



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

RACHEL SINDEAUX PAIVA PINHEIRO

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DE PROTEÍNAS ISOLADAS
DO LÁTEX DE *Plumeria rubra* L. EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE
INDUZIDA POR ZYMOZAN EM CAMUNDONGOS.**

FORTALEZA

2017

RACHEL SINDEAUX PAIVA PINHEIRO

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DE PROTEÍNAS ISOLADAS
DO LÁTEX DE *Plumeria rubra* L. EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE
INDUZIDA POR ZYMOSAN EM CAMUNDONGOS.**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientadora (a): Prof^ª. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P1e PINHEIRO, RACHEL SINDEAUX PAIVA.
EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DE PROTEÍNAS ISOLADAS DO LÁTEX DE *Plumeria rubra* L. EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN EM CAMUNDONGOS. / RACHEL SINDEAUX PAIVA PINHEIRO. – 2017.
126 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. NYLANE MARIA NUNES DE ALENCAR.
1. Artrite. 2. *Plumeria rubra*. 3. Hipernocicepção. 4. Zymosan. I. Título.

CDD 615.1

RACHEL SINDEAUX PAIVA PINHEIRO

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DE PROTEÍNAS ISOLADAS
DO LÁTEX DE *Plumeria rubra* L. EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE
INDUZIDA POR ZYMOSAN EM CAMUNDONGOS.**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Farmacologia da Universidade Federal do
Ceará, como requisito para obtenção do título de
Doutora em
Farmacologia.

Orientadora (a): Prof^a. Dra. Nylane Maria Nunes
de Alencar.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Nylane Maria Nunes de Alencar (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Fábio Miyajima

Universidade Federal do Ceará - UFC

Dra. Carla Freire Celedônio Fernandes

Fiocruz

Dra. Maria Eugenia Errasti

Universidad Nacional de La Plata

Aos meus filhos que são a minha razão de viver, aos meus pais que me ensinaram a nunca desistir dos meus sonhos ao meu marido pela paciência e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me deu forças para perseverar e continuar, diante de qualquer obstáculo que surgisse.

Aos meus familiares, em especial minha mãe e meu pai, Minerva Maria Sindeaux Paiva Pinheiro e Antonio Carlos Pinheiro, que sempre me ensinaram a discernir o certo do errado, e se empenharam ao máximo para dar-me escolaridade e educação. Muito obrigada pelo carinho, apoio incondicional, educação e incentivo.

Ao meu marido e meu amor, Régis Gonçalves Pinheiro, por sua amizade, companhia, palavras, carinho e amor incessantes. Pela compreensão, incentivo e incansável busca pelo meu sucesso. Por ser meu companheiro inseparável em todos os momentos e por se orgulhar e torcer por mim!!!!

Aos meus filhos que são o bem mais precioso que tenho, por eles consegui terminar essa tese e espero ser orgulho e exemplo para que eles possam trilhar o caminho do conhecimento.

Aos meus irmãos, Daniel Sindeaux Paiva Pinheiro e Victor Sindeaux Paiva Pinheiro por sempre acreditarem em mim e nos meus ideais e torcerem pelo meu sucesso!!!!

Aos meus sobrinhos Amanda, Matheus, Gabriela, Ícaro, Daniel Filho e Maria Eduarda, por me darem tanto amor e carinho.

À Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar “MÃEORIENTADORA” pela valorosa orientação na realização deste trabalho, pelas palavras de incentivo e estímulo dado durante toda minha vida acadêmica e por ser um exemplo na qual quero seguir durante toda minha jornada.

À Carla Freire Celedônio Fernandes e Fábio Miyajima por aceitar compor a banca examinadora desta dissertação.

Ao professor Dr. Márcio Viana Ramos, por fornecer as proteínas laticíferas utilizadas neste trabalho e por aceitar compor a banca examinadora desta dissertação.

À Patrícia Bastos Luz pelos empurrões constantes em todos os momentos da realização deste trabalho, pelo convívio maravilhoso, por estarem sempre disponíveis, pelas palavras de amizade quando sempre precisei e por termos o privilégio de compartilharmos de uma grande amizade. Iniciamos essa jornada juntas e graças ao seu apoio pude terminar essa tese.... **Teria sido mais difícil sem você!!!**

À Gisele Pinheiro minha prima e minha IC que tanto me ajudou durante todos os experimentos, seja finais de semana, feriado, chegando no laboratório antes de 6:00 da manhã ou durante a confecção da tese com auxílio nas referências.... Muito obrigada!!! **Sem você eu não teria conseguido!!!**

À Ingrid Samantha Tavares de Figueredo, pelo conselhos e experiências passadas para mim, por me ensinar bastante durante minha época de iniciação científica e por ter sido uma peça fundamental na construção de minha formação acadêmica. **Muito obrigada por tudo!!!**

Aos demais colegas de laboratório que participaram da realização dos experimentos:

- Patrícia Sâmara, nos auxiliando em tudo que era necessário, tudo mesmo, tanto com reagentes como apoio na parte de abastecimento de materiais e em tudo que precisarmos; além de ajudar nos experimentos de toxicologia;
- Larisse, companheira de doutorado e de alguns experimentos, obrigada pelo apoio e disponibilidade sempre em ajudar;
- Luana por me ensinar o modelo e inclusive realizar alguns experimentos quando eu estava impossibilitada;
- Ao ic Yure Tayro que tanto ajudou nos experimentos;
- Às colegas de laboratório Tamiris, Kályan, Marília, Taiana pelo apoio e disponibilização de ajudar em todos os momentos.

Aos amigos que ganhei durante a graduação e que me acompanham até hoje, seja torcendo de longe ou mesmo juntos na pós-graduação: Livia Alves e Patrícia Luz.

Aos colegas de trabalho da VISA, especialmente Manoel e Natasha que sempre estiveram ao meu lado e me incentivando para seguir em frente.

Aos colegas de trabalho da MEAC, especialmente aos da Farmácia Clínica: Kely, Aline Holanda, Aline Parente, Mariana, Alisson e Aracélia, pelas palavras de incentivo e por me apoiar todas as vezes que precisei!!! **Muito obrigada!!!**

À Antonia Martins Freire por cuidar tão bem dos meus filhos enquanto estava ausente durante os experimentos e disciplinas.

A todos os professores da Pós-graduação, pelos conhecimentos cedidos e, pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento intelectual e pessoal.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DE PROTEÍNAS ISOLADAS DO LÁTEX DE *Plumeria rubra* L. EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOZAN EM CAMUNDONGOS.

INTRODUÇÃO: *Plumeria rubra* L. é uma planta laticífera que pertence à família *Apocynaceae*. Conhecida popularmente como jasmim, jasmim-manga, *frangipani* ou árvore-pagode, é originária da América Central e encontra-se amplamente distribuída pelas regiões de clima tropical do mundo, inclusive no Brasil. Estudos com a fração do látex de *Plumeria rubra* demonstraram apresentar efeito antiulcera gástrica, antioxidante e atividade vasodilatadora. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da fração proteica isolada do látex de *Plumeria rubra* (PrLP) na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos.

METODOLOGIA: Esse estudo foi aprovado na comissão de ética em pesquisa animal da Universidade Federal do Ceará (nº82/2014). A artrite foi induzida em camundongos fêmeas swiss (n=6) através da administração de 0,1 mg Zymosan (Zy) i.a. Os animais foram tratados com salina ou dexametasona (2 mg/kg e.v.) meia hora antes ou com PrLP (12,5; 25, 50 e 100mg/kg e.v.) 1 hora após o Zy. Seis horas após a indução os animais foram eutanasiados e foi feita a coleta do lavado articular para contagem total e diferencial de leucócitos, atividade da mieloperoxidase (MPO) e concentração 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 com azul de evans. Adicionalmente foi avaliado o efeito de PrLP sobre processo inflamatório na membrana sinovial e sobre a expressão de NOSi, COX, NFkB e TNF- α no tecido. A hipernocicepção mecânica foi estudada utilizando uma versão eletrônica (VonFrey) e foi investigada tanto na hipernocicepção articular induzida por zymosan quanto na plantar induzida por carragenina e prostaglandina. O mecanismo do efeito antinociceptivo de PrLP foi investigado fazendo uma modulação com Naloxona (1 mg/kg; e.v.) ou L-arginina (1g/kg; i.p.) 30 minutos antes da administração de PrLP. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste ANOVA/Newman Keuls ou Kruskal Wallis/Dunns; p <0,05 foi considerado significativo.

RESULTADOS: O tratamento com PrLP nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg e.v. reduziu de forma significativa a contagem de leucócitos (899,8 x 10⁶/ml \pm 148; 1225 x 10⁶/ml \pm 89,59; 890 x 10⁶/ml \pm 165,7, respectivamente), a contagem de neutrófilos (860,3 \pm 97,57; 1108 \pm 127,6 e 908,7 \pm 159,9, respectivamente) e a concentração de MPO (12,1 \pm 1,3; 14,3 \pm 0,6; 8,9 \pm 3,5 UMPO/ml respectivamente). PrLP na dose de 25mg/kg reduziu as concentrações de mediadores inflamatórios tais como NO, IL-1 β , TNF- α e IL-6 (71,84 \pm 9,1 mM; 4569 \pm 712,5; 1409 \pm 221,6 e 847,3 \pm 260,4 pg/ml respectivamente) quando comparados ao grupo controle. Também foi observado uma redução do edema pela administração de PrLP 25 mg/kg, esse tratamento reduziu de forma significativa o diâmetro articular na terceira (0,89 \pm 0,001 mm) e na sexta hora (0,99 \pm 0,02 mm) e também reduziu o extravasamento de azul de evans para a articulação (40,46 \pm 3,6 μ g/g). No ensaio histopatológico do tecido observou-se redução significativa do infiltrado inflamatório (com redução na contagem de neutrófilos), edema, comprometimento da membrana sinovial e hemorragia nos animais que receberam PrLP (25 mg/kg) e na imunohistoquímica houve redução significativa na expressão de COX-2, NOSi, TNF- α e NFkB. Na hipernocicepção mecânica articular o tratamento com PrLP (25 mg/kg) reduziu de forma significativa

tanto na terceira ($0,86 \pm 1,3$) como na sexta hora ($1,08 \pm 2,3$) e esse efeito foi revertido pela administração prévia de L-arginina (1g/kg, i.p.) e de naloxona (1mg/kg; e.v.). Adicionalmente, PrLP (25 mg/kg) reduziu de forma significativa a hipernocicepção plantar induzida por carragenina na terceira ($1,74 \pm 0,4$) e na quinta hora ($1,5 \pm 0,4$) e a hipernocicepção induzida por prostaglandina na terceira hora ($1,4 \pm 0,4$).

CONCLUSÃO: PrLP apresenta atividade antinociceptiva e anti-inflamatória no modelo de artrite induzida por zymosan. 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. *Plumeria rubra*. Hipernocicepção. Zymosan.

ABSTRACT

Anti-inflammatory and antinociceptive effect of isolated proteins of *Plumeria rubra* l. latex in experimental model of arthritis induced by zymosan in mice.

INTRODUCTION: The *Plumeria rubra* is a laticifer plant of family Apocynaceae, popularly known as “Jasmim”. It is widely distributed in tropical and subtropical regions, including Brazil. Some studies show that the latex of *P. rubra* has gastric antiulcer effect, antioxidant and vasodilator activity. The aim of this study was to evaluate the effect of isolated proteins from *Plumeria rubra* latex (PrLP) in arthritis induced by zymosan (Zy).

METHODOLOGY: This study was approved by the Ethics Committee on Animal Research of the UFC-CEPA (82/14). Arthritis was induced in female Swiss mice (n = 6) by injection of 0.1 mg Zy intra-articular. After 1 hour of Zy injection, the animals were treated with saline or PrLP (12.5, 25, 50 and 100 mg/kg i.v.); the dexamethasone (2 mg/kg i.v.) was administered thirty minutes before Zy treatment. After six hours of arthritis 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 Evans blue. In addition, immunohistochemistry was performed for cyclooxygenase 2 (COX-2), NOSi, Nf κ B e TNF- α in the tissue. The mechanical hypernociception was induced by intra-articular injection of Zy or intra-plantar injection of carrageenan or prostaglandin E₂. The effect antinociceptive of PrLP was evaluated in the absence and in the presence of Naloxone (1 mg / kg; i.v.) and L-arginine (1g / kg; i.p.), which were administered 30 minutes before of the administration of PrLP. The statistical analysis were performed using the ANOVA/ Newman Keuls or Kruskal Wallis/Dunn *post hoc* test. Values of p <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS PrLP at doses of 25, 50 and 100 mg /kg iv reduced the leukocyte count (899.8×10^6 / ml \pm 148; 1225×10^6 / ml \pm 89.59 and 890×10^6 / ml \pm 165.7, respectively), the neutrophil count (860.3 ± 97.57 ; 1108 ± 127.6 and 908.7 ± 159.9 , respectively) and the MPO activity (12.1 ± 1.3 ; 14.3 ± 0.6 and 8.9 ± 3.5 UMPO / ml, respectively). PrLP (25 mg/kg) modulated the concentrations of the inflammatory mediators such as NO, IL-1 β , TNF- α and IL-6 (71.84 ± 9.1 mM; 4569 ± 712.5 ; 1409 ± 221.6 and 847.3 ± 260.4 pg/ml respectively) when compared to the saline group. PrLP (25 mg/kg). Reduced the edema, which significantly reduced joint diameter in the third (0.89 ± 0.001 mm) and in the sixth hour (0.99 ± 0.02 mm) and also reduced the extravasation of Evans blue to the joint (40.46 ± 3.6 μ g/g). In the tissue histopathological study, PrLP (25 mg / kg) significantly reduced the inflammatory infiltrate (with reduction in the neutrophil count), edema, synovial membrane involvement and haemorrhage. PrLP (25 mg / kg) was also able to reduce the immunohistochemistry labeling for COX-2, NOSi, TNF- α and NF κ B.

