mg/kg ou Salina antes e após administração do Zy nos tempos 1, 3 e 6 horas. Os resultados representam a média \pm e.p.m. do diâmetro da articulação em mm (n=6 animais por grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Zy ** $p < 0,0001$ em relação ao grupo Zy # $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina ## $p < 0,0001$ em relação ao grupo Salina (ANOVA, seguido do teste de Bonferroni).

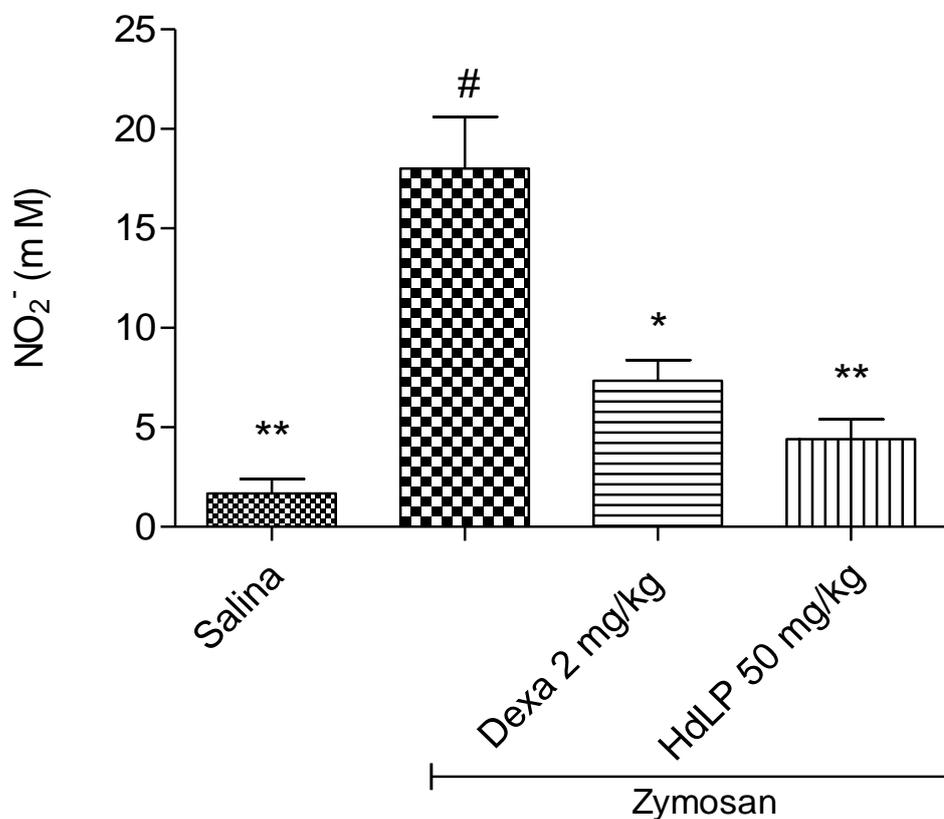


Foi avaliado o edema na articulação dos camundongos no modelo de artrite induzida por Zy em animais tratados com HdLP 50 mg/kg i.v., Dexametasona 2 mg/kg ou Salina 6 horas após a administração do Zy. Os resultados representam a média \pm e.p.m. da concentração de Azul de Evans em $\mu\text{g/g}$ de articulação ($n=6$ animais por grupo). * $p<0,05$ em relação ao grupo Zy ** $p<0,0001$ em relação ao grupo Zy ## $p<0,05$ em relação ao grupo Salina ### $p<0,0001$ em relação ao grupo Salina (ANOVA, seguido do teste de Bonferroni).

5.3 HdLP reduz o nível de óxido nítrico na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

Foi verificada a participação do óxido nítrico (NO) no processo inflamatório induzido por Zy na articulação de camundongos. Essa participação foi avaliada indiretamente pela determinação do nitrito/nitrato no lavado articular dos camundongos. No grupo Zy foi observado um aumento nos níveis de nitrito/nitrato ($18 \text{ mM} \pm 2,5$). O grupo tratado com HdLP 50 mg/kg apresentou uma diminuição no nível de nitrito/nitrato ($4,4 \text{ mM} \pm 1,0$) quando comparado ao grupo Zy. Da mesma forma ocorreu essa diminuição nos animais tratados com Dexametasona 2 mg/kg ($7,3 \text{ mM} \pm 1,0$) que apresentaram uma diminuição desses níveis quando comparado ao grupo Zy (FIGURA 5).

Figura 5 – HdLP reduz o nível de nitrito na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

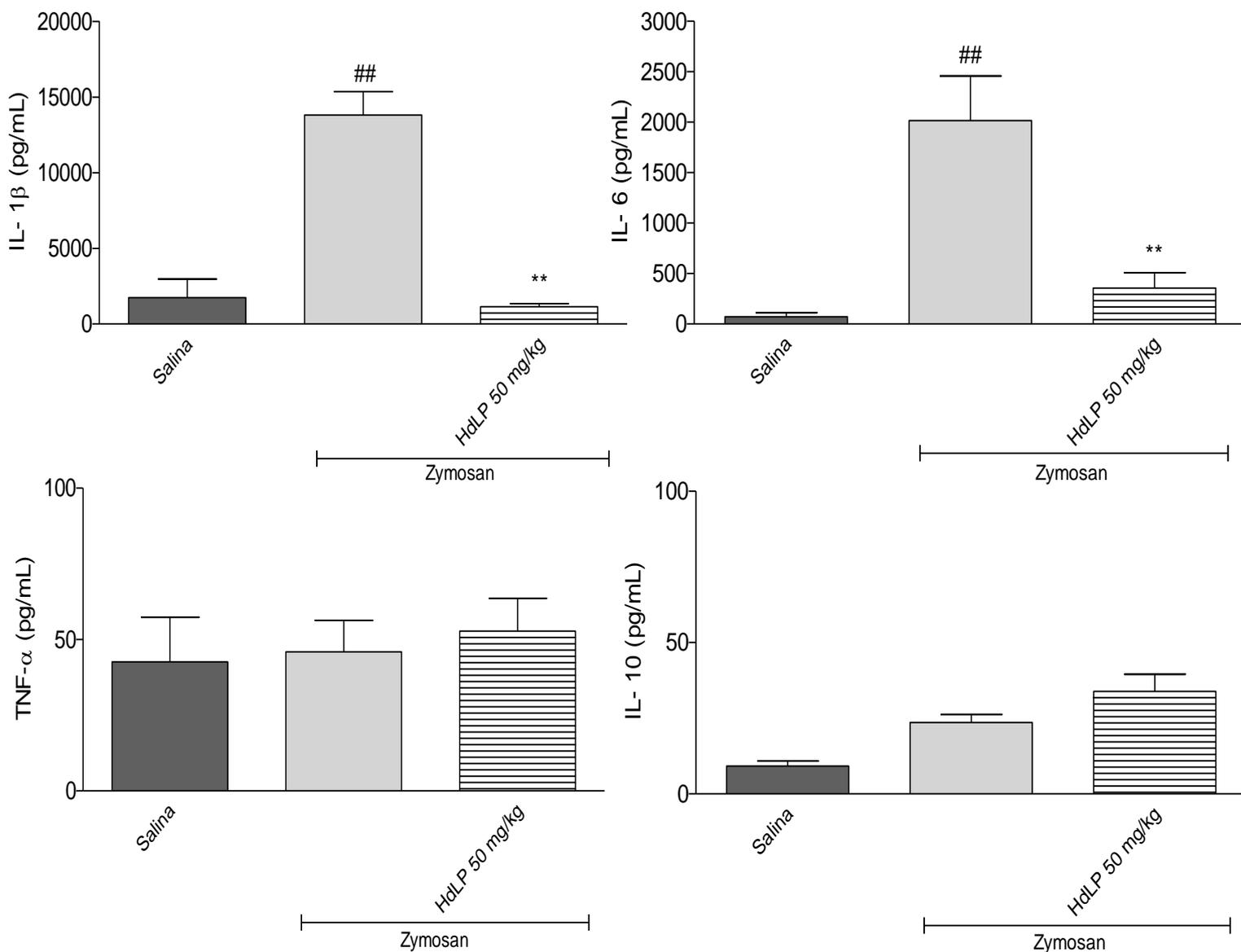


Foram avaliados os níveis de nitrito para determinação indireta do óxido nítrico em camundongos tratados com HdLP 50 mg/kg i.v., Dexametasona 2 mg/kg ou Salina. Os resultados representam a média \pm e.p.m. de nitrato/nitrito em mM no lavado articular (n=6 animais por grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Zy ** $p < 0,0001$ em relação ao grupo Zy # $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina ## $p < 0,0001$ em relação ao grupo Salina (ANOVA, seguido do teste de Bonferroni).

5.4 HdLP modula a liberação de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

Foi avaliado o efeito de HdLP na liberação das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 na sexta hora após a indução da artrite. Os resultados mostraram que o grupo Zymosan apresentou um aumento nos níveis de IL-1 β (13803 pg/mL \pm 1561) e IL-6 (2017 pg/mL \pm 441) na sexta hora após a indução da artrite, nesse grupo os níveis de IL-10 e TNF- α não foram diferentes significativamente do grupo salina. O grupo tratado com HdLP apresentou uma diminuição das citocinas inflamatórias IL-1 β (1146 pg/mL \pm 201) e IL-6 (357 pg/mL \pm 150), em relação a IL-10 e ao TNF- α não foi observado diferença significativa quando comparado ao grupo Zy.

Figura 6 - HdLP modula a liberação de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos



A liberação de citocinas foi avaliada no lavado articular em animais tratados com HdLP 50 mg/kg (i.v.) ou Salina na sexta hora após a administração do Zy. Grupo salina recebeu apenas salina (i.a.). Os resultados representam a média \pm e.p.m. citocinas em pg/mL lavado articular (n=6 animais por grupo). *p<0,05 em relação ao grupo Zy **p<0,0001 em relação ao grupo Zy #p<0,05 em relação ao grupo Salina ##p<0,0001 em relação ao grupo Salina (ANOVA, seguido do teste de Bonferroni).