In mechanical hypernociception, PrLP (25 mg / kg) significantly reduced both the third (0.86 ± 1.3) and the sixth hour (1.08 ± 2.3), and this effect was reversed by the administration of L-arginine (1g / kg, ip) and naloxone (1mg / kg, iv). In addition, PrLP (25 mg / kg) significantly reduced carrageenin-induced plantar hypernociception in the third (1.74 ± 0.4) and fifth hour (1.5 ± 0.4) and prostaglandin-induced hypernociception in the third hour (1.4 ± 0.4).

CONCLUSION: PrLP 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. *Plumeria rubra*. Hypernociception. Zymosan.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Aspecto geral da planta <i>Plumeria rubra</i>	38
FIGURA 2 - Esquema de fracionamento do látex de <i>Plumeria rubra</i>	38
FIGURA 3 – Perfil cromatográfico (A) e eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% (B) das sub-frações sequenciais de PrPL recuperadas durante a cromatografia de Filtração em gel Sephacryl S-100.	46
FIGURA 4 - PrLP reduz o influxo celular na artrite induzida por zymosan em camundongos.....	59
FIGURA 5 - PrLP reduz a atividade da mieloperoxidase (MPO) na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos.....	61
FIGURA 6 - PrLP reduz o edema na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	63
FIGURA 7- Representação histológica da membrana sinovial na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	67
FIGURA 8 - PrLP reduz o número de neutrófilos na sinóvia de animais com artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	68
FIGURA 9 - PrLP reduz a concentração de óxido nítrico na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos.....	70
FIGURA 10 - PrLP reduz a concentração de citocinas pró-inflamatórias no lavado articular de camundongos com artrite induzida por zymosan (Zy).....	72
FIGURA 11: PrLP reduz a expressão de COX-2 na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	74
FIGURA 12: PrLP reduz a expressão de NOSi na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	75
FIGURA 13: PrLP reduz a expressão de NFkB na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	76
FIGURA 14: PrLP reduz a expressão de TNF- α na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	77
FIGURA 15- PrLP reduz imuno-expressão de TNF- α , COX-2, NFkB e NOSi na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos.....	78
FIGURA 16 - PrLP reduz os níveis de malonaldeído na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos.....	80

FIGURA 17 - PrLP restaura os níveis de GSH na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	81
FIGURA 18 - PrLP reduz a hipernocicepção na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	83
FIGURA 19 – L-arginina reverte o efeito de PrLP na hipernocicepção na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos.....	85
FIGURA 20 – Naloxona reverte o efeito de PrLP na hipernocicepção na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos.....	87
FIGURA 21 - PrLP reduz a hipernocicepção mecânica plantar induzida por carragenina (Cg).....	89
FIGURA 22 - PrLP reduz a hipernocicepção mecânica plantar induzida por prostaglandina E2 (PGE2)	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -PrLP reduz o processo inflamatório da membrana sinovial na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos.....	66
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido aracdônico
ANOVA	Análise de Variância
AINEs	Anti-inflamatórios Não Esteróides
AIE	Anti-inflamatórios Esteroidais
AMPc	Adenosina mono fosfato
AP	Artrite Psoriática
AR	Artrite Reumatóide
CFA	Completo Adjuvante de Freund
CD	Célula Dendrítica
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
Cg	Carragenina
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
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
e.v.	Endovenoso
GMPc	Guanina mono fosfato
GSH	Glutationa
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PrDF	Fração proteica dializável de <i>Plumeria rubra</i>
PrLP	Fração proteica não-dializável de <i>Plumeria rubra</i>
IASP	Associação internacional para estudo da dor
IFN-γ	Interferon gama
i.a.	Intra-articular
IL-1β	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
NOSi	Óxido nítrico sintase induzível
i.v.	Intravenoso
kD	Kilodalton
kg	Quilograma
LP	Fração proteica
mBSA	Albumina de Soro Bovino metilada
MDA	Malonaldeído
mg	Miligrama
μL	Microlitros
ml	Mililitro

MPO	Mieloperoxidase
MMP	Metaloproteinase
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOSi	Óxido nítrico sintase induzível
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Nível de significância
PBS	Tampão Fosfato Salina
pg	Picograma
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PGI	Prostaciclina
PGE2	Prostaglandina E2
RPM	Rotações por Minuto
s.c.	Subcutânea
TLR-2	Receptores Toll-like 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alpha
UMPO	Unidade de Mieloperoxidade
v.o.	Via Oral
Zy	Zymosan

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Artrite reumatoide	18
1.2. Dor inflamatória	27
1.3 Artrite induzida pelo zymosan (Zy)	30
1.4 Látex e Plantas laticíferas	32
1.5 <i>Plumeria rubra</i>	35
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVOS	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Animais	42
4.2 Drogas e reagentes	42
4.3 Equipamentos e materiais	43
4.4 Coleta do látex e isolamento da fração proteica	43
4.5 Indução da Artrite por Zymosan	47
4.6 Coleta do Lavado Articular	47
4.7 Grupos Experimentais e Tratamentos	47
4.8 Contagem total de leucócitos no lavado articular	48
4.9 Contagem diferencial de leucócitos	48
4.10 Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO) no lavado articular	49
4.11 Avaliação do edema na articulação	49
4.11.1 Medida do diâmetro articular	49
4.11.2 Permeabilidade Vascular por Extravasamento de Azul de Evans	50
4.12. Histopatológico	51
4.13 Determinação dos níveis de nitrito no lavado articular	51
4.14 Dosagem de citocinas no sobrenadante do lavado	52
4.15 Imunohistoquímica para COX-2, TNF-α, NOSi e NFkB	52
4.16 Dosagem de malonaldeído (MDA) no tecido articular	53
4.17 Dosagem de glutathiona (GSH) no tecido articular	54
4.18 Avaliação do efeito antinociceptivo de PrLP na artrite induzida por Zymosan	55
4.19 Avaliação do efeito de PrLP na hipernocicepção mecânica plantar induzida pela carragenina (Cg) e prostaglandina E₂ (PGE₂)	56
4.20 Análise Estatística	57

5. RESULTADOS	58
5.1 PrLP reduz o influxo celular de leucócitos totais e neutrófilos na artrite induzida por zymosan em camundongos	58
5.2 PrLP reduz a atividade da mieloperoxidase (MPO) na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	60
5.3 PrLP reduz o edema na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	62
5.4 PrLP reduz o processo inflamatório na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	65
5.5 PrLP reduz a concentração de óxido nítrico na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	69
5.6 PrLP reduz as concentrações de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) no lavado articular de camundongos com artrite induzida por zymosan (Zy)	71
5.7 - PrLP reduz imuno-expressão de TNF- α , COX-2, NF κ B e NOSi na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	73
5.8 PrLP reduz os níveis de malonaldeído (MDA) e restaura os níveis de GSH na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	79
5.9 PrLP reduz a hipernocicepção na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos	82
5.10 O efeito antinociceptivo de PrLP é revertido com a administração prévia de L-arginina na hipernocicepção na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos.....	84
5.11 O efeito antinociceptivo de PrLP é revertido com a administração prévia de naloxona na hipernocicepção na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos.....	86
5.12 PrLP reduz a hipernocicepção mecânica plantar induzida por carragenina (Cg).....	88
5.13 PrLP reduz a hipernocicepção mecânica plantar induzida por prostaglandina E2 (PGE ₂)	90
6. DISCUSSÃO	92
7. CONCLUSÃO	111
REFERÊNCIAS	112

1. INTRODUÇÃO

1.1 Artrite reumatoide

Artrite é um termo genérico para várias doenças articulares que envolve a inflamação de uma ou mais articulações ou do sistema musculoesquelético. A inflamação intra-articular é o principal sintoma encontrado nessas doenças e existem mais de 150 tipos de doenças reumáticas e musculoesqueléticas categorizadas como artrite sejam agudas ou crônicas, as principais são artrite reumatoide (AR), artrite psorática, artrite reativa, artrite gotosa e espondilite anquilosante (CONTE *et al.*, 2015; CROSS *et al.*, 2014).

A AR é uma doença auto imune que se caracteriza por uma poliartrite crônica que atinge principalmente as articulações e se manifestam como fadiga dor, anorexia, astenia e sintomas musculoesqueléticos vagos até o aparecimento da rigidez e inflamação da membrana sinovial (sinovite), levando à destruição articular (DARREN *et al.*, 2009; MOTA *et al.*, 2011). O desenvolvimento da doença leva a um processo inflamatório crônico que induz mudanças na composição celular e expressão gênica dos sinoviócitos, promovendo hiperplasia dos fibroblastos sinoviais e dano à cartilagem, osso e ligamentos (KLIPPEL *et al.*, 2001). Na AR, a lise da cartilagem articular e a erosão do osso subcondral (fina placa de osso localizada diretamente sob a cartilagem articular, juntamente com o osso esponjoso que dá sustentação a esta placa óssea) parecem ser os fenômenos mais precoces responsáveis pelas deformidades articulares e incapacitação funcional. E a compreensão da fisiopatologia dos mecanismos envolvidos na lise da cartilagem articular e do osso subcondral é necessária para se buscar tratamentos que possam alterar o curso evolutivo da doença.

As articulações são conexões entre dois ossos que são recobertas por cartilagem, ligamentos e pela membrana sinovial que delimita a cavidade preenchida pelo líquido sinovial. Essa membrana é constituída por sinoviócitos do tipo A e do tipo B e por macrófagos sinoviais, 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).

Os sinoviócitos tipo A tem grande semelhança funcional e estrutural com os macrófagos e compõem entre 20 e 30% das células da membrana. Os sinoviócitos do tipo B são conhecidos como sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (FLS) formam cerca de 70% das células do tecido sinovial. Parecem ter um papel-chave não somente no desencadeamento da sinovite, como também nos mecanismos que levam a perda óssea e destruição de cartilagens, que são complicações frequentes da artrite reumatoide (SWEENEY e FIRESTEIN, 2004).

A membrana sinovial que reveste as articulações tem uma espessura de duas a cinco camadas de células, disposta de uma rica vascularização. Apresenta-se como um tecido composto por duas camadas: uma camada superficial, de revestimento, denominada camada íntima ou camada de revestimento sinovial, e uma camada subíntima, localizada abaixo do revestimento e composta, principalmente, por tecido conjuntivo. A camada íntima apresenta uma espessura de normalmente uma a três células, sendo uma camada avascular e sem a presença de lâmina basal (ABRAMSON e PILLINGER, 2005).

A AR tem uma prevalência mundial em torno de 0,5 a 1,0% da população adulta, sendo que as mulheres são de duas a três vezes mais acometidas que os homens, ocorrendo em todas as regiões do mundo e em todas as etnias. A doença inicia-se geralmente em torno de 30 a 50 anos e cerca de 20% a 30% dos pacientes que não recebem tratamento tornam-se incapacitados para o trabalho de dois a três anos após o diagnóstico. No Brasil, a prevalência é similar à da população mundial, predominando na população do gênero feminino, com início após os 40 anos e com maior incidência na faixa dos 50 anos (GIBOFSKY, 2012; BLAY *et al.*, 2012; VOGELPOEL *et al.*, 2015).

A poliartrite visualizada na AR ocorre devido a uma sinovite mediada por respostas imunológicas (celular e humoral), e o distúrbio afeta, principalmente, as articulações periféricas de modo simétrico, iniciando pelas articulações dos dedos, mãos e pés, evoluindo para articulações maiores, como ombros e joelhos (ABBAS; LICHTMAN e PILLAI, 2008; KOURILOVITCH; GALARZA-MALDONADO e ORTIZ-PRADO, 2014).

Essa doença representa um importante impacto econômico e social uma vez que por ter um caráter progressivo leva ao desenvolvimento das deformidades e ao

comprometimento da capacidade funcional dos pacientes perturbando a saúde física e mental dos mesmos. Seu curso clínico pode se estender de algumas semanas a meses de desconforto até anos de incapacitação. O diagnóstico inicial pode ser confundido com outras doenças como espondilite, artrite psorática e lúpus (HOCHBERG *et al.*, 2003).

A patogenia da AR ainda é intensamente estudada devido à doença ser de origem multifatorial. Fatores hormonais, ambientais e imunológicos atuam em conjunto sobre indivíduos geneticamente suscetíveis, com manifestações ocasionadas a partir de diversos mecanismos inflamatórios (BALSA *et al.*, 2010). Acredita-se que a AR tem influências de fatores genéticos e ambientais (MACGREGOR *et al.*, 2000). Diversos genes já foram relacionados com o desenvolvimento da AR, sendo o sistema de histocompatibilidade humano (HLA: *human leukocyte antigens*) no *loci* DRB1 – que codifica as moléculas de histocompatibilidade presentes na superfície das células apresentadoras de antígenos – a principal associação genética, estando também associados ao desenvolvimento de formas mais graves da doença (STAHL *et al.*, 2010; USNAYO *et al.*, 2011).

A expectativa de vida desses pacientes pode decrescer cerca de três a dez anos dependendo da gravidade e da idade do paciente no início da doença. As causas mais comuns relacionadas com as mortes desses pacientes são doenças infecciosas e renais, as doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (AVIÑA-ZUBIETA *et al.*, 2008; GABRIEL e MICHAUD, 2009; HOOTMAN; HELMICK e BRADY, 2012; ZHANG *et al.*, 2010).

A fisiopatologia da AR é bastante complexa e parece ser iniciada quando o sistema imunológico adaptativo, tanto celular como humoral, reconhece antígenos que resultam em uma série de mecanismos inflamatórios efetadores distintos, incluindo o recrutamento de leucócitos (SILVA-JUNIOR e ROCHA, 2006; PINTO *et al.*, 2010). O espaço sinovial normalmente é acelular, no entanto em pacientes com AR, este fica infiltrado de células inflamatórias que liberam citocinas, sendo estas as principais responsáveis pela continuidade da resposta imune nessa condição (HARRIS, 1990).

A inflamação articular resulta em mudanças na membrana sinovial que podem comprometer a, há hiperplasia do revestimento sinovial, ativação das células endoteliais e proliferação dos vasos sanguíneos que são estimulados a produzir moléculas de adesão e quimiotaxinas que facilitam o influxo de mais células inflamatórias (FALEIRO, ARAÚJO e VARAVALLO, 2011).

Em seguida se inicia a ativação dos linfócitos T CD4+ que são células recrutadoras de antígenos indutores da artrite no tecido sinovial. Estes linfócitos liberam citocinas que resultam na ativação dos monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais que por sua vez secretam enzimas metaloproteinases (MMP) que estão envolvidas na erosão e degradação de ossos e cartilagens (HIRUMA-LIMA, 2012).

Os fibroblastos sinoviais ativados se proliferam desenvolvendo um tecido hiperplásico (*pannus*). Esse tecido proliferativo cresce invadindo a cartilagem, ativando os condrócitos e liberando enzimas proteolíticas que degradam o osso e a cartilagem. Adicionalmente há um aumento da permeabilidade vascular gerando aumento no fluido sinovial que resultam em erosão e destruição da articulação, do osso subcondral, dos tendões e ligamentos, levando a um quadro de dor e incapacitação (FERNANDES, 2008; FILIPPIN, 2008; KHURANA e BERNEY, 2005).

As células inflamatórias ativadas localmente liberam citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-8, TNF- α , IL-6 e IL-17) e prostaglandinas que são importantes autacoides e eicosanoides. A partir de neutrófilos e macrófagos, ocorre também aumento na liberação de mediadores como o óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs) (SWEENEY & FIRESTEIN, 2004).

As citocinas são peptídeos regulatórios que são produzidos potencialmente por todas as células, e somente algumas delas são constitutivamente expressas, como fator de necrose tumoral (TNF- α) em mastócitos (MAURER et al., 2003). Na presença de estímulos inflamatórios a expressão gênica dessas moléculas aumenta, e conseqüentemente, a produção de citocinas ocorre, o que leva à iniciação e amplificação da resposta inflamatória. Esses mediadores têm um importante papel na ativação das células sinoviais que resultam em inflamação e destruição óssea observada na artrite.

O TNF- α e a IL-1 são as principais citocinas envolvidas na inflamação e, uma vez liberadas, induzem a síntese de outras citocinas inflamatórias, de moléculas de adesão, ativação do metabolismo do AA, indução da resposta de fase aguda e ativação de células polimorfonucleares (ARENDA, 2001; THOMSON; LOTZE, 2003). Evidências sugerem que essas citocinas inflamatórias induzem a expressão de óxido nítrico sintase induzível (NOSi) e ciclo-oxigenase 2 (COX 2), resultando na produção de NO e de prostaglandina (PELLETIER *et al.*, 2000). A expressão dessas citocinas e enzimas são reguladas pela ativação do fator transcricional NFkB que está envolvido na patogenia da artrite reumatoide e outras doenças inflamatórias crônicas (ABRAMSON *et al.*, 2001).

A IL-1 é ainda responsável pela reabsorção óssea, pela inibição da síntese de colágeno e estimulação da proliferação de osteoclastos e fibroblastos (KLEIN & RAIZ, 1970; LORENZO, 1991; BOYCE *et al.*, 1989). O TNF- α também estimula os osteoclastos, induzindo a reabsorção óssea (BERTOLINI *et al.*, 1986; ABU-AMER *et al.*, 2000) e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-6) que continuam a cascata da inflamação (BRENNAN *et al.*, 1989).

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória encontrada no líquido sinovial inflamado em grandes quantidades. Esta citocina promove inflamação estimulando a produção de outras citocinas inflamatórias (por exemplo, IL-6, TNF- α e IL-1 β), estimula fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais e macrófagos a produzir outros mediadores inflamatórios envolvidos com a migração neutrofílica, erosão óssea e destruição tecidual (BEZERRA *et al.*, 2008; KELCHTERMANS *et al.*, 2009).

O óxido nítrico também parece estar envolvido na fisiopatologia da artrite, é um gás sintetizado a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) e penetra livremente nas membranas agindo como sinalizador e efetor molecular. A NOS pode estar expressa de forma constitutiva ou induzível. A forma constitutiva está expressa no neurônio e endotélio e produz pequenas quantidades de NO e essa produção está envolvida com a homeostase, como por exemplo a regulação da pressão arterial. Já a induzível está ativa principalmente em condições patológicas e possui papel importante na defesa do hospedeiro contra microrganismos e em processos tumorais. Através dessa enzima grandes quantidades de NO são produzidas (MONCADA *et al.*, 1991 e ROCHA *et al.*, 2002). Em pequenas

quantidades, o NO possui atividade protetora, mas em grandes quantidades na sinóvia inflamada ocorre a degradação da matriz cartilaginosa, apoptose de condrócitos e diminuição da proliferação óssea que contribuem para lesão articular (MOLLACE *et al.*, 2005).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) são definidas como qualquer espécie química altamente reativa que contém um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL & GUTRIDGE, 2006).

A formação de ERO e ERN é um evento constante nas células, acontece em decorrência do metabolismo normal e parecem ter papel fisiológico ou fisiopatológico a depender em parte da concentração e da espécie gerada (CNUBBEN, 2001; VALKO *et al.*, 2006). O estresse oxidativo é resultado de uma produção aumentada de ERO/ERN concomitante com uma redução de mecanismos antioxidantes celulares e isso ocasiona um desequilíbrio que leva essas moléculas a reagirem com lipídios, proteínas e com o DNA das células podendo ocasionar a um dano irreversível.

Em reações intensas e prolongadas como a AR, 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 do dano e ativação de osteoclastos (FILIPPIN *et al.*, 2008). O NO combinado com ânion superóxido também pode produzir peroxinitrito, que promove a apoptose dos condrócitos (BINGHAM, 2002).

Os fibroblastos sinoviais são células que estão relacionadas ao controle do volume do líquido sinovial. Em condições normais o aumento no volume deste líquido gera estresse na camada íntima o que resulta na redução da produção do hialuronano (substância que tem propriedades lubrificantes e imunomoduladoras) reduzindo dessa forma a pressão oncótica local e a retenção de plasma no líquido sinovial. No *pannus* reumatoide, ocorre uma falha nestes mecanismos gerando estresse mecânico na camada íntima sinovial (MOR; ABRAMSON e PILLINGER, 2005).

Os neutrófilos fazem parte da imunidade inata e são os primeiros tipos de células a chegar na inflamação. Eles migram para o líquido sinovial onde atuam liberando proteases e gerando sinais quimiotáticos atrativos para células dendríticas (CD) e monócitos. Além disso, os neutrófilos influenciam na diferenciação de macrófagos com a produção de TNF- α que também estimula proliferação e maturação dos linfócitos B. Essas células atuam na liberação de IFN- γ que atua na diferenciação das células T. Em seguida, as células T, células B e macrófagos infiltram a sinóvia e formam agregados linfoides, enquanto macrófagos e fibroblastos sinoviócitos causam hiperplasia de enzimas secretoras degradativas (NATHAN, 2006). Além disso os neutrófilos estimulam produção de IL-8 e anafilatoxina C5a no fluido sinovial que participam da atração de leucócitos para o interior da articulação, induzem a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enzimas proteolíticas que resultam na destruição da cartilagem (HARRIS, 1990; CHATHAM *et al.*, 1993).

Na AR o quadro inflamatório se agrava em função da produção de auto anticorpos resultando na formação de imunocomplexos. Os auto anticorpos reconhecem antígenos celulares, tais como colágeno do tipo II e PG ou ligam-se à porção Fc de imunoglobulinas da classe IgG, também conhecido fator reumatoide (FR) que possa estar presente no local. A região Fc realiza ativação de complemento pelos imunocomplexos pode ainda iniciar uma inflamação vascular com depósitos de FR em arteríolas, originando vasculites, cujo impacto negativo na qualidade e expectativa de vida do paciente é significativo (TURESSON e MATTESSON, 2009).

Além do colágeno tipo II, o proteoglicano agrecan é outro importante componente da cartilagem, conferindo esta propriedade de resistência à compressão, mantendo as moléculas de água nos tecidos. Na AR, há diminuição do agrecan na cartilagem, devido a ação das enzimas agrecanases (MILLER *et al.*, 2009).

O diagnóstico da AR engloba história clínica, exames físicos, imunológicos, hematológico e radiológicos (KHURANA; BERNEY, 2005). As principais características físicas são: inchaço nas mãos e limitação dos movimentos e fadiga. Exames como a pesquisa do fator reumatoide (FR) que é mais inespecífico e do auto anticorpo antipeptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP) que possui alta

especificidade (VAN VENROOIJ; VOSSENAAR; ZENDMAN, 2004). Os danos nas articulações que aparecem com o desenvolvimento da doença podem ser identificados em exames de ressonância magnética, ultrassom e raio X (TEH *et al.*, 2003).

Na terapia medicamentosa da AR são empregados os anti-inflamatórios esteroides (AIEs), as drogas modificadoras do curso da doença (DMARDs) e os anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs) (COSTA *et al.*, 2014).

Os AIEs ou glicocorticoides são fármacos cujo mecanismo envolve a ligação a proteínas receptoras intracelulares específicas: receptores esteroides, esteroide (vitamina D), hormônio tireoidiano, ácido retinoico, entre outros. O efeito induzido por esses fármacos pode ser resultado da interação direta sobre sequências de DNA específicas levando a uma transativação de genes de proteínas anti-inflamatórias ou, indiretamente, pela inibição dos fatores de transcrição de genes, como o NF κ B, que codificam mediadores inflamatórios como citocinas, moléculas de adesão e enzimas. Como consequência, ocorre supressão da produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão, por meio da inibição da função dos macrófagos e células apresentadoras de antígenos, inibição da degranulação dos mastócitos, redução da produção de prostaglandinas (PGEs) e leucotrienos pela redução da expressão do COX-2, entre vários outros efeitos que contribuem para as marcantes atividades anti-inflamatórias e imunossupressoras dessa classe. Embora sejam fármacos anti-inflamatórios eficazes, a sua administração crônica frequentemente resulta em reações adversas graves como elevação da glicose sérica e do glicogênio hepático; depressão da função tireoidiana, reprodutiva e da síntese de hormônios sexuais; interferência na absorção intestinal do cálcio antagonizando a ação da vitamina D; aumento da reabsorção de sódio e água, com retenção hídrica e elevação da pressão arterial; entre outras (SCHIMMER e FUNDER, 2011).

Os DMARDs incluem um diversificado grupo de pequenas moléculas, podendo ser agentes biológicos e não biológicos, sendo os mais comuns o metotrexato (MTX), a hidroxicloroquina e a sulfassalazina. O objetivo primário das terapias com esses medicamentos é preservar as funções das articulações, reduzindo ou prevenindo danos (BLUMBERG e FOX, 2001). Fármacos biológicos

inibem a produção de citocinas inflamatórias ou impedem a interação com os receptores. Sendo estes fármacos eficazes imunossupressores, existe o risco da ocorrência ou agravamento de infecções agudas ou crônicas ou reativação de infecções latentes, com consequências graves para o paciente (HAROON & INMAN, 2009; KUKAR *et al.*, 2009).

Um tipo de fármaco biológico que tem ganhado destaque são os agentes bloqueadores de TNF como forma de tratamento da AR. Infliximabe, adalimumab, golimumab entre outros são antagonistas do TNF. Já o Etanercept é um receptor solúvel de TNF (TNFR) compreendendo dois domínios extracelulares dos TNFR humano fundido com o fragmento da região constante da IgG1. Vale ressaltar que esses compostos têm eficácia terapêutica fortemente influenciada pelo uso concomitante com metotrexato. Agentes biológicos que inibem o TNF- α são considerados eficazes na redução da atividade e no retardamento do dano estrutural articular na Artrite Reumatoide, em especial nas formas refratárias aos tratamentos convencionais (FALEIRO *et al.*, 2011).

Os AINEs são anti-inflamatórios não esteroides que apresentam atividades antipirética, analgésica, contra o edema característico da inflamação. Entre os mecanismos de ação propostos para esses fármacos está a inibição das enzimas COX-1 e COX-2, que estão envolvidas na produção de mediadores inflamatórios como as PGEs. Entretanto, o seu uso requer cautela devido à possibilidade de ocorrência de reações adversas como úlceras gastrintestinais e dor epigástrica, lesões renais e eventos tromboembólicos (ROUBILLE *et al.*, 2015).

Os AINEs são medicamentos que podem ser utilizados na fase de investigação da doença e seu uso não costuma mascarar o processo inflamatório intenso observado na AR. Durante a evolução também podem ser utilizados, mas somente para melhorar sintomas de rigidez matinal, por exemplo. Não devem ser usados como a única droga, pois não evitam o aparecimento de erosões ósseas (TREVISANI; FIDELIX e APPENZELLER, 2011).

O aspecto financeiro, comorbidades e o histórico de eventos adversos do paciente devem ser levados em consideração na escolha do melhor AINE. Como os pacientes geralmente estão em uso de múltiplas medicações, a preferência é para

os inibidores seletivos ou específicos da COX₂, evitando assim efeitos colaterais do trato gastrointestinal (TGI). Os anti-inflamatórios não específicos também podem ser utilizados com eficácia similar, porém deve ser lembrado que no uso crônico é recomendada a associação de um protetor gástrico, como o omeprazol (TREVISANI; FIDELIX e APPENZELLER, 2011).

O tratamento da AR tem como objetivo prevenir ou controlar a lesão articular, prevenir a perda de função e diminuir a dor (BÉRTOLO *et al.*, 2007). No entanto, 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). Dessa forma é necessária a busca de novas substâncias que possam modular de forma mais eficaz essa doença trazendo uma melhor qualidade de vida para esses pacientes.

1.2. Dor inflamatória

Dor é definida pela IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor) como uma “*experiência sensorial ou emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial*”. Esta definição agrega à percepção da sensação dolorosa aspectos psicológicos, sociais, emocionais e ambientais. Isso ocorre porque a dor além de ser uma percepção dos estímulos nocivos quando receptores sensoriais são ativados (NOBACK *et al.*, 1996; LOESER; MELZACK, 1999), também envolve um componente emocional-afetivo incluindo atenção e aprendizagem (BONICA, 1990). Ferreira (2004) define dor como sendo, “uma sensação nociceptiva induzida em um tecido normal ou lesionado por estímulos físicos e/ou químicos de origem endógena e/ou exógena, assim como por disfunções patológicas e/ou psicológicas, cuja percepção causa emoções desagradáveis e/ou comportamentos aversivos”.