5.5 HdLP reduz o processo inflamatório da membrana sinovial na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

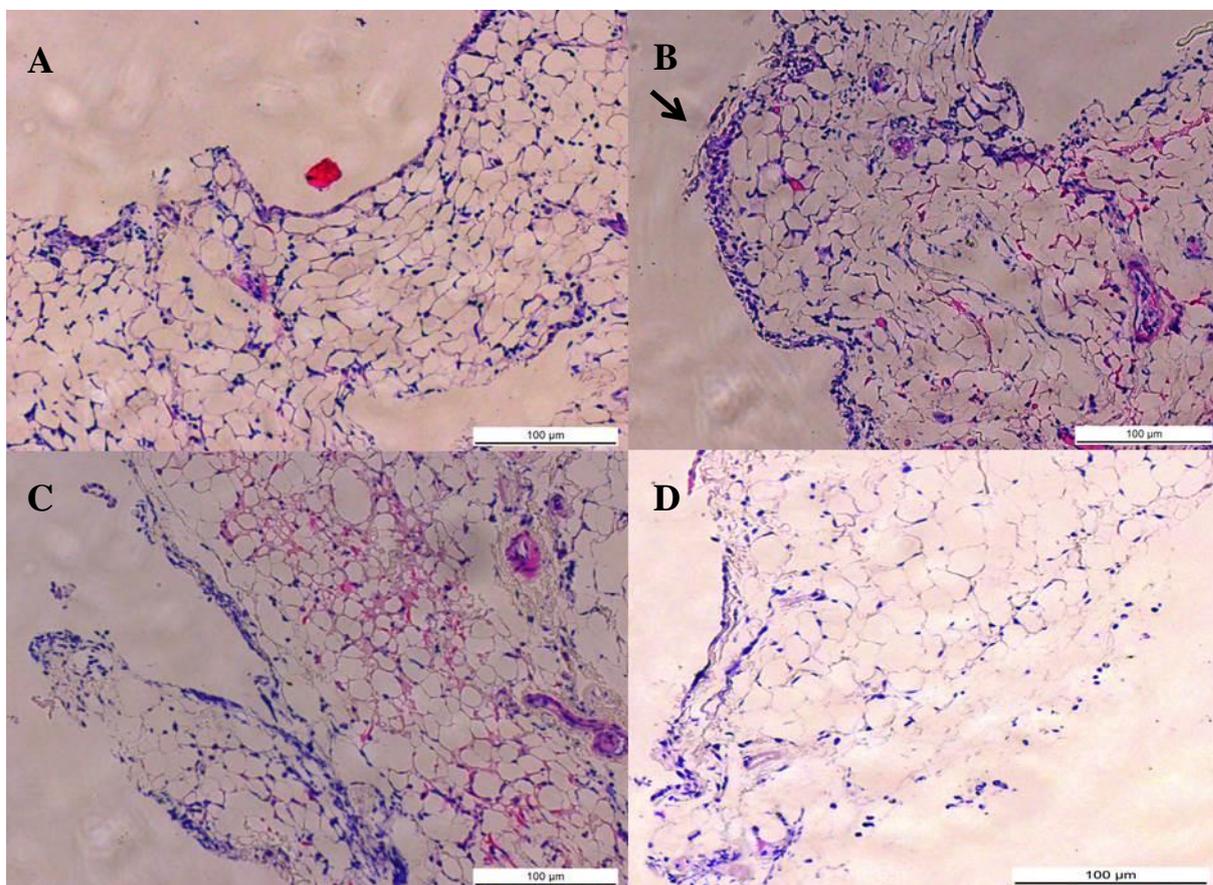
Os animais do grupo controle que receberam apenas o zymosan (Zy), apresentaram um aumento intenso processo inflamatório apresentando mediana e variações de 2 (2-3) no influxo celular, 2 (1-3) na proliferação sinovial e 2,5 (2-3) no comprometimento da membrana sinovial. Foi possível verificar uma diminuição do processo inflamatório no grupo que recebeu o tratamento com HdLP 50 mg/kg (i.v.) apresentando mediana e variações de 0 (0-1) no influxo celular, 1 (0-1) na proliferação sinovial e 1 (0-1) no comprometimento da membrana sinovial na sexta hora após a administração do Zy. Também foi observada uma diminuição desses parâmetros no grupo tratado com Dexametasona 2 mg/kg (s.c.) apresentando mediana e variações de 1 (1-1) no influxo celular, 1 (0-1) na proliferação sinovial e 1 (1-1) no comprometimento da membrana sinovial na sexta hora após a administração do Zy. (FIGURAS 7, 8 e 9).

FIGURA 7 - HdLP reduz o processo inflamatório da membrana sinovial na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

Infiltrado celular	Salina	Dexa	Zy	HdLP50mg/kg
	0	1	2	0
	1	1	2	1
	2	1	2	0
	1	1	3	1
	1	1	3	1
Proliferação da membrana sinovial	Salina	Dexa	Zy	HdLP50mg/kg
	0	1	1	1
	0	0	2	1
	0	0	3	1
	0	0	2	0
	0	0	3	0
Estágio	Salina	Dexa	Zy	HdLP50mg/kg
	0	1	2	1
	1	1	2	1
	1	1	3	0
	1	1	3	1
	1	1	3	1

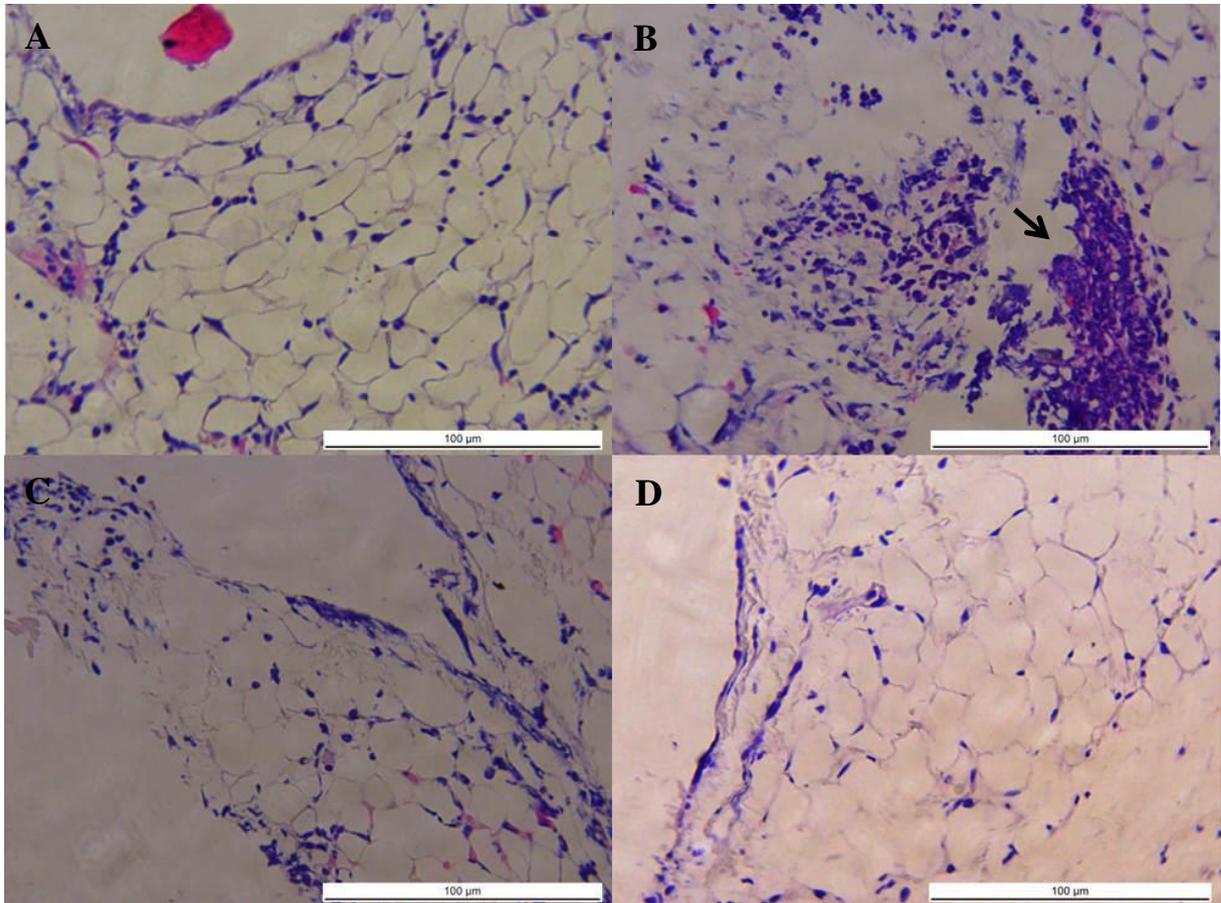
O padrão histológico da membrana sinovial foi avaliado através da análise histológica na membrana sinovial em animais tratados com HdLP 50 mg/kg (i.v.), Dexametasona 2 mg/kg ou Salina na sexta hora após a administração do Zy. Grupo salina recebeu apenas salina (i.a.). Os resultados foram expressos através de escores utilizando um grau de escala com variação de 0 a 3. (n=5 animais por grupo).

Figura 8 - Representação histológica da proliferação sinovial e comprometimento da membrana sinovial



Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas pelo método Hematoxilina-Eosina representando a proliferação sinovial e o comprometimento da membrana sinovial em animais tratados com HdLP 50 mg/kg, Dexametasona 2 mg/g ou Salina. Aumento de 200 vezes. A (Salina); B (Zymosan); C (Dexametasona); D (Zymosan).

Figura 9 - Representação histológica do infiltrado celular na membrana sinovial

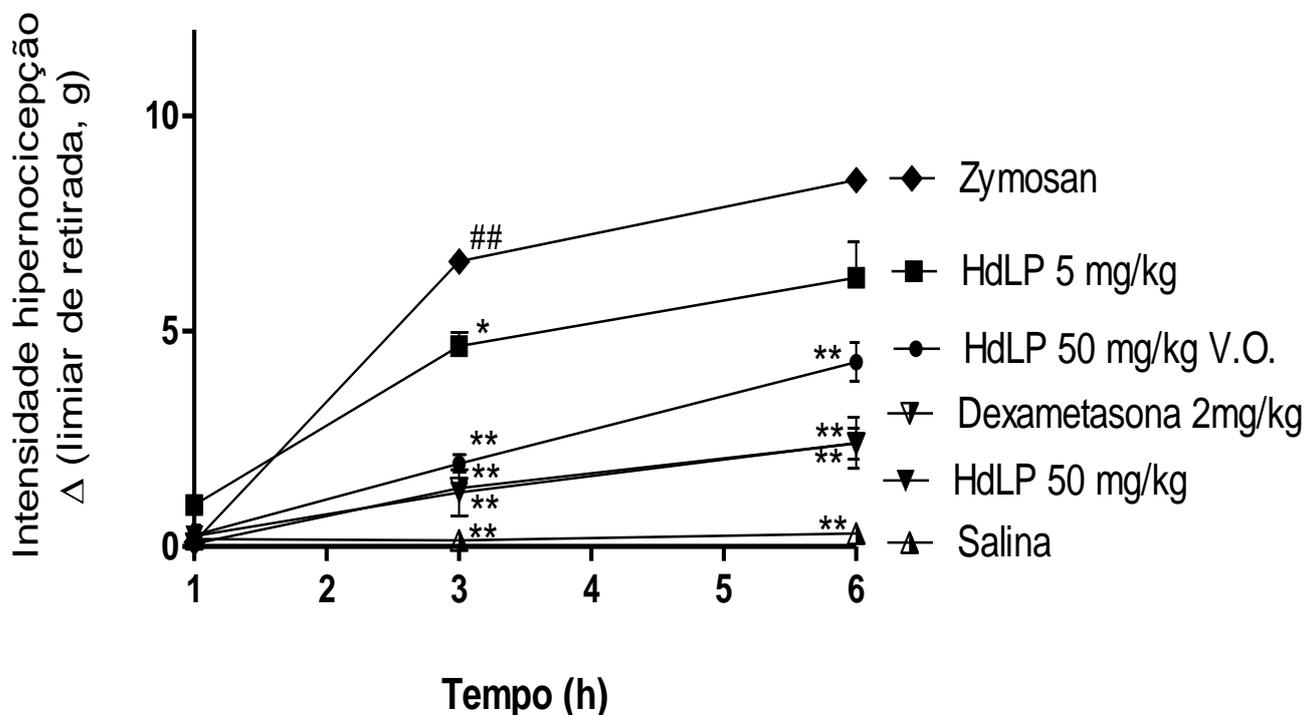


Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas pelo método Hematoxilina-Eosina representando o infiltrado celular na membrana sinovial em animais tratados com HdLP 50 mg/kg, Dexametasona 2 mg/g ou Salina. Aumento de 400 vezes. A (Salina); B (Zymosan); C (Dexametasona); D (Zymosan).

5.6 HdLP reduz a hipernocicepção na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

Nos animais que receberam apenas o Zy foi observado um aumento na hipernocicepção mecânica na terceira ($5,4 \pm 0,3$) e na sexta hora ($8,3 \pm 0,4$) quando comparado ao grupo salina. Os grupos que receberam HdLP apresentaram uma diminuição na hipernocicepção mecânica induzida pelo Zy. O grupo HdLP 5 mg/kg i.v apresentou uma redução na terceira hora ($4,6 \pm 0,7$), mas na sexta hora esse resultado não foi significativo, o grupo HdLP 50 mg/kg i.v apresentou uma redução na terceira ($1,2 \pm 0,5$) e na sexta hora ($2 \pm 0,5$) e o grupo HdLP 50 mg/kg v.o. também apresentou uma redução na terceira ($1,9 \pm 0,2$) e na sexta hora ($4,6 \pm 0,2$) respectivamente quando comparados ao grupo Zy. Foi observado comportamento semelhante no grupo tratado com Dexametasona na dose de 2 mg/kg, o qual apresentou uma redução tanto na terceira ($1,4 \pm 0,3$) como na sexta hora ($3,7 \pm 0,4$) na hipernocicepção mecânica quando comparado aos animais do grupo Zy (FIGURA 10).

Figura 10 – HdLP reduz a hipernocicepção na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos



A intensidade da hipernocicepção foi avaliada em animais tratados com HdLP 5 mg/kg e 50 mg/kg i.v., HdLP 50 mg/kg v.o., Dexametasona 2 mg/kg ou Salina antes da injeção do Zy e após nos tempos 1, 3, e 6 horas. O grupo salina recebeu apenas salina intra-articular. Os resultados representam a média \pm e.p.m. do limiar de retirada da pata. (n=6 animais por grupo). *p<0,05 em relação ao grupo Zy **p<0,0001 em relação ao grupo Zy #p<0,05 em relação ao grupo Salina ##p<0,0001 em relação ao grupo Salina (ANOVA, seguido do teste de Bonferroni).

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que HdLP demonstrou efeito anti-inflamatório diminuindo o influxo de neutrófilos, o edema e os mediadores inflamatórios NO, IL-1 β e IL-6 na articulação. HdLP também demonstrou uma diminuição no influxo celular na membrana sinovial, na proliferação sinovial e no seu comprometimento. Além disso, HdLP demonstrou efeito antinociceptivo reduzindo a hipernocicepção mecânica causada pelo Zy

Modelos em animais de artrite são utilizados em pesquisas para elucidação da patogênese da doença e para o teste de futuros agentes antiartríticos. A maioria dos agentes atualmente em uso no tratamento da artrite tem efeitos colaterais e toxicidade considerável que impedem o seu uso a longo prazo. Portanto, o uso de modelos animais tem contribuído para o conhecimento dos processos e mediadores importantes na geração da inflamação, na destruição da cartilagem e na reabsorção do osso, levando a avanços importantes na intervenção terapêutica desta doença destrutiva. O modelo de indução da artrite com o zymosan é relativamente fácil de executar, tem boa reprodutibilidade dos dados e permite a obtenção de resultados em um curto período (PATCH, 2001).

As proteínas podem ser consideradas fármacos ideais porque intervêm, essencialmente, em todos os processos biológicos e reações, caracterizando-se por elevada eficiência e potência, ou seja, atuam especificamente e em baixas concentrações. Os desenvolvimentos mais recentes na biotecnologia tornaram possível a produção em larga escala de grande variedade de proteínas. Encontram-se, atualmente, comercializadas ou em

ensaios clínicos centenas de proteínas com ação terapêutica, incluindo anticorpos monoclonais, enzimas, agentes antimicrobianos, inibidores enzimáticos, vacinas, agentes imunomoduladores, fatores de crescimento, citocinas e hormônios (SILVA *et al.*, 2002; FU, KLIBANOV, LANGER, 2000).

O estudo com a espécie vegetal *Himatanthus drasticus* tem se mostrado promissor pelos inúmeros efeitos farmacológicos que vem apresentando, onde estudos relatam suas atividades anti-inflamatória e antinociceptiva, importantes efeitos para o tratamento de doenças inflamatórias como a artrite.

As doses e a via de administração de HdLP foram determinadas baseando-se em trabalhos do nosso laboratório com uma espécie vegetal da mesma família Apocynaceae a *Calotropis procera*. Luz (2012) demonstrou que a fração protéica de *Calotropis procera* nas doses de 5 e 50 mg/kg i.v. apresentou efeito anti-inflamatório e antinociceptivo em camundongos. Nesse estudo a fração proteica foi administrada pela via intravenosa, no entanto esta via não é preferível para utilização na clínica, pois acarreta diversos inconvenientes como a necessidade de repetidas injeções devido ao reduzido tempo de meia-vida de proteínas, a via oral é mais aceita pela maior comodidade dos pacientes (FU, KLIBANOV, LANGER, 2000). Por este motivo também fizemos um grupo que recebeu HdLP 50 mg/kg pela via oral, a fim de verificar se HdLP poderia demonstrar efeito anti-inflamatório e antinociceptivo por essa via. Para o controle positivo foi utilizado um grupo tratado com Dexametasona na dose de 2 mg/kg, esse medicamento foi escolhido por ser da classe dos glicocorticoides que são utilizados no tratamento dessa doença por terem efeitos anti-inflamatórios, prevenindo a destruição da cartilagem e diminuindo os primeiros sinais de

inflamação no modelo de artrite induzida por zymosan (GEGOUT *et al.*, 1995). A dose de 2 mg/kg foi determinada baseando-se na literatura (LUZ, 2012).

Foi observado que o grupo que recebeu apenas o Zy intra-articular apresentou um aumento no influxo celular na sexta hora, enquanto os grupos tratados com HdLP 50 mg/kg i.v. e Dexametasona apresentaram uma diminuição desse influxo na sexta hora quando comparados ao grupo Zy. Os grupos HdLP 5 mg/kg i.v. e 50 mg/kg v.o. não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo Zy.

A partir desse resultado a dose escolhida de HdLP foi 50 mg/kg i.v. para as análises posteriores. Foi feita a determinação da atividade de MPO, com intuito de elucidar se as células que migraram para a articulação seriam neutrófilos. MPO é uma enzima presente nos neutrófilos que serve como indicador inflamatório, podendo ser relacionada com a migração de neutrófilos para o local da inflamação (BUSS, 2012). A partir dos resultados obtidos foi observado que o grupo HdLP 50 mg/kg i.v. apresentou uma diminuição da atividade de MPO indicando uma inibição do influxo de neutrófilos, da mesma forma ocorreu essa inibição no grupo tratado com Dexametasona quando comparados ao grupo Zy que mostrou uma alta atividade da MPO.

A administração intra-articular do zymosan é caracterizada pela presença de edema e pela infiltração de células inflamatórias, inicia-se com o influxo de neutrófilos, seguindo-se as células mononucleares e a hiperplasia sinovial. Os neutrófilos estão envolvidos na patogênese de lesões teciduais na artrite, são predominantes no exsudato sinovial e atuam como fonte de substâncias, tais como citocinas, espécies reativas de oxigênio e espécies de nitrogênio, enzimas lisossomais e metaloproteases, que atuam na degradação da

cartilagem e na reabsorção óssea em episódios agudos de artrite (GUERRERO *et al.*, 2008).

Neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o sítio inflamatório e por isso são importantes na regulação de outras células do sistema imunológico. Os neutrófilos possuem o maior potencial citotóxico devido à sua capacidade de liberação de enzimas degradativas e espécies reativas de oxigênio. Os neutrófilos também contribuem na regulação de citocinas e quimiocinas cascatas que acompanham a inflamação (WRIGHT, MOOTS, EDWARDS, 2014).

Cavalcante (2007) demonstrou que uma fração não dialisável do látex de *Calotropis procera* (APOCYNACEAE) foi capaz de diminuir a migração de neutrófilos na sexta hora após a indução da artrite com zymosan.

Ramos *et al.*, (2009) demonstraram que administração intravascular de frações proteicas de *Calotropis procera* no modelo de peritonite induzida por carragenina foram capazes de reduzir significativamente o influxo de neutrófilos no local da inflamação, através da inibição do rolamento e aderência de neutrófilos. Acredita-se que esse efeito ocorreu por inibição competitiva das frações com as selectinas.

Concordando com a literatura o grupo Zy apresentou um aumento no influxo leucocitário na sexta hora mimetizando a fase aguda da artrite, o que não foi observado no grupo tratado com HdLP. Esse resultado também foi confirmado na análise histopatológica demonstrando que no grupo tratado com HdLP foi observado um menor influxo de células na membrana sinovial. Sugerimos que HdLP possa estar interferindo na interação leucócito/células endoteliais, etapa

inicial para o recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório, resultando na inibição desse influxo.

O desenvolvimento do processo inflamatório na membrana sinovial ocorre devido à resposta das células inflamatórias que aumentam a produção de citocinas e a formação de radicais livres conduzindo ao stress oxidativo que amplifica a inflamação e ocasiona a destruição articular, dor e edema (PAIVA *et al.*, 2011). O tecido envolvido responde ao estímulo e alguns eventos vasculares ocorrem iniciando-se com uma vasoconstrição seguida de vasodilatação, também ocorre aumento da permeabilidade vascular ocasionando extravasamento de fluido e proteínas para o interstício levando a formação do edema (MORAIS, 2008). Estudos de CONTE *et al.* (2010) e (2008) demonstraram que as endotelinas endógenas também são mediadores inflamatórios que desempenham um papel pro-inflamatório importante na regulação da inflamação articular e estão relacionadas com a formação do edema, modulam a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e nas células sinoviais, induzem a formação do edema pela exsudação de plasma, estimulam a produção de citocinas, regulam a migração e adesão dos neutrófilos e a produção de mediadores inflamatórios.

A artrite induzida por Zy provoca aumento da permeabilidade vascular levando ao desenvolvimento de edema sinovial e influxo leucocitário com predomínio de polimorfonucleares (NONOSE, 2011).

Alencar *et al.*, (2004) demonstraram que uma fração proteica não dialisável do látex de *Calotropis procera* foi capaz de inibir o edema causado por carragenina, efeito não observado quando o edema foi induzido por dextran. Esses resultados mostram que essa fração não dialisável provavelmente deve

inibir o aumento da permeabilidade mediado por células, pois o edema por carragenina depende da migração celular para o foco inflamatório.

Neste trabalho observa-se que HdLP foi capaz de diminuir o edema provocado pelo Zy, o qual ocasiona um aumento na permeabilidade vascular. Este resultado indica que a diminuição do edema pode estar relacionada com a diminuição na permeabilidade vascular mediada por células, já que também foi observado um menor influxo leucócitario na articulação nos animais tratados com HdLP.

As citocinas regulam os processos inflamatórios que estão envolvidos na patogênese da inflamação articular. Nas articulações inflamadas ocorre um desequilíbrio entre as atividades de citocinas pró e anti-inflamatórias, onde as citocinas pró-inflamatórias encontram-se de forma majoritária, dentre elas destacam-se IL-1 β , TNF- α e IL-6 (AGARWAL e MAVIYA, 2005). As citocinas pró-inflamatórias são encontradas no fluido e no tecido sinovial tendo papel fundamental na perpetuação da inflamação, na destruição da cartilagem e no remodelamento característicos da artrite (BURSKA, BOISSINOT e PONCHEL, 2014). Estudos em modelos animais mostram que o TNF- α está envolvido com o inchaço das articulações presente no início da inflamação (BERG, 2000). IL-1 pode ser produzida por condrócitos e por osteoblastos, podendo ser associada aos eventos que iniciam o ciclo de destruição da cartilagem e óssea (JOOSTEN *et al.*, 1999). IL-1 também está envolvida na indução da ativação de metaloproteinases da matriz e angiogênese na membrana sinovial (AGARWAL e MAVIYA, 2005). Além disso, essa citocina está envolvida com ativação dos osteoclastos, aumento da expressão de moléculas

de adesão pelas células sinoviais e aumento da liberação de óxido nítrico e prostaglandina (MCLNESS e SCHETT, 2007; ABRAMSON e AMIN, 2002).

A IL-6 também é uma citocina pró-inflamatória potente relacionada com a destruição articular e manifestações sistêmicas (YUSOF e EMERY, 2013; PARK, PILLINGER, 2007). No líquido sinovial a IL-6 encontra-se abundantemente expressa sendo relacionada com a infiltração celular e com o fator de crescimento vascular endotelial, o qual promove a migração e crescimento de células endoteliais, além de induzir a permeabilidade vascular. Essa citocina também aumenta o recrutamento de osteoclastos que promovem a reabsorção gerando a erosão óssea (SRIRANGAN e CHOY, 2010).

Oliveira (2013) demonstrou que o óleo extraído dos frutos de *Caryocar coriaceum* apresenta efeito anti-inflamatório na artrite induzida por Zy em ratos, podendo ser associado com a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β).

Marinho *et al.*, (2011) demonstraram que o látex de *Hancornia speciosa* (APOCYNACEAE) diminui a produção das citocinas IL-6 e TNF- α em modelo inflamatório com carragenina, onde esse efeito anti-inflamatório parece estar relacionado com a inibição da síntese de prostaglandinas (PG).

Os resultados desse estudo mostraram que no grupo tratado com HdLP os níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-6 foram menores quando comparados ao grupo Zy, no entanto os níveis de TNF- α não foram alterados.

Rocha *et al.* (2008) demonstraram que o extrato do helminto *Ascaris suum* apresentou efeito anti-inflamatório na artrite induzida por Zy, no entanto esse extrato não alterou a liberação de TNF- α . Pinto *et al.* (2013) demonstraram que o extrato do fungo *Coccidioides posadasii* apresentou efeito anti-inflamatório

e imunomodulador na artrite induzida por zymosan e também não alterou a liberação de TNF- α . Os estudos ressaltam que essa citocina está envolvida no desenvolvimento da lesão articular, no entanto sugerem que o efeito anti-inflamatório desses extratos seria independente da liberação de TNF- α .

Os resultados demonstram que HdLP foi eficiente em reduzir a liberação das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-6, o que pode explicar a diminuição da migração de leucócitos e a redução do edema na articulação, levando a uma menor inflamação articular. Essa diminuição no processo inflamatório também foi observada na análise histopatológica, onde foi demonstrado uma menor proliferação sinovial no grupo tratado com HdLP e um menor comprometimento da membrana sinovial.

Nossos dados também mostram que HdLP não foi capaz de alterar os níveis de TNF- α . Sugerimos que o efeito anti-inflamatório demonstrado estaria envolvido com a inibição de outros mediadores inflamatórios como IL-1 β e IL-6. Para justificar nosso resultado podemos relacioná-lo com o fato de muitos pacientes não responderem a terapia com anticorpos anti-TNF- α ou receptores solúveis de TNF- α , demonstrando que a progressão da artrite não se deve unicamente a liberação de TNF- α , mas também dependeria da liberação de outros agentes inflamatórios (LEITE, 2009).

A citocina IL-10 é considerada anti-inflamatória desempenhando importante papel na prevenção de patologias inflamatórias e autoimunes. IL-10 é produzida por diversos tipos de células, principalmente por monócitos e células B (OPAL e DEPALO, 2000). A deficiência ou a expressão diminuída de IL-10 pode aumentar os agentes patogênicos durante uma infecção aguda, podendo

exacerbar a resposta inflamatória, que resulta em danos teciduais (SALIM e XAVIER, 2014).

VALE *et al.* (2002) demonstraram que a liberação endógena de algumas citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 apresenta papel na limitação do desenvolvimento da resposta nociceptiva durante as reações inflamatórias da dor. Sugerindo que esta atividade antinociceptiva está relacionada com a inibição da liberação de COX-2 e de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β . Além disso, também podem exercer efeito analgésico relacionado à regulação da liberação dos eicosanoides.

Tem sido demonstrado que a IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias. Essa resposta supressora foi demonstrada quando camundongos deficientes na produção de IL-10 desenvolveram a artrite induzida por colágeno mais grave (VERRI JUNIOR *et al.*, 2006).

Tanaka *et al.*, (1996) demonstraram que no modelo de artrite induzida por colágeno a administração intraperitoneal de IL-10 mostrou-se como um agente profilático de grande utilidade suprimindo a progressão e o desenvolvimento da artrite induzida por colágeno em camundongos, sugerindo que o aumento da IL-10 poderia exercer um mecanismo compensatório em relação a exacerbada produção de citocinas inflamatórias produzidas na artrite.

Entretanto o presente estudo demonstra que HdLP não foi capaz de aumentar significativamente os níveis de IL-10 quando comparado ao grupo Zy. Acredita-se que essa citocina anti-inflamatória não esteja envolvida de forma significativa no início da artrite induzida por Zy, o que justificaria os resultados obtidos nesse modelo agudo (ROCHA *et al.*, 2008). Nossos dados indicam que o efeito anti-inflamatório de HdLP não se deve ao aumento de IL-10.

Além da participação das citocinas também foi investigado a participação do óxido nítrico no desenvolvimento da inflamação induzida por Zy.