Segundo, Tauschke e colaboradores (1991), a dor apresenta caráter subjetivo e pode ser compreendida pela identificação de quatro categorias clínicas: nocicepção, percepção de dor, sofrimento e comportamento da dor. A partir daí faz-se necessário uma distinção entre dois termos importantes: nocicepção e dor. A nocicepção refere-se somente à percepção do sinal no sistema nervoso central

evocado pela ativação de receptores sensoriais especializados (nociceptores), provenientes de um tecido danificado (FÜRST, 1999). Por outro lado, a dor envolve tanto o componente sensorial, quanto o emocional que se relaciona com condições motivacionais, psicológicas bem como experiências de vida de cada pessoa que normalmente se associam aos quadros dolorosos (COUTAUX et al., 2005). A partir destes conceitos pode-se afirmar que a dor seria o termo mais adequado para o homem enquanto que nocicepção seria mais indicada para modelos experimentais com animais (NOBACK et al, 1996).

Para que ocorra a percepção dolorosa pelo sistema nervoso central é necessária a ativação de receptores sensoriais especializados chamados nociceptores, que são terminações nervosas livres de neurônios cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios das raízes dorsais e nos gânglios trigeminais (KANDEL et al., 2000). Estas estruturas possuem limiares de ativação específicos que os distinguem de outros tipos de receptores mecânicos e térmicos, uma vez que são excitáveis apenas por estímulos como calor nocivo, pressão intensa ou substâncias químicas irritantes, mas não por estímulos não nocivos como luz e toque (JULIUS e BASBAUM, 2001). Quando um estímulo doloroso é aplicado, a informação nociceptiva é convertida em potenciais de ação pelos nociceptores e transmitida pelos nervos espinais e cranianos à medula espinal ou tronco encefálico. Dessa forma, através das fibras aferentes primárias, que são os axônios dos nociceptores, ocorre a transmissão da informação nociceptiva da periferia para o cérebro (RANGE et al., 1996).

É frequente um processo inflamatório estar relacionado aos mecanismos que envolvem a nocicepção. A dor associada à inflamação é resultante de mudanças funcionais nos nociceptores. A sensibilização destes receptores é caracterizada pela redução do limiar de excitabilidade necessário para ativá-lo, além do aumento da atividade espontânea da célula nervosa e aumento na frequência de disparo em resposta a estímulos supralimiais (REIDEL e NEECK, 2001).

A sensibilização dos nociceptores é resultado da liberação de mediadores químicos por vários tipos celulares residentes e migratórios no local da lesão tecidual. Enquanto, alguns mediadores atuam sensibilizando os nociceptores, ou seja, diminuindo o limiar de ativação, como as prostaglandinas (PG), prostaciclina

(PGI), as aminas simpáticas e os leucotrienos (LTs), outros ativam diretamente os nociceptores, como, por exemplo, serotonina, histamina e bradicinina, causando imediata manifestação da dor (ARMSTRONG et al., 1957; SICUTERI et al., 1965; FERREIRA, 1972; WHALLEY et al., 1987; FLÓREZ, 1993).

Todas as funções essenciais dos nociceptores dependem de canais iônicos (CATERINA et al., 199; MCCLESKEY & GOLD, 1999), que são proteínas localizadas na membrana da célula que seletivamente medeiam transporte transmembranar de íons específicos, ou moléculas. Os canais iônicos são canais ativados pelo calor, dependentes de capsaicina, de trifosfato de adenosina, canais de sódio voltagem, entre outros (CESARE & MCNAUGHTON, 1996; NAGY e RANG, 1999 a, b; BURNSTOCK, 1996; BURNSTOCK e WOOD, 1996; HILLIGES et al, 2002; WAXMAN et al., 1999).

Estudos demonstram que estímulos lesivos provocam respostas precoces consideradas reações de alarme nas quais, células residentes, como macrófagos e mastócitos, desempenham papel crucial. Essas células sinalizam para outras células a existência de lesão tissular, via liberação de citocinas, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas (ILs). Neste contexto, as citocinas parecem constituir um elo entre a lesão celular e o reconhecimento dos agentes estranhos com a liberação de mediadores inflamatórios responsáveis pelo desenvolvimento de sinais e sintomas locais ou sistêmicos (FERREIRA, 1980).

Em resumo, a dor de origem inflamatória resulta essencialmente da sensibilização dos neurônios sensoriais primários (FERREIRA, 1972). Esse efeito parece ser resultado de eventos não neuronais residentes que recrutam células imunes que são responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios (IL-1 β , TNF- α , IL-6 entre outros) que atuam diretamente no nociceptor (VALÉRIO et al., 2009). E pela ativação de vias de sinalização intracelular, tais como monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), proteína quinase A (PKA) e proteína quinase C (PKC) (ALEY & KAVINE, 1999; KHASAR et al., 1999). Estas vias de sinalização resultam em fosforilação subsequente dos canais de sódio dependentes de voltagem (GOLD, LEVINE e CORREA, 1998) e inibição dos canais de potássio dependentes de voltagem (EVANS, VASKO e NICOL, 1999). Assim, por esses mecanismos o limiar é

reduzido, o que leva a um aumento de excitabilidade neuronal (CUNHA et al., 2008; ZARPELON et al., 2013).

A hiperalgesia é detectada em modelos experimentais como uma redução no limiar nociceptivo. Os modelos de nocicepção que utilizam diferentes agentes como zymosan, carragenina e etc para indução, permitem relacionar a quantificação direta do fenômeno inflamatório com hipernocicepção (GUERRERO et al., 2013). Tendo em vista que a dor inflamatória é resultado do aumento da excitabilidade das fibras sensoriais nociceptivas periféricas produzido pela ação de mediadores inflamatórios, esses modelos reproduzem efeitos que se assemelham aos encontrados na clínica.

1.3 Artrite induzida pelo zymosan (Zy)

Diversos modelos foram descritos com o objetivo de induzir artrite em animais, tentando-se chegar às características mais próximas da AR. Um modelo hipotético ideal deveria ter achados clínicos, histológicos e radiológicos semelhantes à artrite reumatoide, ser de fácil indução, custo baixo e boa reprodutibilidade e confiabilidade. Deve ainda responder a medicamentos de forma semelhante a AR, ter parâmetros imunológicos e de atividade capazes de serem medidos (OLIVER & BRAHN, 1996). Dessa forma, nenhum modelo utilizado hoje é capaz de atender a todas essas exigências, embora todos tenham características que se aproximam razoavelmente do objetivo pretendido.

O Zy é um polissacarídeo derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae* e sua injeção intra-articular promove sinovite erosiva grave. Na fase aguda ocorre aumento de permeabilidade vascular e migração celular. A seguir, desenvolve-se sinovite com infiltrado mononuclear e reação fibroblástica lembrando a sinovite crônica que caracteriza o pannus reumatoide (WILLMENT et al., 2003).

Originalmente, a artrite induzida por zymosan foi descrita por Keystone, em 1977. É um agente indutor de intensa reação inflamatória quando injetado na pele, articulação ou na cavidade peritoneal, por mecanismos múltiplos, incluindo ativação da via alternativa do sistema complemento, degranulação de mastócitos, estimulação de macrófagos e neutrófilos com liberação de mediadores inflamatórios

(TADIMETI et al., 1994; AJUEBOR et al., 1998; COATES & MCCOLL, 2001; KOLACZKOWSKA et al., 2001).

O zymosan é reconhecido pelo receptor delectina 1 que é expresso em células de defesa como os monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (WILLMENT, 2003), após o reconhecimento, este polissacarídeo interage com receptor toll-like (TLR2), presente na superfície celular. Em seguida ocorre a ativação do fator NFkB, seguida da produção de citocinas pró-inflamatórias e expressão de moléculas co-estimulatórias (TAYLON et al., 2002). Esse polissacarídeo também estimula a liberação da anafilatoxina C5a, através da ativação da via alternativa do complemento, com acúmulos de neutrófilos e ativação de monócitos (SZABO et al., 1995). A injeção de zymosan na cavidade articular resulta no aumento da permeabilidade vascular levando a edema local e ainda acentuado influxo celular com predomínio de polimorfonucleares (PMN). A quantidade de células é máxima na sexta hora após a indução (ROCHA et al., 2003).

Um estudo sobre a fase crônica do modelo, demonstrou que até 28 dias após a injeção do zymosan a sinovite persiste, havendo formação de células gigantes, ao lado de intensa proliferação linfomonocitária na sinóvia. As células gigantes podem ser observadas a partir dos 14 dias de artrite e a extensão da sinovite lembra o pannus reumatoide, levando à lise da cartilagem articular e do osso subcondral (ROCHA et al., 1999).

Adicionalmente, outro trabalho mostrou que após 21 dias de indução da AZy em ratos ainda há um intenso infiltrado mononuclear, proliferação de fibroblastos, presença de células gigantes, neovascularização, perda de proteoglicanos da cartilagem articular e erosão do osso subcondral (BEZERRA et al., 2004). Foi demonstrado também a participação do NO nesse modelo experimental, através do aumento dos níveis de nitrito nos exsudatos articulares, com o bloqueio dessa participação pela administração de inibidores de NOS, quer inespecíficos, quer seletivos para NOSi, administrados profilática (30 min antes do Zy) ou terapêuticamente (2 horas pós Zy), local ou sistemicamente (ROCHA et al., 2002).

A inflamação articular induzida por zymosan (Zy) no joelho de ratos é caracterizada por produção de mediadores nociceptivos que resultam no desenvolvimento de hiperalgesia (ROCHA et al., 1999).

Em resumo, o zymosan, quando administrado por via intra-articular induz artrite com pico de hipernocicepção entre a terceira e quarta horas, com aumento significativo da permeabilidade vascular a partir da terceira hora levando ao intenso edema local. Também a partir da terceira hora há um influxo celular significativo que se torna máximo na sexta hora (ROCHA et al, 1999; ROCHA et al., 2004).

1.4 Látex e Plantas laticíferas

O látex é um fluído presente em muitas plantas e em algumas espécies de fungos dos gêneros *Lactarium* e *Peziza* (KONNO, 2011). Na maioria das vezes tem aspecto leitoso, no entanto pode apresentar coloração amarelada ou alaranjada como em plantas pertencentes à família Papaveraceae, marrom-amarelado em plantas do gênero *Cannabis*, ou pode ser límpido como em *Nerium oleander* (KEKWICK, 2001). É armazenado dentro de células ou fileiras de células especializadas denominadas laticíferos, e é exsudado quando a planta sofre algum tipo de injúria, seja por dano mecânico ou por ataque de predadores (MOURSY, 1997).

Considerando o aspecto anatômico dos laticíferos, existem dois tipos distintos que podem ser observados: os laticíferos articulados os quais são formados por células sequenciais interconectadas por perfurações em suas paredes celulares e os laticíferos não articulados, formados por uma única célula alongada que se desenvolve nos espaços intercelulares e, eventualmente, se ramifica nos tecidos das plantas de um modo similar às hifas de fungos (AGRAWAL; KONNO, 2009).

O látex contém uma grande variedade de substâncias tais como carboidratos, lipídeos e proteínas (MORCELLE *et al.*, 2004). Neste fluido também já foram encontrados metabólitos secundários tais como alcaloides, cardenolídeos, compostos fenólicos, terpenos, taninos e flavonoides (KONNO, 2011).

Dentre a grande variedade de proteínas já identificadas no látex de plantas temos beta-1,3-glucanases (CHEYE; CHEUNG, 1995), lisozimas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) (GIORDANI & LAFON, 1993), lectinas, quitinases (JEKEL *et al.*, 1991), amilases (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1987), inibidores de proteinases (ARCHER, 1983; SRITANYARAT *et al.*, 2006), oxidases (AGRAWAL;

KONNO, 2009) dentre outros. Mais de 110 plantas produtoras de látex distribuídas em diferentes famílias são conhecidas por apresentar atividade proteolítica. Estas são pertencentes à classe das proteinases cisteínicas, serínicas e aspárticas (DOMSALLA; MELZIG, 2008).

Existem várias hipóteses sobre a real função do látex para a planta, e entre estas podemos citar: excreção de resíduos do metabolismo, cobertura de tecido danificado e defesa da planta contra o ataque de predadores (KONNO, 2011). Entre estas hipóteses, a mais aceita é a de que o látex serve prioritariamente para a defesa da planta contra herbívoros e patógenos, que é evidenciado, principalmente, pela presença de proteínas relacionadas à defesa contra esses organismos, como as glucanases e quitinases (VAN LOON; VAN STTRIEN, 1999) e inibidores de proteinases (SRITANYARAT *et al.*, 2006).

Os canais laticíferos podem estar presentes em todas as partes da planta ou, apenas, em tecidos ou órgãos restritos. O látex poder ser extraído a partir do caule (*Hevea brasiliensis*), tubérculos (*Manihot glaziovii*), folhas (*Calotropis procera*), galhos (*Plumeria rubra*) ou do fruto (*Achras sapota*, *Carica papaya*).

O processo de coleta do látex não é igual para todas as plantas, por exemplo a extração de látex de *Hevea brasiliensis* ocorre através de incisões realizadas em seu tronco, o látex de *Calotropis procera* é coletado a partir de extremidades foliares, enquanto que na *Plumeria rubra* este fluido é abundante apenas nas extremidades dos seus galhos, não sendo possível coletar látex a partir de sua porção lenhosa.

Dentre a grande variedade de plantas que compõem o Reino Vegetal, mais de 35.000 espécies de plantas exsudam látex, resinas e exsudatos, e mais de 20.000 espécies de plantas com flores em mais de 40 famílias são consideradas plantas laticíferas (KONNO, 2011).

Em geral, as plantas laticíferas são mais frequentemente encontradas em clima tropical, representando 12,2% das famílias e 14,0% das espécies deste clima. Enquanto no clima temperado elas representam apenas 4,9% das famílias e 5,9% das espécies (KONNO, 2011).