Existem evidências que revelam que o NO na artrite está envolvido na degradação da cartilagem e dentre as diversas ações biológicas estaria envolvido na ativação de metaloproteinases da matriz, inibição da síntese de colágeno e proteoglicano por condrócitos e como promotor da vasodilatação, o que leva ao influxo de fluido e células para o foco inflamatório. NO também pode se combinar com espécies reativas de oxigênio produzindo peroxinitrito, que promove a apoptose de condrócitos (BINGHAM, 2002). No entanto existem controvérsias sobre o papel do NO, enquanto estudos sugerem que o NO apresenta efeito pró-inflamatório estando envolvido em mecanismos de dor, ROCHA *et al.* (2003) indicaram que NO pode ter um efeito anti-inflamatório, sugerindo que os inibidores da NOS reduzem a hiperalgesia inflamatória e o influxo celular quando utilizados de forma profilática promovendo analgesia na artrite induzida por Zy via GMPc, independentemente de NO exógeno ou de PGE2 (ROCHA *et al.*, 2003). O estudo de BEZERRA *et al.* (2004) sugerem que o tratamento com inibidores da NOS apresentam efeito anti-inflamatório, protegendo o metabolismo da cartilagem na articulação inflamada contra a degradação, no entanto as espécies reativas de oxigênio geradas atuam promovendo o dano articular na artrite experimental. GIRÃO (2006) demonstra que o NO endógeno participa da modulação da dor e que a administração de NO exógeno pode ter efeito antinociceptivo em baixas doses e produzir hipernocicepção em altas doses. A partir desses estudos acredita-se que o efeito de NO depende do modelo experimental e do nível de estímulo, já que pode exercer tanto efeito pró como antinociceptivo (ARAÚJO, 2012).

Nossos dados demonstram que os animais tratados com HdLP apresentaram uma diminuição dos níveis de nitrato/nitrito, indicando uma diminuição na produção de NO que mostrou ser benéfica na redução da inflamação da articulação. Além disso, a diminuição da inflamação também levou a uma diminuição da migração de neutrófilos para a articulação corroborando na inibição no desenvolvimento da inflamação, já que os neutrófilos são células produtoras de NO.

A fim de verificar um possível efeito analgésico de HdLP foi feita a avaliação da hipernocicepção mecânica utilizando o método eletrônico Von Frey.

A hipernocicepção é descrita como um estado de hiperalgesia e/ou alodinia em modelos com animais devido à sensibilização de nociceptores. Em pacientes portadores de artrite sintomas como hiperalgesia e rigidez das articulações são muito frequentes, podendo causar limitação do movimento articular. A hipernocicepção é induzida pela ação direta dos mediadores finais nos nociceptores provocando a liberação de citocinas. Os neutrófilos apresentam ações hipernociceptivas que ocorrem pelos efeitos de citocinas e pela liberação de mediadores de ação direta como PGE2 e aminas simpáticas, que atuam diretamente nos nociceptores (CUNHA *et al.*, 2008a; CUNHA *et al.*, 2008b; BEZERRA *et al.*, 2007).

IL-1 β atua diretamente sobre receptores específicos dos neurônios sensitivos levando a síntese de outras citocinas, quimiocinas, prostanóides, neurotrofinas, óxido nítrico, cininas, lipídeos, trifosfato de adenosina (ATP) e membros da via do complemento, que ocasionam a proliferação e hipertrofia de células gliais no sistema nervoso central com a liberação de citocinas pro-inflamatórias (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Nesse estudo foi observado que o grupo tratado com HdLP 5 mg/kg i.v. não apresentou efeito antinociceptivo significativo quando comparado ao grupo Zy na sexta hora, resultado já esperado concordando com os dados do influxo de leucócitos que não foi diminuído nessa dose. Já o grupo tratado com 50 mg/kg v.o. foi observado efeito antinociceptivo, no entanto esse efeito foi menor quando comparado ao grupo HdLP 50 mg/kg i.v. que apresentou um aumento do limiar nociceptivo mais significativo. Sugerimos que esse menor efeito da fração proteica pela via oral possa ser explicado pelo fato das proteínas geralmente não serem ativas por via oral. A biodisponibilidade oral é reduzida, devido principalmente pela rápida e intensa degradação por enzimas proteolíticas e pela fraca permeabilidade intestinal ocasionada pela sua elevada massa molecular e hidrofiliçidade. As baixas biodisponibilidades conduzem a uma elevada variabilidade inter e intraindividual na sua administração (SILVA *et al.*, 2002).

Tem sido demonstrado que a administração intra-articular de zymosan induz a libertação de prostanóides na articulação do joelho de camudongos, esse agente flogístico induz a síntese das prostaglandinas pelos macrófagos. De acordo com essas informações Guerrero *et al.*, (2006) demonstraram que a administração de indometacina (inibidor da ciclooxigenase não seletivo) reduziu a hipernocicepção induzida por zymosan na inflamação articular, ressaltando que a prostaglandina E2 um dos principais metabólitos da COX.

Cunha *et al.*, (2005) demonstraram que a hipernocicepção inflamatória mecânica induzida por carragenina depende da libertação de citocinas como a IL1- β e IL-6, sendo que a IL-1 β estaria envolvida na libertação de prostaglandinas (PG).

Luz (2012) demonstrou que uma fração proteica isolada do látex de *Calotropis procera* apresentou efeito antinociceptivo na hiperalgesia inflamatória e que este efeito pode estar relacionado com a diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias e da PGE2 que podem sensibilizar os nociceptores levando a hiperalgesia.

HdLP demonstrou ser eficaz na redução do processo inflamatório, diminuindo a migração de leucócitos e a liberação de mediadores como IL1- β e IL-6. A redução de IL1- β poderia explicar o efeito antinociceptivo de HdLP, onde a redução dessa citocina poderia levar a redução da liberação das prostaglandinas que são mediadores finais e podem sensibilizar os nociceptores, portanto uma menor sensibilização desses nociceptores ocasionam um aumento no limiar de hipernocicepção justificando o efeito antinociceptivo de HdLP.

Baseando-se nos dados obtidos nesse trabalho podemos observar que HdLP apresenta efeito anti-inflamatório, ocasionando a diminuição da migração de leucócitos para a articulação e dos níveis de mediadores inflamatórios. HdLP também demonstrou efeito antinociceptivo e este parece estar relacionado a diminuição dos mediadores finais que sensibilizam os nociceptores.

7. CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo demonstram o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de uma fração proteica isolada do látex de *Himatanthus drasticus* no modelo de artrite induzida por zymosan em camundongos. Esses efeitos de HdLP parecem estar relacionados com a diminuição da migração de neutrófilos e redução dos mediadores inflamatórios (NO, IL-1 β e IL-6), diminuindo assim o dano na membrana sinovial. No entanto são necessários mais estudos para uma melhor elucidação do seu mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, S. B.; AMIN, A. Blocking the effects of IL-1 in rheumatoid arthritis protects bone and cartilage. **Rheumatology**, v. 41, p. 972–980, 2002.
- ABREU, M. M.; KOWALSKI, S. C.; CICONELLI, R. M.; FERRAZ, M. B. Avaliação do Perfil Sociodemográfico, Clínico-Laboratorial e Terapêutico dos Pacientes com Artrite Reumatóide que Participaram de Projetos de Pesquisa na Escola Paulista de Medicina, nos Últimos 25 anos. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 46, n. 2, p. 103-109, 2006.
- AGARWAL, V.; MALAVIYA, A. M. Cytokine network and its manipulation in reumathoid arthritis. **J. Indian. Rheumatol. Assoc.**, v. 13, p. 86-91, 2005.
- ALENCAR, N. M.N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; VALE, M. R.; BITENCURT, F. S.; OLIVEIRA, J. S.; RIBEIRO, R. A.; RAMOS, M. R. Anti-Inflammatory Effect of the Latex from Calotropis procera in Three Different Experimental Models: Peritonitis, Paw Edema and Hemorrhagic Cystitis. *Planta Med.*, v. 70, n. 12, p. 1144-1149, 2004.
- AMARO, M. S.; MEDEIROS FILHO, S.; GUIMARÃES, R. M.; TEOFILO, E. M. Morfologia de frutos, sementes e de plantulas de janaguba (*Himatanthus drasticus*) (MART.) PLUMEL. – APOCYNACEAE. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 1, p. 63-71, 2006.
- ARAÚJO, A. L. **Mecanismos e mediadores envolvidos no efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico**. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade de Salamanca, Salamanca, 2012.
- ARGENTA S. C.; ARGENTA L. C.; GIACOMELLI, S. R.; CEZAROTTO, V. S. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência medicinal. **Vivências**, v.7, n. 12, p. 51-60, 2011.
- AZEVEDO, V. F.; FAVRETTO, L. G.; SANTOS JUNIOR, M. A. Golimumabe: um novo agente anti-TNF. **Rev. Med. Res.**; v. 12, n. 3, p. 130-133, 2010.
- BALDAUF, C.; SANTOS, F. A. M. Ethnobotany, Traditional Knowledge, and Diachronic Changes in Non–Timber Forest Products Management: A Case Study of *Himatanthus drasticus* (Apocynaceae) in the Brazilian Savanna. **Economic Botany**, v. 67, n. 2, p. 110–120, 2013.
- BARROS, P. D. S.; AZEVEDO, V. F.; BONFIGLIOLI, R.; CAMPOS, W. R.; CARNEIRO, S. C. S.; CARVALHO, M. A. P.; GONÇALVES, C. R.; HILÁRIO, M, O. E.; KEISERMAN, M. W.; LEITE, N. H.; MALLMANN, K.; MEIRELLES, E. S.; VIEIRA, W. P.; XIMENES, A. C. Consenso Brasileiro de Espondiloartropatias: Espondilite Anquilosante e Artrite Psoriásica Diagnóstico e Tratamento – Primeira Revisão. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 47, n. 4, p. 233-242, 2007.

BARTON, N. J.; STEVENS, D.V.; HUGHES, J. P.; ROSSI, A. G.; CHESSELL, I. P.; REEVE, A. J.; MCQUEEN, D. S. Demonstration of a novel technique to quantitatively assess inflammatory mediators and cells in rat knee joints. **Journal of Inflammation**, v. 4, n. 13, p. 1-8, 2007.

BENDELE, A. M. Animal models of rheumatoid arthritis. **J. Musculoskel. Neuron. Interact**, v. 1, n. 4, p. 377-385, 2001.

BÉRTOLO, M.; BRENOL, C. V.; SCHAINBERG, C. G.; NEUBARTH, F.; LIMA, F. A. C.; LAURINDO, I. M.; SILVEIRA, I. G.; PEREIRA, I.A.; LOURES, M. A. C.; AZEVEDO, M. N.; FREITAS, M. V. C.; PEDREIRA NETO, M. S.; XAVIER, R. M.; GIORGI, R. D. N.; KOWALSKI, S. C.; ANTI, S. M. A. Atualização do Consenso Brasileiro no Diagnóstico e Tratamento da Artrite Reumatóide. **Rev Bras Reumatol**, v. 47, n.3, p. 151-159, 2007.

BEZERRA, M. M.; BRAIN, S. D.; GIRÃO, V. C. C.; GREENACRE, S.; KEEBLE, J.; ROCHA, F. A. C. Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, v. 374, p. 265–273, 2007.

BEZERRA, M. M.; BRAIN, S. D.; GREENACRE, S.; JERÔNIMO, S. M. B.; MELO, L. B.; KEEBLE, J.; ROCHA, F. A. C. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 172-182, 2004.

BINGHAM, C. O. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. **J. Rheumatol.**, v. 65, p. 3-9, 2002.

BITENCOURT, F. S. **Fração proteica isolada do látex de *Calotropis procera* atenua a progressão da mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos via modulação da resposta inflamatória.** Tese (Doutorado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal Do Ceará, Fortaleza, 2012.

BOLETIM BRASILEIRO DE AVALIAÇÃO DE TECNOLOGIAS EM SAÚDE. **Medicamentos Biológicos para o Tratamento da Artrite Reumatóide**, n. 19, 2012.

BRAND, D. D.; LATHAM, K. A.; ROSLONIEC, E.F. Collagen-induced arthritis. **Nature Protocols.**, v. 2, n. 5, p. 1269-1275, 2007.

BRENNAN, F. M.; MCINNES, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 11, p. 3537-3547, 2008.

BRITO, P. S. **Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica do composto *pellec1* isolado da *Combretum leprosum*.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2012.

BRANDÃO, L.; FERRAZ, M. B.; ZERBINI, C. A. F. Avaliação da qualidade de vida na artrite reumatóide: revisão atualizada. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 37, n. 5, 1997.

BURGER, D.; DAYER, J. M.; PALMER, G.; GABAY, C. Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis? **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 20, n. 5, p. 879-896, 2006.

BURSKA, A.; BOISSINOT, M.; PONCHEL, F. Cytokines as Biomarkers in Rheumatoid Arthritis. *Mediators of Inflammation*, v. 2014, p. 1-24, 2014.

CARDOSO, M. G. M. **Efeito pontencializador do antineoplásico paclitaxel (taxol) na hiperalgesia inflamatória experimental induzida por zymosan.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

CARDOSO, M. L. **Efeitos de frações obtidas da fucoídiana de *Fucus vesiculosus* em modelo experimental de artrite induzida por zymosan.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

CARDOSO, M. L.; XAVIER, C. A. C.; BEZERRA, M. B. E.; PAIVA, A. O. A.; CARVALHO, M. F. G.; BENEVIDES, N. M. B.; ROCHA, F. A. C.; LEITE, E. L. Assessment of Zymosan-Induced Leukocyte Influx in a Rat Model using Sulfated Polysaccharides. **Planta Med.**, v. 76, n. 2, p. 113-119, 2010.

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

CARDOSO, M. L. **Efeitos de frações obtidas da fucoídiana de *Fucus vesiculosus* em modelo experimental de artrite induzida por zymosan.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

CARVALHO, R.A. **Análise do mecanismo de ação de lasers de baixa potência, na região do visível vermelho, em inflamação aguda induzida por carragenina.** Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Instituto de pesquisa e desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.

CASCÃO, R.; ROSÁRIO, H. S.; SOUTO-CARNEIRO, M. M.; FONSECA, J. E. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. **Autoimmunity Reviews**, v.9, p. 531–535, 2010.

CASSIM, B.; MODY, G.; BHOOLA, K. D. Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 94, p. 1–34, 2002.

CAVALCANTE, C. F. **Estudo do efeito da fração não dialisável do látex de *Calotropis procera* (Ait) R. Br em modelos experimentais de inflamação com ênfase na artrite.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevalence of Doctor-Diagnosed Arthritis and Arthritis-Attributable Activity Limitation — United States, 2010–2012. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 62, n. 44, 2013.

CHABAUD, M.; DURAND, J. M.; BUCHS, N.; FOSSIEZ, F.; PAGE, G.; FRAPPART, L.; MIOSSEC, P. Human Interleukin-17. A T Cell-Derived Proinflammatory Cytokine Produced by the Rheumatoid Synovium. **Arthritis & reumathism**, v. 42, n. 5, p. 963–970, 1999.

CHANDRAN, V.; SCHENTAG, C.T.; BROCKBANK, J. E.; PELLETT, F. J.; SHANMUGARAJAH, S.; TOLOZA, S. M. A.; RAHMAN, P.; GLADMAN, D. D. Familial aggregation of psoriatic arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 68, p. 664-667, 2009.

CHAVES, H. V. **Padronização de modelo experimental de artrite na articulação temporomandibular induzida por zymosan em ratos e estudo do papel do óxido nítrico.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

CHAVES, H. V.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, A. M. B.; SILVA, A. A. R.; GOMES, A. S.; VALE, M. L.; BEZERRA, M. M.; BRITO, G. A. C. Experimental Model of Zymosan-Induced Arthritis in the Rat Temporomandibular Joint: Role of Nitric Oxide and Neutrophils. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-11, 2011.

CHOY, E. H. S.; PANAYI, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in reumatoid arthritis. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 12, p. 907-916, 2001.

CHOY, E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 51, p. 3-11, 2012.

CONEGERO, L. S.; IDE, R. M.; NAZARI, A. S.; SARRAGIOTTO, M. H.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C.V.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Alchornea glandulosa* (EUPHORBIACEAE). **Quim. Nova**, v. 26, n. 6, p. 825-827, 2003.

CONTE, F. P.; BARJA-FIDALGO, C.; VERRI JUNIOR, W. A.; CUNHA, F. Q.; ERA, G. A.; PENIDO, C.; HENRIQUES, M. G. M. O. Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB₄, TNF- α , and CXCL-1. **J. Leukocyte Biol.**, v. 84, p. 652-660, 2008.

CONTE, F. P.; MENEZES-DE-LIMA JUNIOR, O.; VERRI JUNIOR, W. A.; CUNHA, F. Q.; PENIDO, C.; HENRIQUES, M. G. Lipoxin A₄ attenuates zymosan-induced arthritis by modulating endothelin-1 and its effects. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 161, p. 911–924, 2010.

CORBACHO, M. I.; DAPUETO, J. J. Avaliação da capacidade funcional e da qualidade de vida de pacientes com artrite reumatoide. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 50, n. 1, p. 31-43, 2010.

COSTA, J. O.; FONSECA, K. C.; GARROTE-FILHO, M. S.; CUNHA, C. C.; FREITAS, M. V.; SILVA, H. S.; ARAÚJO, R. B.; PENHA-SILVA, N.; OLIVEIRA, F. Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant latex and snake venoms. **Biochimie**, v. 92, p. 1760-1765, 2010.

COSTA, J. P.; BECK, S. T. Avanços no diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide. **Saúde**, v.37, n.1, p. 6576, 2011.

CRUNIVEL, W. M.; MESQUITA JUNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; SALMAZI, . C.; KALLAS, E. G.; ANDRADE, L. E. C. Células T Regulatórias Naturais (TREGS) em Doenças Reumáticas. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 48, n.6, p. 342-355, 2008.

CUNHA, T. M.; BARSANTE, M. M.; GUERRERO, A. T.; VERRI, W. A.; FERREIRA, S. H.; COELHO, F. M.; BERTINI, R.; GIACINTO, C. D.; ALLEGRETTI, M.; CUNHA, F. Q.; TEIXEIRA, M. M. Treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, diminishes neutrophil influx and inflammatory hypernociception in mice. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 154, p. 460–470, 2008.

CUNHA, T. M.; VERRI JUNIOR, W. A.; 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. Leukocyte Biol.**, v. 83, p. 824-832, 2008.

DEMARCO, D.; KINOSHITA, L. S.; CASTRO, M. M. Laticíferos articulados anastomosados – novos registros para Apocynaceae. **Revista Brasil. Bot.**, v. 29, n. 1, p.133-144, 2006.

DOMINICAL, V. M.; BERTOLO, M. B.; ALMEIDA, C. B. ; GARRIDO, V. T.;MIGUEL, L. I.; COSTA, F. F.; CONRAN, N. Neutrophils of Rheumatoid Arthritis Patients on Anti-TNF- α Therapy and in Disease Remission Present Reduced Adhesive Functions in Association with Decreased Circulating Neutrophil-Attractant Chemokine Levels. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, p. 309–318, 2011.

DOMINICAL, V. M. **Propriedades adesivas e quimiotáticas dos neutrófilos de pacientes com artrite reumatoide e a influência de diferentes medicações.** Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Médica) - Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

DUSSE, L. M. SA.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

FALEIRO, L. R.; ARAÚJO, L. H. R.; VARAVALLO, M. A. A Terapia Anti-TNF- α na Artrite Reumatóide. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 77-94, 2011.

FERNANDES, C. M. **Estudos da inflamação e dor articulares em ratos e dos mecanismos da produção de TNF- α por macrófagos isolados, induzidos pela BaP1, uma metaloproteínase isolada do veneno da serpente *Bothrops asper*.**

Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

FERNANDES, C M.; PEREIRA TEIXEIRA, C. F.; LEITE, A. C.; ROCHA, F. A. The snake venom metalloproteinase BaP1 induces joint hypernociception through TNF- α and PGE2-dependent mechanisms. **Br J Pharmacol.** v. 151, n. 8, p. 1254-61, 2007.

FERRO, A. F. P.; BONACELLI, M. B. M.; ASSAD, A. L. D. Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. **GESTÃO & PRODUÇÃO**, v.13, n.3, p. 489-501, 2006.