Plantas comuns do nosso cotidiano são laticíferas, tais como o jasmim (*Plumeria rubra* L.), hortências (*Calotropis procera*) e o sapoti (*Achras sapota*). Entre as famílias produtoras de látex destacam-se *Euphorbiaceae* e *Apocynaceae*, embora

existam outras famílias que produzem tais como: *Papaveraceae*, *Moraceae*, *Convolvulaceae*, *Asteraceae*, *Araceae*, *Alliaceae* e *Musaceae*. (KONNO, 2011).

Dentre a diversidade de plantas laticíferas, a mais conhecida é a seringueira (*Hevea brasiliensis*), uma árvore nativa da Amazônia. A borracha produzida por esta planta é amplamente utilizada pela indústria (SUSSMAN *et al.*, 2002) e como esse látex é intensamente explorado, a maior parte dos estudos bioquímicos já desenvolvidos com fluidos laticíferos se refere ao látex desta planta. Atualmente, têm crescido o interesse de se estudar os fluidos laticíferos de espécies vegetais, por estes apresentarem propriedades bioquímicas consideravelmente interessantes, como por exemplo: *Papaver somniferum*, *Cannabis sativa* e *Calotropis procera* (HAGEL *et al.*, 2008).

A *Calotropis procera* é uma planta amplamente estudada por nosso grupo de pesquisa, e nesse contexto, diversos trabalhos foram publicados utilizando proteínas do látex dessa planta (Ramos *et al.*, 2004).

O primeiro estudo realizado para investigar propriedades farmacológicas de LP foi por Alencar *et al.* (2004). Foi demonstrado que LP administrada por via intravenosa foi capaz de reduzir o processo inflamatório nos modelos experimentais de peritonite e edema de pata induzidos por carragenina e cistite hemorrágica por ciclofosfamida em camundongos. Importante atividade antinociceptiva da fração proteica foi demonstrada em modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, lambadura da pata induzida por formalina e placa quente (SOARES *et al.*, 2005).

Em estudo feito com subfrações LPPI, LPPII e LPPIII, isoladas a partir de LP, demonstrou-se que as três subfrações tiveram efeitos anti-inflamatórios na peritonite por carragenina, além de reduzirem o rolamento e adesão de leucócitos, sendo estes efeitos mais significativos em animais tratados com LPPI, possivelmente relacionado com o significativo aumento de óxido nítrico (NO) no sangue causado por esta subfração em animais com inflamação (RAMOS *et al.*, 2009).

LP também apresentou diminuição da hiperalgesia em modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freud (KUMAR *et al.*, 2011). Em modelos de infecção bacteriana sistêmica induzida por *Samonela Typhimurium* em camundongos, LP demonstrou efeito benéfico aumentando o tempo de sobrevivência

dos animais, efeito este, relacionado com a modulação de citocinas (TNF- α , IL1- β e IL-12), óxido nítrico e uma atividade imunoestimulante (OLIVEIRA et al., 2012; LIMA-FILHO et al., 2010). Neste mesmo modelo de infecção bacteriana, um estudo mostrou o efeito significativo da fração proteica (LP) e das suas subfrações (LPPI, LPPII e LPPIII) em manter a homeostase da coagulação sanguínea em animais sépticos. LP foi capaz de aumentar a contagem de plaquetas e o tempo de coagulação nos animais infectados, estando este último efeito demonstrado também pelas subfrações LPPII e LPPIII além de apresentarem atividades proteolíticas semelhantes à trombina e plasmina, importantes enzimas da coagulação sanguínea. A LPPI, subfração desprovida de atividade proteolítica, não mostrou efeito semelhante às demais (RAMOS et al., 2012).

Fração proteica do látex demonstrou efeito anticonvulsivante (LIMA et al., 2012), cicatrizante quando adicionada a uma membrana de álcool polivinílico (FIGUEREDO et al., 2014; RAMOS et al., 2016), anti-inflamatório em modelo de inflamação na pata de animais (KUMAR et al., 2015) e de redução dos efeitos indesejados do irinotecano (dano tecidual, reação inflamatória e diarreia) em animais (ALENCAR et al., 2016). Frações derivadas do látex de *C. procera* também apresentaram efeito de redução da temperatura corporal de ratos com febre (KUMAR et al., 2017).

1.5 *Plumeria rubra*

Plumeria rubra L. é uma planta laticífera que pertence à família *Apocynaceae*. Conhecida popularmente como jasmim, jasmim-manga, *frangipani* ou árvore-pagode, é originária da América Central e encontra-se amplamente distribuída pelas regiões de clima tropical do mundo, inclusive no Brasil (BROWN, 2008). Tem sido amplamente utilizada na medicina popular para tratamento de sífilis, como purgativo e no combate da febre (KARNODO et al., 1990). Devido à beleza e perfume de suas flores, o Jasmim é facilmente encontrado como planta ornamental em praças e jardins de muitas regiões metropolitanas (**FIGURA 1**).

O nome do gênero, *Plumeria*, é uma homenagem ao botânico que a descreveu, Charles Plumier. Trata-se de uma árvore, com ramificações bifurcadas, espessas de aspecto suculento, de 6-8 metros de altura. Com folhas decíduas, aglomeradas no ápice dos ramos. Possui inflorescência terminal, com numerosas flores sucessivas, perfumadas na espécie típica, vermelhas ou róseas com o centro

amarelo (BROWN, 2008). Quanto ao seu cultivo, apresenta fácil multiplicação por estacas (LORENZI; SOUZA, 1999).

Estudos com *P. rubra* têm sido feitos no sentido de investigar as propriedades farmacológicas dessa planta. Um estudo publicado por Hamburguer e colaboradores (1991) mostrou que compostos isolados do cerne de *P. rubra* apresentaram efeitos moluscicida, citotóxico e antibacteriano. Outro estudo feito com compostos extraídos casca de *P. rubra* demonstrou atividade antifúngica, antálgica e antibacteriana (KUIGOUA *et al.*, 2010).

Um trabalho realizado por KHAN e colaboradores (2015) mostrou que o extrato metanólico da casca de *P. rubra* tem o efeito de reduzir a temperatura corporal de coelhos com febre, já extrato das flores, quando dados por via oral a camundongos, apresentou significativo efeito ansiolítico (CHATTERJEE *et al.*, 2013).

O extrato metanólico das folhas dessa planta apresentou atividade antimicrobiana (EGWAIKHIDE, 2009), anticâncer (BANU *et al.*, 2011), antioxidante e hipocolesterolêmica *in vitro* (RAHMAN *et al.*, 2014). Já o extrato metanólico das flores apresentou atividade antimicrobiana (EGWAIKHIDE, 2009).

Um glicosídeo flavônico isolado de *P. rubra* mostrou ter atividade antioxidante e hipolipidêmica (BEGUM *et al.*, 2010) e o extrato orgânico apresentou efeito inibitório contra o fungo *Fonsecaea pedrosoi* (GAITÁN *et al.*, 2011).

Estudos fitoquímicos com o látex de *P. rubra* demonstraram que ela possui muitos iridoides, um metabólito secundário monoterpênico. Estes iridóides demonstraram possuir atividade algicida, antibacteriana e citotóxica contra linhagens de células de leucemia linfocítica (P-388) e contra células de vários tipos de câncer humano (mama, cólon, fibrossarcoma, pulmão e melanoma). (KARNODO *et al.*, 1990).

Quanto ao látex de *P. rubra*, no que se refere à atividade enzimática, é uma fonte de atividade lipolítica (CAMBON *et al.*, 2006) e proteolítica (CHANDA *et al.*, 2011). Um trabalho desenvolvido por FREITAS e colaboradores (2010) mostrou que proteínas isoladas do látex de *P. rubra* apresentam atividade antioxidante e proteolítica *in vitro* e outro estudo mostrou que proteases isoladas do látex dessa planta apresentam atividade anti-inflamatória e cicatrizante (CHANDA *et al.*, 2011).

Um trabalho de GABAN e colaboradores (2013) demonstrou que uma fração do látex de *Plumeria rubra* apresentou efeito antihipertensivo e vasodilatador na aorta de ratos.

Outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisa demonstrou uma fração proteica não dialisável do látex de *P. rubra* (PrLP) reduziram de forma significativa a úlcera gástrica induzida pelo etanol em camundongos, esse efeito parece se dar através da ativação da via NO/GMPc/Katp (ALENCAR *et al.*, 2015).

Adicionalmente PrLP parece não apresentar efeito tóxico uma vez que essa fração foi avaliada em abordagem de toxicidade subcrônica na dose de 50 mg/kg e.v. Esse tratamento não provocou alterações macroscópicas e de peso úmido dos órgãos avaliados (rim, coração, fígado e baço). Parâmetros de função renal (ureia) e hepática (AST e ALT) não foram alterados, bem como o número de leucócitos circulantes, quantidade de plaquetas e peso corpóreo dos animais (PINHEIRO, 2012).

Apesar desses relatos tanto essa planta quanto seu látex, ainda são pouco estudados no que diz respeito aos seus aspectos bioquímicos e farmacológicos, e não existem, de acordo com pesquisa bibliográfica realizada, estudos relacionados ao uso desse látex com propósitos aplicados.

FIGURA 1 - Aspecto geral da planta *Plumeria rubra*



A: Árvore; B: Inflorescência; C: Flor; D: Ápice Caulinar. Fonte: BROWN, 2008.

2. JUSTIFICATIVA

A artrite é uma doença que leva a incapacitação com redução da qualidade de vida dos pacientes. Essa condição resulta em uma dificuldade na realização de atividades corriqueiras tanto pessoal como profissional gerando um impacto econômico importante para o paciente e para a sociedade (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2002). Sua etiologia permanece desconhecida, no entanto, já se sabe que fatores genéticos, ambientais e infecciosos tem papel importante no desenvolvimento dessa doença. A terapia se baseia no uso de várias classes de medicamentos, não existindo um específico e eficiente para tratamento e/ou cura dessa enfermidade e isso resulta em um alto gasto financeiro e na não resolução definitiva do problema causando prejuízo para a saúde do paciente.

O uso de produtos naturais vem sendo uma alternativa para tratamento de enfermidades devido ao fácil acesso, baixo custo e a ampla utilização na medicina popular. Além disso a descoberta de fontes naturais e compostos farmacológicos com consequente uso de fitoterápicos podem ter resultados econômicos positivos uma vez que possibilita o desenvolvimento científico regional e ajuda na conservação das plantas devido à importância científica. O conhecimento tradicional do uso de produtos naturais contribui de forma importante para o desenvolvimento de drogas terapêuticas utilizadas atualmente pela medicina; entretanto, este potencial é ainda largamente inexplorado (CALIXTO et al, 2000; WALKER, 2010).

Apesar do seu uso na medicina popular, a *Plumeria rubra* ainda é pouco estudada, já foi demonstrado efeito antihipertensivo e antiulcerogênico das proteínas do seu látex, entretanto ainda não há trabalhos publicados demonstrando atividade anti-inflamatória sistêmica e antinociceptiva em modelos animais que simulem achados clínicos.

Sabendo-se que a atividade gastroprotetora das proteínas laticíferas de *Plumeria rubra* tem participação de NO, canais de K⁺ ATP dependentes (ALENCAR et al., 2015) e essa via está bem relacionada com a analgesia periférica acreditamos que seria válido a investigação do efeito anti-inflamatório e antinociceptivo em modelo de artrite reumatoide, uma vez que a dor é o principal sintoma incapacitante nesses pacientes. As proteínas de *P. rubra* (PrLP) também apresentaram efeito

antioxidante no modelo de úlcera gástrica (ALENCAR et al., 2015), tendo dessa forma um potencial efeito benéfico na artrite reumatoide, visto que nessa doença há o desencadeamento de stress oxidativo. Adicionalmente, PrLP parece não apresentar efeitos tóxicos, uma vez que foi feita a toxicidade aguda e não se observou alterações nos parâmetros avaliados (PINHEIRO, 2012).

Dessa forma, acreditamos que as proteínas do látex de *P. rubra* possuem potencial farmacológico e podem modular a resposta inflamatória e a dor na artrite reumatoide.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito de uma fração proteica não dialisável isolada do látex de *Plumeria rubra* (PrLP) na artrite induzida por zymosan em camundongos. Para tanto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Estudar o efeito de PrLP sobre o influxo celular através da contagem total e diferencial de células e atividade da mieloperoxidase (MPO);
- Estudar o efeito de PrLP sobre o edema pela medição do diâmetro transversal da articulação e pela avaliação da permeabilidade vascular utilizando azul de evans;
- Avaliar o envolvimento de PrLP sobre a liberação de mediadores inflamatórios (NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10);
- Avaliar o processo inflamatório e dano sinovial através do padrão histológico no tecido articular;
- Avaliar a expressão de TNF- α , IL-1 β , COX-2 e do fator transcricional NF κ B no tecido articular;
- Investigar o efeito de PrLP sobre o estresse oxidativo através da dosagem de glutathiona (GSH) e malonaldeído (MDA);
- Estudar o efeito antinociceptivo de PrLP na artrite induzida por zymosan e o seu envolvimento com sistema opioide endógeno e com inibição da enzima óxido nítrico sintase induzível;
- Investigar seu mecanismo de ação nos modelos de hipernocicepção plantar induzidas por prostaglandina e carragenina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) fêmeas, 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 (82/2014).

4.2 Drogas e reagentes

Anticorpo biotilado de interleucina 1 (Dako);

Anticorpo biotilado de TNF- α (Dako);

Anticorpo biotilado de interleucina 6 (Dako);

Anticorpo biotilado de interleucina 10 (Dako);

Dexametasona (Aché);

Diclofenaco sódico (Eurofarma)

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); 38

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 Surrer);
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

O látex utilizado neste estudo foi coletado de espécimes de *Plumeria rubra* L. (Jasmim) cultivados no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará ou de exemplares existentes em praças ou jardins residenciais na cidade de Fortaleza.

Coletas em campo foram realizadas semanalmente, no período da manhã, e preferencialmente antes das nove horas, pois foi observado que, à medida que se aproxima do pico solar, a liberação de látex pela planta é diminuída.

O látex foi extraído da planta através da incisão do ápice caulinar. O fluido exsudado foi coletado em tubos do tipo Falcon contendo água destilada, na proporção de 1:2 (v/v). Este procedimento foi normalmente adotado porque o látex sofre um processo natural de coagulação, adquirindo uma característica colante. A coleta do látex em água tem a finalidade de diminuir este efeito e evitar a formação de flocos de borracha, os quais podem aprisionar substâncias solúveis. O processamento do látex foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais da Universidade Federal do Ceará, coordenado pelo Prof. Dr.

Márcio Viana Ramos de acordo com metodologia descrita por RAMOS e colaboradores (2009).

No laboratório, a amostra foi submetida à centrifugação a 5000 x g por 10 min, a 4°C. Este procedimento inicial propiciou a precipitação parcial da parte insolúvel do látex, a borracha. Essa fração foi denominada de BL (Borracha do Látex), a qual foi separada. O sobrenadante foi dialisado por 1 hora contra o mesmo volume de água destilada, ou seja, respeitando a relação de 1:1 (v/v). Ao término desse período a fração dialisável (dialisato) foi coletada e o saco de diálise com o sobrenadante foi transferido para outro recipiente, onde foi dialisado exaustivamente contra água destilada por 72 horas, a 4°C. O material resultante foi novamente centrifugado e o sobrenadante obtido, contendo a fração proteica do látex, foi liofilizado. Nas diálises foram utilizadas membranas com capacidade para retenção de moléculas com massa molecular superior a 8 kDa. Dessa maneira, o dialisato era então, constituído de moléculas menores que 8 kDa, provavelmente íons, metabólitos secundários e/ou peptídeos. Esta fração foi denominada de DL (Dialisato do Látex). O sobrenadante final liofilizado resultou em uma fração livre de borracha e rica em proteínas solúveis, e foi por isso denominada de Proteínas do Látex de *Plumeria rubra* – PrLP.

Um trabalho feito por Araújo (2009) com as proteínas do látex de *P. rubra* (PrLP) realizou a caracterização bioquímica dessa fração. Cada amostra de 5 ml de látex (sem adição de água) é composta por 70% de massa seca, enquanto que, aproximadamente 15% são proteínas e os 15% restantes são metabólitos de baixa massa molecular. O teor de proteínas solúveis no látex, determinados pelo método de Bradford é em média 0,33 mg/ml. Adicionalmente não foi evidenciado presença de lectinas clássicas na fração PrLP (ARAÚJO, 2009).

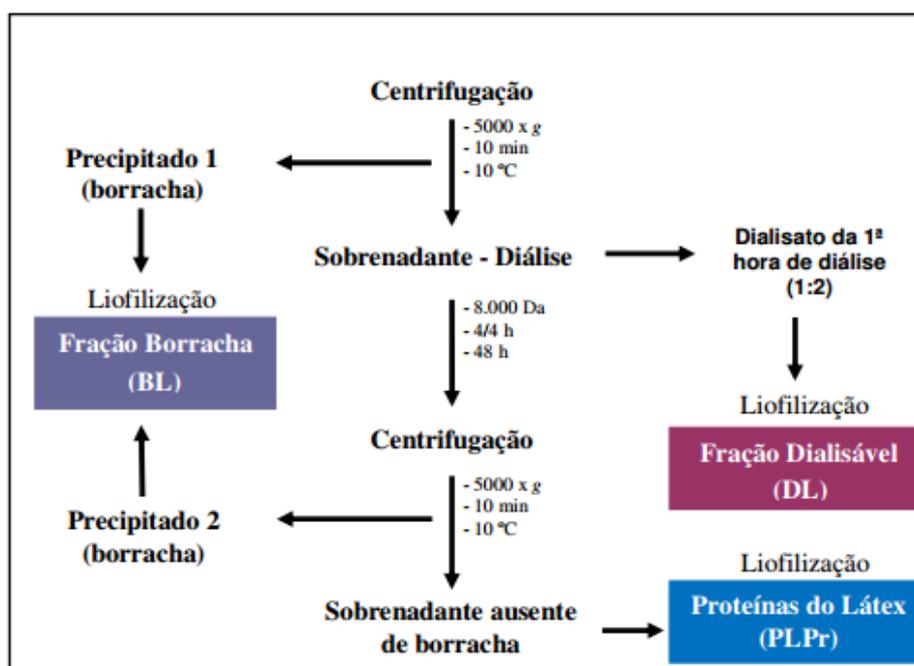
A fração proteica quando submetida a uma cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100 apresenta três picos distintos com separação regular das proteínas ao longo das frações coletadas. O primeiro composto proteínas observadas nas raias 44-46, enquanto que o segundo pico se refere a uma suave banda proteica observada na raia 66. As frações 55 e 57 encerraram o perfil proteico distinto daqueles observados nas raias anteriores, com bandas bem evidentes de massas moleculares aproximadas de 22 e 35 kDa. Foi inferido que esse último pico

deve ser composto por moléculas não proteicas, como pigmentos (**FIGURA 3**) (ARAÚJO, 2009).

A eletroforese unidimensional revelou que PrLP exhibe grande quantidade de proteínas com massas moleculares variando de 15 e 58 kDa, com uma banda mais evidente de massa em torno de 26 kDa (**FIGURA 3**) (ARAÚJO, 2009).

O perfil eletroforético bidimensional (2-DE) da fração de PrLP apresentou uma concentração bastante evidente de proteínas ácidas com massas moleculares em torno de 26 kDa, evidenciou-se um total de 118 spots proteicos com massas moleculares variando entre 12,2 e 117,4 kDa. Esses dados foram posteriormente checados por espectrometria de massas, confirmando as massas moleculares observadas por eletroforese (ARAÚJO, 2009).

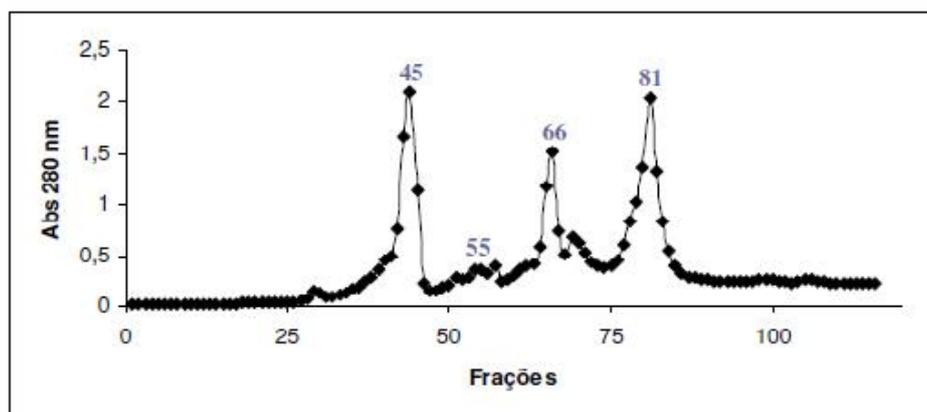
FIGURA 2 – Esquema de fracionamento de do látex de *Plumeria rubra*



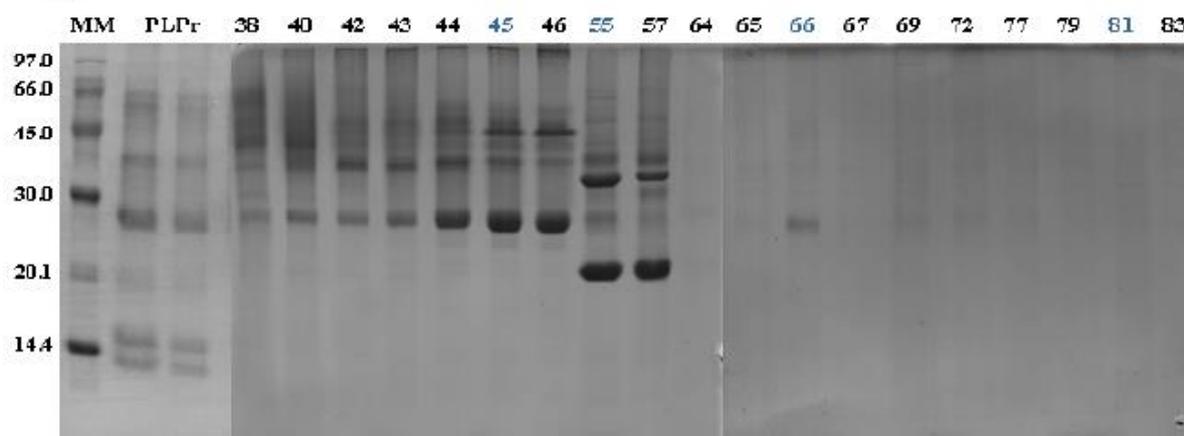
Fonte: Araújo, 2009.

FIGURA 3 – Perfil cromatográfico (A) e eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% (B) das subfrações sequenciais de PrLP recuperadas durante a cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-100.

A



B



Fonte: Araújo, 2009.

4.5 Indução da artrite por zymosan

Camundongos foram submetidos à indução da artrite através da injeção intra-articular (i.a), no joelho direito, de zymosan dissolvido em solução salina estéril (0,1 mg/animal; 10 µL), utilizando seringa de 1ml e agulha 8 x 0,3 mm. O grupo veículo recebeu somente salina no joelho direito. Após 6 horas da administração do zymosan, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical (KEYSTONE et al., 1977).

4.6 Coleta do lavado articular

Após a indução da artrite conforme item 4.5, procedeu-se a lavagem da cavidade articular do joelho com 10 µL de salina contendo EDTA 10mM em PBS através da membrana sinovial. Em seguida, retirou-se o exsudato articular por aspiração e o lavado coletado foi diluído em salina estéril com EDTA para obtenção de 100 µL. Por fim, o mesmo foi centrifugado (500G/10 min), o sobrenadante aliquoteado e conservado para posterior análise da migração celular (contagem total e diferencial de leucócitos), dosagem de citocinas, mieloperoxidase (MPO), óxido nítrico e enzimas do stress oxidativo.

4.7 Grupos Experimentais e Tratamentos

As doses de proteínas do látex de *Plumeria rubra* utilizadas foram 12,5; 25, 50 e 100 mg/kg de peso de animal por via endovenosa. Os tratamentos com PrLP foram feitos uma hora após a administração do estímulo inflamatório, como droga padrão utilizou-se a Dexametasona na dose de 2 mg/kg pela via e.v. uma hora antes do agente flogístico. O grupo veículo recebeu apenas salina (i.a.) e o grupo controle recebeu somente o zymosan (i.a.). Nos experimentos foram utilizados 6 animais por grupo.

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. 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 (OLIVEIRA et al., 2015).

4.9 Contagem diferencial de leucócitos

Após a retirada de alíquotas para contagem total do número de leucócitos o lavado articular foi centrifugado (1500 rpm, 10 min, 4°C). O *pellet* celular foi suspenso novamente em 200 μ L de solução de PBS e EDTA. Em seguida, as lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação (1500 rpm, 10 min) de uma alíquota do lavado articular (50 μ L). As lâminas então foram colocadas por 4 min no fixador e foram coradas com eosina (30 seg) e hematoxilina (20 seg). Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente e colocadas para secagem. Por fim, precedeu-se a contagem diferencial das células do exsudato articular. As células foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva em imersão em óleo (aumento de 100x). Foram então contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se os tipos celulares em: neutrófilos, linfócitos, macrófagos e mastócitos. O número de neutrófilos presentes no lavado articular foi obtido através da porcentagem dessas células (contagem diferencial) e da quantidade total de células presentes no lavado articular. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos x 10⁶/ml (OLIVEIRA et al., 2015).

4.10 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). A artrite foi induzida conforme item 4.5 e o lavado articular foi coletado e centrifugado a 4.500 rpm, durante 10 min a uma temperatura de 4° C e o sobrenadante foi colhido.

O sobrenadante obtido foi transferido para um eppendorf e submetido ao choque térmico em três etapas de congelamento e descongelamento (-20°C; 10 minutos cada). O sobrenadante foi novamente homogeneizado e centrifugado (1500xg; 15 min a 4°C) para melhor remoção de contaminantes. Em seguida, as amostras foram plaqueadas (duplicatas de 7µL em placas de 96 poços) e adicionado 200µL da solução de leitura (5mg O-dianisidine; 15µL H₂O₂ 1%; 3mL tampão fosfato; 27mL H₂O). A leitura da absorbância foi obtida a 450nm (t₀=0 min e t₁=1 min) em leitor de ELISA. Os resultados foram expressos como UMPO/µL de lavado.

4.11 Avaliação do edema na articulação

Para avaliar o efeito de PrLP sobre o edema induzido por zymosan foram utilizadas duas abordagens: a medida do diâmetro articular e permeabilidade vascular por extravasamento de azul de evans na articulação após a indução da artrite (item 4.5).

4.11.1 Medida do diâmetro articular

Um dos métodos de avaliação do edema na articulação do joelho é a mensuração do diâmetro transversal do joelho desafiado com zymosan (OLIVEIRA et al., 2015). A artrite foi induzida conforme item 4.5 e um paquímetro digital (Digimatic Caliper, Mitsutoyo Corporation, Japão) foi utilizado para medir o edema, a medida foi feita 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 mensuração do diâmetro do joelho foi realizada por um segundo pesquisador. 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).

4.11.2 Permeabilidade vascular por extravasamento de azul de evans

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 o azul de Evans ter alta afinidade de ligação às proteínas (albumina) do plasma. Normalmente, as proteínas plasmáticas 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.

A artrite foi induzida conforme item 4.5 e o azul da evans (25mg/kg; e.v.) foi injetado uma hora antes da eutanasia. Os tecidos obtidos a partir de cada articulação do joelho foram pesados, e a concentração de azul de Evans nas amostras foi estimada utilizando uma técnica de extração, onde o tecido é colocado em uma solução de formamida (1 ml) em tubos de vidro e 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 imediatamente antes da realização da leitura.