FILIPPIN, L. I.; VERCELINO, R.; MARRONI, N. P.; XAVIER, R. M. Influência de processos redox na resposta inflamatória da artrite reumatoide. **Nature**, v. 423, p. 17-24, 2003.

FILIPPIN, L. I.; VERCELINO, R.; MARRONI, N. P.; XAVIER, R. M. Reumatóide Redox Influence on the Inflammatory Response in Rheumatoid Arthritis. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 48, n.1, p. 17-24, 2008.

FIRESTEIN, G. S.; Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, p. 356-361, 2003.

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; SANTOS NETO, M.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq.**, v. 18, n. especial, 2011.

FLEMMING, D. J.; BERNARD, S. A. Arthritis Mimicking Sports-Related Injuries. **Clin. Sports Med.**, v. 32, p. 577-597, 2013.

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

FU, K.; KLIBANOV, A. M.; LANGER, R. Protein stability in controlled-release systems. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 24-25, 2000.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; TERLAIN, B.; NETTER, P. Zymosan-induced arthritis in rats. II. Effects of anti-inflammatory drugs. **Life Sciences**, v. 56, n. 20, p 389-394, 1995.

GIASSI, K. S. **Uso de anti-TNF na artrite reumatoide e sua associação com autoanticorpos e doença auto-imune.** Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina) Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

GIRÃO, V. C. C. **Participação do óxido nítrico (NO) na modulação central da hiperalgesia na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos.** Tese (Doutorado

em Ciências Médicas) – Ciências médicas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

GOELDNER, I.; SKARE, T. L.; REASON, I. T. M.; UTIYAMA, S. R. R. Artrite reumatoide: uma visão atual. **J. Bras. Patol. Med. Lab** ., v. 47, n. 5, p. 495-503, 2011.

GOMESA, R. P.; BRESSANB, E.; SILVA, T. M.; GEVAERDA, M. S.; TONUSSIB, C. R.; DOMENECH, S. C. Efeitos de um minuto e dez minutos de deambulacao em ratos com artrite induzida por adjuvante completo de Freund sobre os sintomas de dor e edema. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 54, n. 2, p. 83 - 89, 2014.

GUERERRO, A. T. G.; VERRI, JR. W. A.; CUNHA, T. M.; SILVA, T. A.; ROCHA, F. A. C.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; PARADA, C. A. Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: A novel experimental arthritis model for pharmacological screening. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 84, p. 244-251, 2006.

GUPTA, M.; MAZUMDER, UK.; GOMATHI, P.; SELVAN, V. T. SELVAN. Antiinflammatory evaluation of leaves of *Plumeria acuminata*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 36, p. 1-6, 2006.

HAGEL, J. M.; YEUNG, E. C.; FACCHINI, P. J. Got Milk? The secret life of laticifers. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 12, p. 1360-1385, 2008.

HINTERHOLZ, E. L.; MUHLEN, C. A. Marcadores sorológicos de diagnóstico, atividade de doença e prognóstico da artrite reumatoide. **NewsLab**, v. 66, p. 148-153, 2004.

JACOMASSI, E.; MOSCHETA, I. S.; MACHADO, S. R. Morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae). **Acta bot. bras.**, v. 21, n. 3, p. 575-597, 2007.

JOOSTEN, L. A. B.; HELSEN, M. M. A.; SAXNE, T.; OO, F. A. J.; HEINEGARD, D.; BERG, W. B. IL-1ab Blockade Prevents Cartilage and Bone Destruction in Murine Type II Collagen-Induced Arthritis, Whereas TNF-a Blockade Only Ameliorates Joint Inflammation. **J. Immunol.**, v. 163, p. 5049-5055, 1999.

KAY, L.; CALABRESE, L. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 43, p. iii2-iii9, 2004.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 46, n.3, p. 199-206, 2006.

KHURANA, R.; BERNEY, S. M. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, v. 12, p. 153–165, 2005.

LARROSA, C. E. R.; DUARTE, M. R. **Contribuição ao estudo anatômico do caule de *Himatanthus sukuuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson, Apocynaceae.** Rev. Bras. Farmacogn., v.15, p. 110-114, 2005.

LAURINDO, I. M. M.; XIMENES, A. C.; LIMA, F. A. C.; PINHEIRO, G. R. C.; BATISTELLA, L. R.; BERTOLO, M. B.; ALENCAR, P.; XAVIER, R. M.; GIORGI, R. D. N.; CICONELLI, R. M.; RADOMINSKI, S. C. Artrite reumatóide: diagnóstico e tratamento. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 44, n. 6, p. 435-442, 2004.

LEITE, A. C. R. M.; CUNHA, F. Q.; DAL-SECCO, D.; FUKADA, S. Y.; GIRÃO, V. C. C.; ROCHA, F. A. C. Effects of nitric oxide on neutrophil influx depends on the tissue: role of leukotriene B4 and adhesion molecules. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, p. 818-825, 2009.

LEITE, A. C. R. M. **Estudo da participação do óxido nítrico na migração celular aguda na artrite e peritonite induzidas por zymosan ou lipopolissacarídeo em modelos experimentais.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

LEITE, A. K. R. M. **Efeito protetor dos extratos de *Ascaris suum* e *Coccidioides posadasii* e da lectina da semente de *Dioclea violacea* na artrite por zymosan em ratos e camundongos.** Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Ciências médicas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

LEITE, G. O.; PENHA, A. R. S.; SILVA, G. Q.; 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, n. 1, p.54-56, 2009.

LIMA, F. C.; **Janaúba (*Himatanthus WILLD. Ex. SCHULT.*) - APOCYNACEAE no controle de nematódeos gastrintestinais em ovinos.** Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Paulista Júlio de Mesquita, São Paulo, 2011.

LOUZADA-JUNIOR, P.; SOUZA, B. D. B.; TOLEDO, R. A.; CICONELLI, R. M. Análise Descritiva das Características Demográficas e Clínicas de Pacientes com Artrite Reumatóide no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 47, n.2, p. 84-90, 2007.

LUBBERTS, E.; VAN DEN BERG, W. Citocinas na patogênese da artrite reumatóide e colágeno - induzida artrite. **Landes Bioscience**, 2000 - 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6288/?report=printable>. Acesso em: 8 de novembro de 2014.

LUCETTI, D. L. **Avaliação das atividades antiinflamatória e antinociceptiva do acetato de lupeol isolado de *Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL – APOCYNACEAE (JANAGUBA).** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

LUCETTI, D. L.; LUCETTI, E. CP.; BANDEIRA, M. A. M.; VERAS, H. NH.; SILVA, A. H.; LEAL, L. K. AM.; LOPES, A. A.; ALVES, V. CC.; SILVA, G. S.; BRITO, G. A.; VIANA, G. B. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Journal of Inflammation**, v. 7, n. 60, p. 1-11, 2010.

LUZ, P. B. **Fração proteica isolada do látex de *Calotropis procera* (AIT.) R. Br. reduz hipernocicepção inflamatória mecânica em camundongos: mecanismos e mediadores envolvidos.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

LUZ, H. S., SANTOS, A. C. G.; LIMA; F. C.; MACHADO; K. R. G. Prospecção fitoquímica de *Himatanthus drasticus* Plumel (Apocynaceae), da mesorregião leste maranhense. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 16, n. 3, supl. I, p. 657-662, 2014.

MACGREGOR, A. J.; SNIEDER, H.; RIGBY, A. S.; KOSKENVUO, M.; KAPRIO, J.; AHO, K.; SILMAN, A. J. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using from twins. **Arthritis reumathoid**, v. 43, n. 1, p. 30–37, 2000.

MALTA, D. J. N. **Avaliação do potencial anti-inflamatório e antinociceptivos de derivados tiazolidinônicos 3,5 – dissubstituídos.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

MARQUES, L. M. **Proteínas isoladas do látex de *Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL APOCYNACEAE protegem a mucosa gástrica de camundongos contra lesões induzidas por etanol: envolvimento da via NO/GMPc/ KATP e da glutathiona.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

MATOS, M. P. V. **Aspectos bioquímicos e etnofarmacológicos do látex de *Himatanthus drasticus* Mart. (Plumel)** Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Bioquímica - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

MATOS, M. P. V. **Caracterização bioquímica parcial e investigação de atividades biológicas contra pragas agrícolas na fração protéica do látex de *Himatanthus drasticus* Mart. (Plumel)**, 2010, 90 f. Monografia (Curso de Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

MATOS, M. P. V.; OLIVEIRA, R. S. B.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; OLIVEIRA, J. S.; AMARAL, J. S.; NISHI, B. C.; RAMOS, M. V. Ethnopharmacological Use and Pharmacological Activity of Latex from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **International Journal of Indigenous Medicinal Plants**, v. 29, p. 1122-1131, 2013.

MERINI, L. R.; FURTADO, S. C.; GUIMARÃES, M. R.; GALVÃO, J. R.; BARCELLOS, J. F. M. Citocinas pró-inflamatórias em artrite induzida por adjuvante:

uma revisão da ação imunomoduladora de substâncias bioativas. **Scientia Amazonia**, v. 1, n.3, p. 27-39, 2012.

MESQUITA, A. C.; OLIVEIRA, L. E. M. Características anatômicas da casca e produção de látex em plantas de seringueira não enxertadas. **Acta Amazônica**, v. 40, n. 2, p. 241- 246, 2010.

MORAES, T. M. **Avaliação do óleo essencial de *Citrus aurantium* E e do seu constituinte majoritário, limoneno, como adjuvantes no tratamento da artrite reumatoide em ratos com úlceras gástricas.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

MORAIS, N. C. R. **Efeitos antiinflamatórios do laser LED de baixa potência na artrite induzida por zymosan em ratos wistar.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2008.

MOTA, L. M. H.; CRUZ, B. A.; BRENOL, C. V.; PEREIRA, I. A.; FRONZA, L. S. R. BERTOLO, M. B.; FREITAS, M. V. C.; SILVA, N. A.; LOUZADA-JUNIOR, P.; GIORGI, R. D. N.; LIMA, R. A. C.; PINHEIRO, G. R. C. Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 51, n. 3, p. 199-219, 2011.

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

MOTA, L. M. H.; CRUZ, B. A.; BRENOL, C. V.; PEREIRA, I. A.; REZENDE-FROTA, L. S.; BERTOLO, M. B.; FREITAS, M. V. C.; SILVA, N. A.; LOUZADA-JUNIOR, P.; GIORGI, R. D. N.; LIMA, R. A. C.; BERNARDO, W. M.; PINHEIRO, G. R. C. Diretrizes para o tratamento da artrite reumatoide. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 53, n. 2, p. 158 – 183, 2013.

MOTA, L. M. H.; CRUZ, B. A.; BRENOL, C. V.; POLLAK, D. F.; PINHEIRO, J. R. C.; LAURINDO, I. M. M.; PEREIRA, I. A.; CARVALHO, J. F.; BERTOLO, M. B.; PINHEIRO, M. M.; FREITAS, M. V. C.; SILVA, A.; LOUZADA-JUNIOR, P.; SAMPAIO-BARROS, P. D.; GIORGIO, D. N.; LIMA, R. A. C.; ANDRADE, L. E. C. Segurança do uso de terapias biológicas para o tratamento de artrite reumatoide e espondiloartrites. **Rev. Bras. Reumatol.**, p. 1-29, 2014;

MOURA, M. C.; ZAKSZEWSKI, P. T. S.; SILVA, M. B. G.; SKARE, T. L. Perfil dos pacientes com manifestações extraarticulares de artrite reumatoide de um serviço ambulatorial em Curitiba, Sul do Brasil. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 52, n. 5, p. 679-694, 2012.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature**, v. 6, p. 173-182, 2006.

NONOSE, N. **Avaliação dos efeitos da curcumina na fase aguda da artrite induzida por zimosan estudo experimental em ratos**. Dissertação (Mestre em Ciências da Saúde) - Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2011.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. G.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

OLIVEIRA, F. F. B. **Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do óleo da polpa de pequi *Caryocar coriaceum* Wittm na artrite induzida por zimosan em ratos**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

OPAL, S. M.; DEPALO, V. A. Anti-Inflammatory Cytokines. **CHEST**, v. 117, n. 4, p. 1162-1172, 2000.

PAIVA, A. A. O. **Avaliação de uma fração polissacarídica da alga *Lobophora variegata* (Lamouroux) em modelo de artrite induzida em ratos por zimosan**. Dissertação (Mestre em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

PAIVA, A. A. O.; CASTRO, A. J. G.; NASCIMENTO, M. S.; WILL, S. E. P.; SANTOS, N. D.; ARAUJO, R. M.; XAVIER, C. A. C.; ROCHA, F. A.; LEITE, E. L. Antioxidant and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Lobophora variegata* on zimosan-induced arthritis in rats. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 1241–1250, 2011.

PARK, J. Y.; PILLINGER, M. H. Interleukin-6 in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**, v. 65, p. S4-10, 2007.

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

POHLERS, D.; NISSELER, K.; FREY, O.; SIMON, J.; PETROW, P. K.; KINNE, R. W.; BRÄUER, R. Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: influence on T helper cell activation. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 135, p. 409-415, 2004.

RAMOS, M. V.; OLIVEIRA, J. S.; FIGUEIREDO, J. G.; FIGUEIREDO, I. S. T.; KUMAR, V. L.; BITENCOURT, F. S.; CUNHA, F. Q.; OLIVEIRA, R. S. B.; BOMFIM, L. R.; LIMA-FILHO, J. V.; ALENCAR, N. M. N. Involvement of NO in the inhibitory effect of *Calotropis procera* latex protein fractions on leukocyte rolling, adhesion and infiltration in rat peritonitis model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 387-392, 2009.

RANGEL, E. S.; NASCIMENTO, M. T. Ocorrência de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Apocynaceae) como espécie invasora de restinga. **Acta bot. bras.**, v. 25, n. 3, p. 657-663, 2011.

RAUH, L. K. **Avaliação da atividade antiinflamatória tópica da *Vernonia scorpioides* (Lam) Persons em modelos de inflamação cutânea em camundongos.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

RICHAUD-PATIN, Y.; ALVARADO, C.; VILLASEÑOR-BUSTAMANTE, S.; LLORENTE, LUIS. Role of interleukin-10 autoimmunity: physiological and pathological. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 37, n. 3, 1997.

ROCHA, F. A. C.; LEITE, A. K. R. M.; POMPEU, M. M. L.; CUNHA, T. M.; VERRI, JR. W. A.; SOARES, F. M.; CASTRO, R. R.; CUNHA, F. Q. Protective Effect of an Extract from *Ascaris suum* in Experimental Arthritis Models. **Infection and immunity**, v. 76, n. 6, p. 2736-2745, 2008.

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, n. 4, p. 206-17, 2003.

RODRIGUES, A. R. C. **Role of IL-1 β in reumathoid arthritis.** Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) – Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, 2012.

ROTH, A.; MOLLENHAUER, J.; WAGNER, A.; FUHRMANN, R.; STRAUB, A.; VENBROCKS, R. A.; PETROW, P.; BRÄUER, R.; SCHUBERT, H.; OZEGOWSKI, J.; PESCHEL, G.; MÜLLER, P. J.; KINNE, R. W. Intra-articular injections of high-molecular-weight hyaluronic acid have biphasic effects on joint inflammation and destruction in rat antigen-induced arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 7, n. 3, p. 677-686, 2005.

RUIZ, D. G.; AZEVEDO, M. N. L.; SANTOS, O. L. R. Artrite psoriásica: entidade clínica distinta da psoríase? **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 52, n. 4, p. 623-638, 2012.

RYCKE, L. D.; PEENE, I.; HOFFMAN, I. E. A.; KRUITHOF, E.; UNION, A.; MEHEUS, L.; LEBEER, K.; WYNS, B.; VINCENT, C.; MIELANTS, H.; BOULLART, L.; SERRE, G.; VEYS, E. M.; KEYSER, F. D. Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 63, p. 1587–1593, 2004.

SALINA, P. H.; XAVIER, R. M. Influência dos polimorfismos genéticos (IL10/CXCL8/CXCR2/NF κ B) na susceptibilidade das doenças reumatológicas autoimunes. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 54, n. 4, p. 301-310, 2014.

SCHIVO, I. R. S.; VERRI JUNIOR, W. A.; CUNHA, T. M.; SILVA, T. A.; DAL-SECCO, D.; CANETTI, C.; ROCHA, F. A. C.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Involvement of LTB4 in zymosan-induced joint nociception in

mice: participation of neutrophils and PGE2. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 122-130, 2008.

SILVA, A. S. B. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *Mikania lindleyana* DC.: validação do uso popular.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. **Administração oral de peptídeos e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 38, n. 2, p. 125-140, 2002.

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.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. **Artrite Reumatóide: Diagnóstico e Tratamento.** Projeto Diretrizes, 2002.

SOCIEDADE PORTUGUESA DE REUMATOLOGIA. **Acta reumatológica portuguesa**, v. 31, n. 2, 2006.

SOUZA, A. W. S.; MESQUITA JUNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; CRUNIVEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Sistema Imunitário – Parte III O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 50, n. 6, p. 665-94, 2010.

SOUSA, E. L. **Avaliação da atividade antitumoral de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel – APOCYNACEAE (JANAGUBA).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

SOUSA, E. L.; GRANGEIRO, A. R. S.; BASTOS, I. V. G. A.; RODRIGUES, G. C. R.; SILVA, M. J.; ANJOS, F. B. R.; SOUZA, I. A.; SOUSA, C. E. L. Antitumor activity of leaves of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel-Apocynaceae (Janaguba) in the treatment of Sarcoma 180 tumor. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, 2010.

SRIRANGAN, S.; CHOY, E. H. The role of Interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. **Ther. Adv. Musculoskel. Dis.**, v. 2, n. 5, p. 247-256, 2010.

TAYLOR, P. C.; MEHTA, P.; TULL, T. Aetiopathology of rheumatoid arthritis. **MEDICINE**, v. 38, n. 4, p. 163-166, 2010.

USNAYO, M. J. G.; ANDRADE, L. E. C.; ALARCON, R. T.; OLIVEIRA, J. C.; SILVA, G. M. F.; BENDET, I.; BURLINGAME, R.; PORTO, L. C. PINHEIRO, G. R. C. Estudo da frequência dos alelos de HLA-DRB1 em pacientes brasileiros com artrite reumatoide. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 51, n. 5, p. 465-483, 2011.

VAN DEN BERG, W. B. Anti-cytokine therapy in chronic destructive arthritis. **Arthritis Res.**, v. 3, p.18–26, 2001.

VAN'T HOF, R. J.; HOCKING, L.; WRIGHT, P. K.; RALSTON, S. H. Nitric oxide is a mediator of apoptosis in the rheumatoid joint. **Reumatology**, v. 39, p. 1004-1008, 2000.

VAZ, A. E.; FARIA JUNIOR, W. A.; FERREIRA, C.; LAZARSKI, S. CARMO, H. F.; ROCHA SOBRINHO, H. M. Epidemiological and clinical profile of patients with rheumatoid arthritis in a medical academic hospital in Goiânia, Goiás, Brazil. **Medicina**; v. 46, n. 2, p. 141-53, 2013.

VERRI, JR. W. A.; 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?. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 116-138, 2006.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

XAVIER, C. A. C. **Efeito do fucoidam de Fucus vesiculosus em um modelo experimental de artrite reumatoide.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.

WIPKE, B. T.; ALLEN, P. M. Essential Role of Neutrophils in the Initiation and Progression of a Murine Model of Essential Role of Neutrophils in the Initi. **J. Immunol.**, v. 167, p. 1601-1608, 2001.

WOJDASIEWICZ, P.; PONIATOWSKI, A. A.; SZUKIEWICZ. The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1-19, 2014.

WRIGHT, H. L.; MOOTS, R. J.; BUCKNALL, R. C.; EDWARDS, S. W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, v. 49, p. 1618-1631, 2010.

WRIGHT, H. L.; MOOTS, R. J.; BUCKNALL, R. C.; EDWARDS, S. W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, v. 10, p. 593-601, 2014.

YUSOF, M.; EMERY, P. Targeting interleukin-6 in rheumatoid arthritis. **Drugs.**, v. 73, n. 4, p. 341-56, 2013.