4.12. Histopatológico

A artrite foi induzida conforme item 4.5 e após a eutanásia, o tecido articular foi removido cirurgicamente, fixado em formol a 10% durante 24 horas. Posteriormente foi desidratado e, então, incluído em parafina. As lâminas foram confeccionadas e coradas por hematoxilina-eosina e avaliadas ao microscópio óptico. A análise histopatológica foi avaliada de acordo com critério anteriormente estabelecido 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, edema, comprometimento da membrana sinovial e hemorragia (ROCHA et al., 2008 - adaptado).

Foi realizada ainda, a contagem diferencial de neutrófilos nas células presentes no tecido articular diferenciando-as em: neutrófilos, linfócitos, macrófagos e mastócitos. O resultado foi expresso no percentual (%) de neutrófilos presentes no tecido em relação ao total de 100 células.

4.13 Determinação dos níveis de nitrito no lavado articular

A determinação de NO_2^- e NO_3^- baseia-se na reação do NO_2^- com uma amina primária aromática em meio ácido para formar um sal de diazônio, que por sua vez reage com um composto aromático formando um azo-composto (reação de Griess), que absorve na região do visível do espectro eletromagnético (ELLIOT; PORTER, 1971). O íon NO_3^- é determinado, geralmente, como íon NO_2^- , após redução pela enzima nitrato redutase.

Nesse ensaio a artrite foi induzida conforme item 4.5 e o lavado articular foi coletado e centrifugado (1500 x g; 15 minutos) para obtenção do sobrenadante. O sobrenadante foi plaqueado (placas de 96 poços) em duplicata (80 μL de cada amostra) e incubado em uma solução (0,04 mL de nitrato redutase, NADPH, KH_2PO_4 e água destilada) por 12 horas para que o NO_3^- das amostras fosse convertido em NO_2^- . No dia subsequente, uma curva-padrão de referência de NO_2^- foi preparada e plaqueada a partir de uma diluição seriada de uma solução de NaNO_2 . Foram adicionados 80 μL da solução de Griess (1% de sulfanilamida em 1% H_3PO_4 / 0,1%

de N-1-nafitiletenodiamina dihidrocloro/água destilada/1:1:1:1) em cada poço. A coloração púrpura/magenta foi medida em leitor de ELISA com filtro de 540 nm. Os valores obtidos para as amostras experimentais foram plotados com curva padrão e expressos em μM de NO_2/NO_3 .

4.14 Dosagem de citocinas no sobrenadante do lavado

A determinação da concentração de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α) no lavado articular foi realizada nos animais com artrite induzida por Zy (item 4.5). Placas de 96 poços foram incubadas por 12h a 4°C com anticorpo anti-IL-1 β , 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 290 μL de BSA para o bloqueio e estas foram incubadas por 1h a 4°C. Após o bloqueio, foram lavadas e 100 μL das amostras foram adicionadas, a curva padrão também foi adicionada em várias diluições e incubada por 2h a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas com anticorpo monoclonal biotilado anti-IL-1 β , 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 foi adicionado. Decorridos 20 minutos, o reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD, 100 μL) foi adicionado e as placas foram incubadas na ausência de luz a temperatura ambiente por 20 min.

A reação enzimática foi interrompida com 50 μL de H_2SO_4 (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. (CUNHA et al., 1993).

4.15 Imunohistoquímica para COX-2, TNF- α , NOSi e NFkB

A imunohistoquímica foi realizada através do método estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). A artrite foi induzida conforme item 4.5 e após a

eutanásia dos animais, o tecido sinovial foi removido cirurgicamente, fixado em formol a 10% durante 24 horas, posteriormente desidratado e incluído em parafina. Foram confeccionadas lâminas apropriadas para o ensaio. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1M (pH 6), sob aquecimento em forno micro-ondas por 18 minutos para que ocorra a recuperação antigênica. Após o resfriamento realizado deixando as lâminas 20 minutos em temperatura ambiente, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (15 minutos). Os cortes foram incubados durante a noite (4°C) com o anticorpo primário de coelho anti-TNF, anti-NOSi, anti-COX-2, anti-NFkB diluídos 1:200 em PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS-BSA).

No dia seguinte foi realizada a lavagem seguida da incubação com o anticorpo secundário (detecção) biotilado anti-IgG de coelho, diluído 1:200 em PBS/BSA, por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estreptoavidina peroxidase conjugada por 30 minutos.

Em seguida foi feita outra lavagem com PBS, coloração com o cromógeno 3,3'diaminobenzidina-peróxido (DAB), seguida por contra-coloração com hematoxicilina de Mayer. Por fim foi realizada a desidratação das amostras e montagem das lâminas para análise das mesmas. As análises semi-quantitativas foram feitas através do programa Image J (NIH, EUA).

4.16 Dosagem de malonaldeído (MDA) no tecido articular

Malonaldeído (MDA) é um aldeído formado pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos. Sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica que consiste na ação de radicais livres nos fosfolipídios da membrana celular, causando ruptura da membrana celular, mutações no DNA e ativação da via do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) (FEITOSA et al., 2012).

Para quantificar a produção de radicais livres em amostras de tecido articular, o teor de MDA foi medido conforme descrito a seguir. A artrite foi induzida conforme item 4.5 e o tecido articular foi coletado. As amostras foram trituradas em

homogeneizador Politron Ultra-Turrax, utilizando-se 1 mL de EDTA 0,02M para cada 100 mg de tecido, sob refrigeração, em seguida foi adicionado tampão tris HCL 20 mM na proporção de 1:5 à amostra. Após homogeneização, sob refrigeração, os tubos foram centrifugados (2500 rpm, 10 min, 4°C) e 300 µl do sobrenadante foi adicionado a 750 µl do reativo cromogênico (1-metil-2-fenilindol 10.3 mM em acetonitrila + 225µl HCL 37% - na capela de exaustão) e o material foi incubado durante 40 minutos à 45°C em banho maria. Foi realizada nova centrifugação (2500 rpm, 5 min, 4°C) e retirado 300 µL da amostra para realizar leitura. A absorbância foi determinada a 586 nm e os valores obtidos foram expressos em nmol/g de tecido (GERARD-MONNIER et al., 1998).

4.17 Dosagem de glutathiona (GSH) no tecido articular

A glutathiona (GSH) é um antioxidante hidrossolúvel reconhecido como o mais importante componente endógeno dos grupos sulfídricos não proteicos (NP-SH) do organismo e atua protegendo as células contra toxinas como as EROs. Os compostos sulfidrilos ligam-se aos radicais livres formados durante o processo inflamatório (FEITOSA et al., 2012).

A concentração de GSH foi avaliada pelo ensaio para determinação GSH (SEDLAK e LINDSAY, 1968). A artrite foi induzida conforme item 4.5 e o tecido articular foi coletado. As amostras foram trituradas em homogeneizador Politron Ultra-Turrax, utilizando-se 1 mL de EDTA 0,02M para cada 100 mg de tecido, sob refrigeração. Alíquotas de 400 µL do homogenato foram adicionadas a 320 µL de água destilada e 80 µL de ácido tricloroacético 50% (TCA) para a precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados (3000 rpm, 15 min, 4°C) e alíquotas de 400 µL do sobrenadante foram adicionadas a 800 µL de tampão Tris 0,4 M, pH 8,9 e 20 µL de ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) e agitados por 3 minutos no agitador de tubos. A absorbância foi determinada imediatamente após o acréscimo do DTNB, em 412 nm. A concentração de GSH no tecido articular foi expressa como mg/g de tecido.

4.18 Avaliação do efeito antinociceptivo de PrLP na artrite induzida por Zymosan

A intensidade de hipernocicepção induzida pela administração intra-articular de zymosan foi avaliada pelo limiar de sensibilidade de cada animal a um estímulo mecânico produzido pela pressão gradual exercida por um filamento rígido acoplado a um aparelho que registra a pressão em gramas exercida na ponta desse filamento, utilizando-se o *Von Frey* eletrônico, como descrito por Pinto *et al.*, (2010).

No *Von Frey* eletrônico, utiliza-se de um anestesímetro eletrônico que é composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas (g). Os animais são colocados em caixas de acrílico, medindo 12x10x17 cm cujo assoalho é uma rede de malha igual a 5 mm² constituída de arame não maleável, durante 10 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Espelhos são posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização das plantas das patas dos animais.

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. 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 consecutivas. Os animais foram submetidos à análise da sensibilidade dolorosa nos tempos 0, 1, 3 e 6 horas após a indução da artrite por zymosan.

Para a investigação do mecanismo de ação foi realizada uma abordagem utilizando naloxona (1 mg/kg; e.v.) ou L-arginina (1 g/kg; i.p.) meia hora antes de PrLP para investigar o seu efeito sobre receptores opioides e sobre a enzima óxido nítrico sintase (ROCHA *et al.*, 2011).

A intensidade de hipernocicepção foi quantificada através da variação da pressão aplicada na pata (Δ limiar de estímulo em gramas). O delta foi obtido a partir da subtração do valor medido antes dos tratamentos (medida basal – T0) e após administração dos estímulos e droga teste.

4.19 Avaliação do efeito de PrLP na hipernocicepção mecânica plantar induzida pela Carragenina (Cg) e Prostaglandina E₂ (PGE₂)

No sentido de melhor caracterizar o efeito antinociceptivo de PrLP, investigamos também seu efeito em modelos de hipernocicepção mecânica induzida por Cg e PGE₂.

Estímulo inflamatório como a carragenina (Cg) induzem a hipernocicepção de forma indireta através da liberação de uma cascata de citocinas pró-inflamatórias e posterior aumento da migração de neutrófilos que promovem, após diapedese, a liberação de outros mediadores hiperalgésicos amplificando ainda mais o processo doloroso (LEVINE et al., 1994). Já a prostaglandina é um mediador que ativa diretamente os nociceptores e são bastante importantes na transmissão nociceptiva (CUNHA et al., 2005).

Foi utilizado o método de pressão crescente na pata dos animais através do Von Frey eletrônico, uma versão modificação por Cunha e colaboradores (2004) da versão descrita por Frey em 1896.

Nesse experimento utilizou-se o equipamento Von frey já descrito anteriormente e ao transdutor foi adaptada uma ponteira com área 0.05 mm² que estimula diretamente a pata. O experimentador é treinado a aplicar a ponteira em ângulo reto na região central da pata traseira do animal com uma pressão gradualmente crescente, o qual provoca uma resposta de flexão característica com retirada da pata (comportamento nociceptivo “flinche”). O estímulo é interrompido após a observação da resposta característica, descrita acima. Foram realizadas três medidas distintas para cada animal, sendo calculada a média aritmética destes valores.

Como estímulo inflamatório foi utilizada a carragenina (Cg - 300 µg/pata de animal) ou a prostaglandina E₂ (PGE₂ -100 ng/pata), PrLP (25 mg/kg; e.v.) foi utilizada uma hora após a administração do agente inflamatório e como droga padrão foi utilizada a indometacina (5 mg/kg; i.p). A medida da hipernocicepção foi feita no tempo 0, 1, 3 e 5 horas após a administração de Cg e no tempo 0 e 3 horas após a administração da PGE₂. Em ambos os casos salina foi utilizada como veículo. A intensidade de hipernocicepção foi quantificada através da variação da

pressão aplicada na pata (Δ limiar de estímulo em gramas) conforme descrito anteriormente.

4.20 Análise Estatística

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

5. RESULTADOS

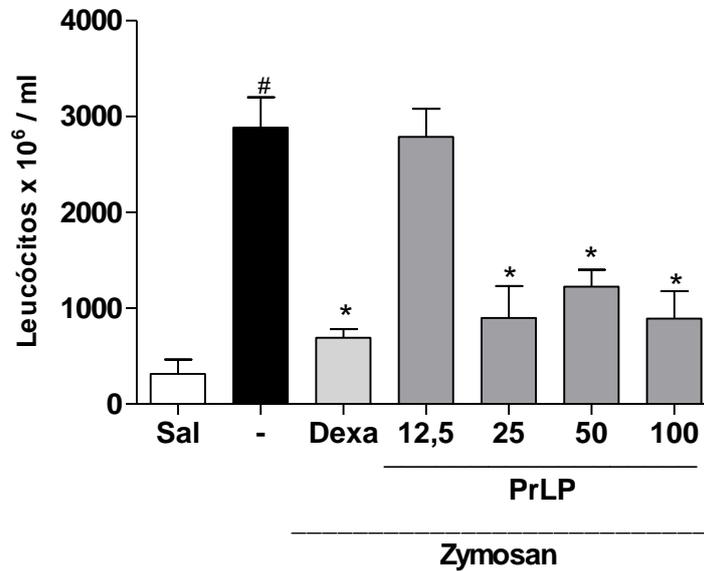
5.1 PrLP reduz o influxo celular de leucócitos totais e neutrófilos na artrite induzida por zymosan em camundongos

Os animais que receberam apenas o zymosan i.a. (Zy), apresentaram um aumento significativo no influxo celular na sexta hora ($2886 \times 10^6 / \text{ml} \pm 158,5$) quando comparado com os animais que receberam apenas salina ($314,1 \times 10^6 / \text{ml} \pm 75,4$). O grupo pré-tratado com Dexametasona (2 mg/kg; e.v.) demonstrou redução significativa de 76% ($692,4 \times 10^6 / \text{ml} \pm 40,41$) do influxo leucocitário induzido pelo Zy. Apresentando efeito estatisticamente semelhante à droga padrão, o pós-tratamento com PrLP (25, 50 e 100 mg/kg; e.v.) reduziu de forma significativa o influxo celular com percentuais de 68,82%, 57,55% e 69,16% ($899,8 \times 10^6 / \text{ml} \pm 148$; $1225 \times 10^6 / \text{ml} \pm 89,59$; $890 \times 10^6 / \text{ml} \pm 165,7$), respectivamente. O grupo PrLP 12,5 mg/kg (e.v.) ($2787 \times 10^6 / \text{ml} \pm 132,2$) não apresentou diferença significativa quando comparados ao grupo Zy ($2886 \times 10^6 / \text{ml} \pm 158,5$) **(FIGURA 4A)**.

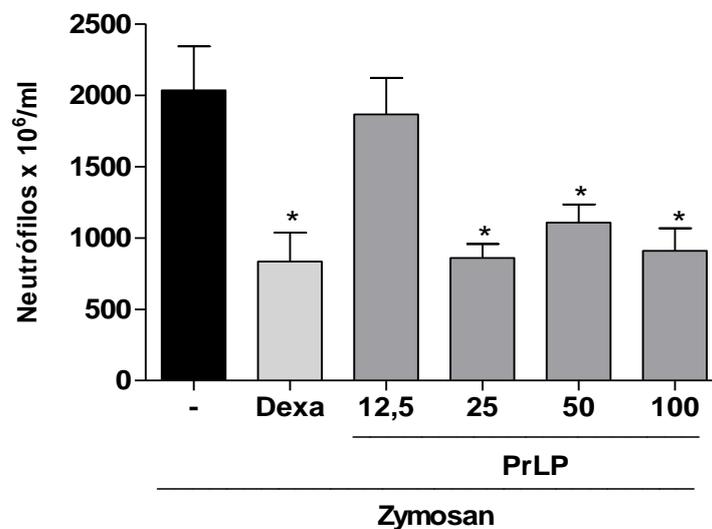
Na contagem diferencial de leucócitos, foi observado que os animais que receberam apenas o Zy, apresentaram um aumento significativo no influxo de neutrófilos na sexta hora após a indução da artrite ($2035 \pm 306,5$). O grupo pré-tratado com Dexametasona (2 mg/kg; e.v.) inibiu significativamente esse efeito de Zy em 59,01% ($834 \pm 201,4$). De forma semelhante a droga-padrão, PrLP reduziu significativamente o quantitativo de neutrófilos no lavado articular em 57,72% ($860,3 \pm 97,57$) para a dose de 25 mg/kg.; de 45,55% ($1108 \pm 127,6$) para 50 mg/kg e de 44,6% ($908,7 \pm 159,9$) para 100 mg/kg. A dose de 12,5 mg/kg ($1866 \pm 256,2$) de PrLP não apresentou diferença significativa quando comparados ao grupo não tratado **(FIGURA 4B)**.

FIGURA 4 – PrLP reduz o influxo celular na artrite induzida por zymosan em camundongos

A



B

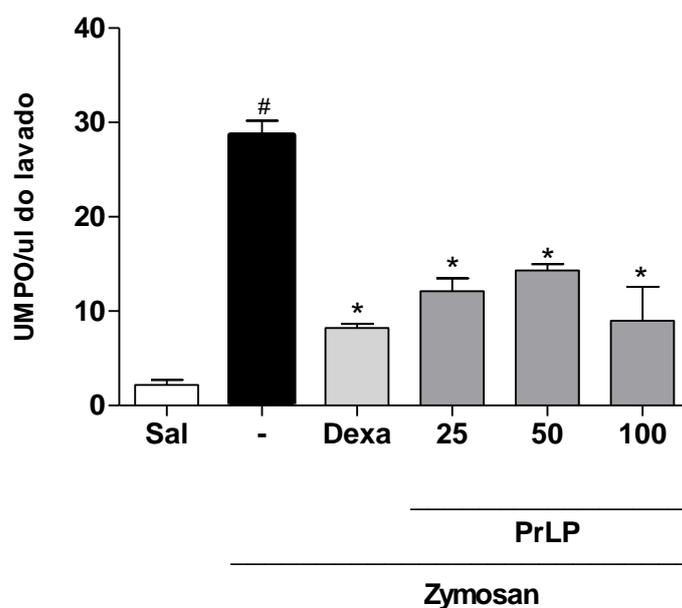


O influxo celular foi avaliado através da contagem de leucócitos total e diferencial no lavado articular em animais tratados com PrLP 12,5; 25, 50 e 100 mg/kg (e.v.) 1 hora após e dexametasona 2 mg/kg (e.v) ou salina (e.v) meia hora antes da administração do Zy. O grupo salina recebeu apenas salina (i.a.). Os resultados representam a média \pm e.p.m. do número de células em $\times 10^6$ /ml de lavado articular (n=6 animais por grupo). A: leucócitos totais B: neutrófilos polimorfonucleares *p<0,05 em relação ao grupo Zy #p<0,05 em relação ao grupo salina (ANOVA, seguido do teste de Newman-keuls).

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

Os animais que receberam apenas Zy i.a. apresentaram um aumento significativo da atividade da MPO ($28,6 \pm 1,5$ UMPO/ml) quando comparado com o grupo que foi tratado apenas com salina ($2,17 \pm 0,5$ UMPO/ml). O grupo pré-tratado com Dexametasona (2 mg/kg; e.v.) reduziu em 71,3 % ($8,2 \pm 0,4$) a atividade dessa enzima quando comparado com o grupo Zy. Apresentando efeito estatisticamente semelhante à droga padrão, o pós-tratamento com PrLP (25, 50 e 100 mg/kg; e.v.) reduziu a atividade da mieloperoxidase (MPO) no lavado articular em 57,6%, 50% e 68,8% ($12,1 \pm 1,3$; $14,3 \pm 0,6$ e $8,9 \pm 3,5$ UMPO/ml, respectivamente) quando comparado ao grupo não tratado (**FIGURA 5**).

FIGURA 5 - PrLP reduz a atividade da mieloperoxidase (MPO) na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos



A atividade da MPO foi avaliada no sobrenadante do lavado articular dos animais tratados com PrLP 25, 50 e 100 mg/kg (e.v) 1 horas após e dexametasona 2 mg/kg (e.v) ou salina (e.v) meia hora antes da administração do Zy. O grupo salina recebeu apenas salina (i.a.). Os resultados representam a média \pm e.p.m. de UMPO/ μ L de lavado articular (n=6 animais por grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Zy # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina (ANOVA, seguido do teste de Newman-keuls).

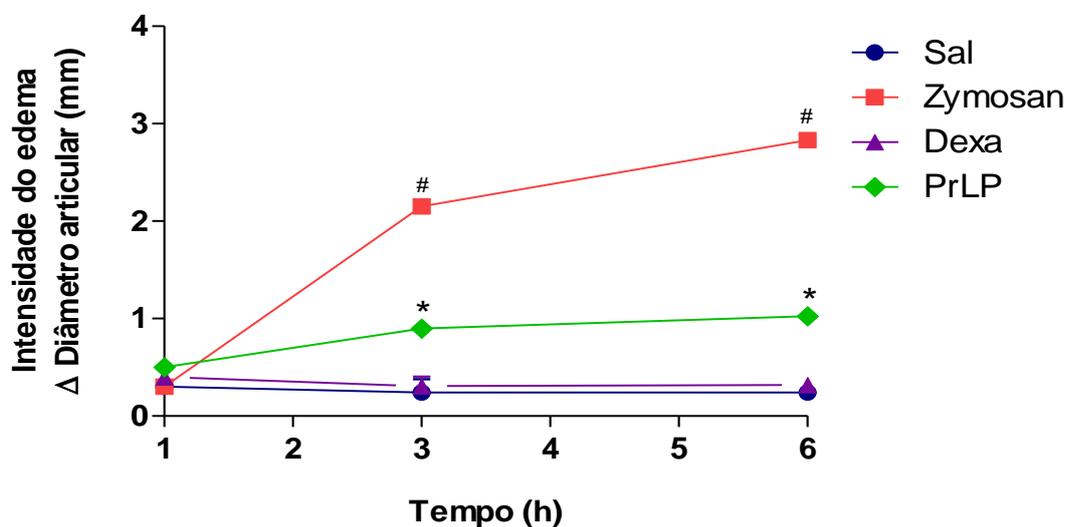
5.3 PrLP reduz o edema na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

O edema foi avaliado através da medida do diâmetro articular e pelo método de extravasamento de Azul de Evans nos animais com artrite induzida por Zy. Na primeira abordagem os animais que receberam apenas Zy i.a. apresentaram aumento significativo nas medidas da articulação tanto na terceira (2,15 mm \pm 0,02) quanto na sexta hora (2,8 mm \pm 0,01) após a indução quando comparado com o grupo que foi tratado apenas com salina (0,24 mm \pm 0,03 e 0,26 \pm 0,04, respectivamente). O grupo pré-tratado com Dexametasona (2 mg/kg; e.v.) reduziu significativamente o diâmetro articular em 86% na terceira (0,3 mm \pm 0,03) e de 88,9% na sexta hora (0,31 mm \pm 0,02) após indução da artrite. Os animais que receberam PrLP (25 mg/kg; e.v.) apresentaram redução significativa de 58,6% na medida da terceira (0,89 mm \pm 0,01) e 64,6% na da sexta hora (0,99 mm \pm 0,02) quando comparado ao grupo Zy. **(FIGURA 6A).**

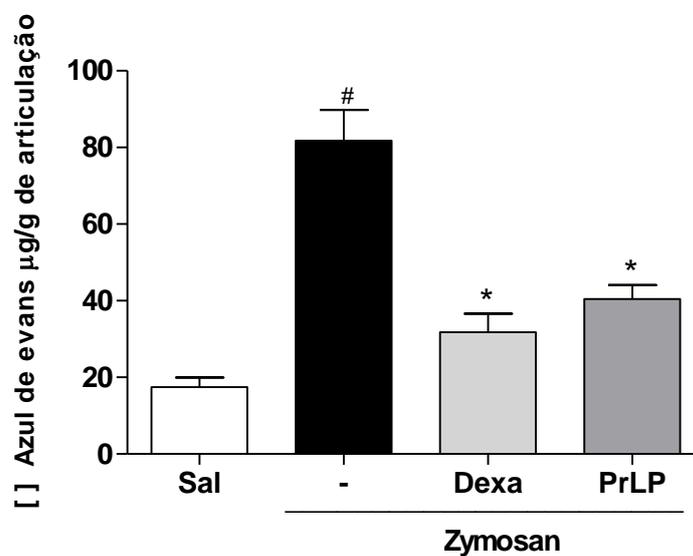
Na abordagem com utilização do azul de evans, os animais que receberam apenas Zy i.a. apresentaram um aumento significativo na permeabilidade vascular (81,81 \pm 7,92 μ g/g) quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina (17,4 \pm 2,4 μ g/g). O grupo pré-tratado com Dexametasona (2 mg/kg; e.v.) reduziu de forma significativa a permeabilidade em 61,15% (31,78 \pm 4,8 μ g/g) quando comparado ao grupo Zy. Apresentando efeito estatisticamente semelhante à droga padrão, o pós-tratamento com PrLP (25 mg/kg; e.v.) reduziu significativamente em 50,5% (40,46 \pm 3,6 μ g/g) a permeabilidade vascular quando comparado ao grupo não tratado **(FIGURA 6B).**

FIGURA 6 - PrLP reduz o edema na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

A



O edema na articulação dos camundongos foi avaliado através da medida do diâmetro articular dos animais tratados com PrLP 25 mg/kg (e.v) 1 hora após e dexametasona 2 mg/kg (e.v) ou salina (e.v) meia hora antes da administração do Zy. O grupo salina recebeu apenas salina (i.a.) 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<0,05 em relação ao grupo salina (ANOVA, seguido do teste de Newman-keuls).

B

O edema na articulação dos camundongos foi avaliado através da concentração de azul de evans extravasado na articulação de animais tratados com PrLP 25 mg/kg (e.v) 1 hora após e dexametasona 2 mg/kg (e.v) ou salina (e.v) meia hora antes da administração do Zy. O grupo salina recebeu apenas salina (i.a.). Os resultados representam a média±e.p.m. do diâmetro da articulação em mm (n=6 animais por grupo) *p<0,05 em relação ao grupo Zy #p<0,05 em relação ao grupo salina (ANOVA, seguido do teste de Newman-keuls).

5.4 PrLP reduz o processo inflamatório na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

No ensaio histopatológico os animais que receberam apenas Zy i.a. exibiram significativo processo inflamatório na articulação com a observação de denso infiltrado inflamatório 3(3-3), edema 1(1-2), comprometimento da membrana sinovial 3(2-3) e hemorragia 1(1-1) quando comparado ao grupo salina. O grupo pré-tratado com dexametasona (2 mg/kg; e.v.) reduziu de forma significativa os parâmetros avaliados quando comparado ao grupo zymosan (**TABELA 1**).

Foi possível verificar uma redução significativa do processo inflamatório no grupo que recebeu o tratamento com PrLP (25 mg/kg; e.v.) pois os animais tratados apresentaram leve infiltrado inflamatório 1,5(1-2) e edema 0(0-1), redução do comprometimento da membrana sinovial 1(0-1) e da hemorragia 0(0-1) quando comparados ao grupo Zy e esse efeito foi estatisticamente semelhante ao da dexametasona (**TABELA 1 e FIGURA 7**).

Adicionalmente, foi realizada a contagem diferencial de células na sinóvia de camundongos com artrite por zymosan. Os animais que receberam apenas Zy i.a. apresentaram aumento significativo de infiltrado inflamatório com predominância de neutrófilos ($88,67 \pm 4,9$ %) quando comparado com o grupo que foi tratado apenas com salina ($33,25 \pm 4,2$ %). O grupo pré-tratado com Dexametasona (2 mg/kg; e.v.) reduziu significativamente a migração de neutrófilos ($51 \pm 5,4$ %) quando comparado com o grupo Zy. Apresentando efeito estatisticamente semelhante à droga padrão, o pós-tratamento com PrLP (25 mg/kg; e.v.) reduziu significativamente a migração de neutrófilos para a sinóvia ($54 \pm 2,5$ %) (**FIGURA 8**).

TABELA 1 -PrLP reduz o processo inflamatório da membrana sinovial na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos.

Grupos	Infiltrado inflamatório	Edema	Comprometimento da membrana sinovial	Hemorragia
Salina	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Zymosan	3 (3-3) [#]	1 (0-2) [#]	3(2-3) [#]	1 (1-1) [#]
Dexametasona	2(1-2)*	0 (0-1)*	1(0-1)*	0 (0-1)*
PrLP	1,5 (1-2)*	0 (0-1)*	1(0-1)*	0 (0-1)*

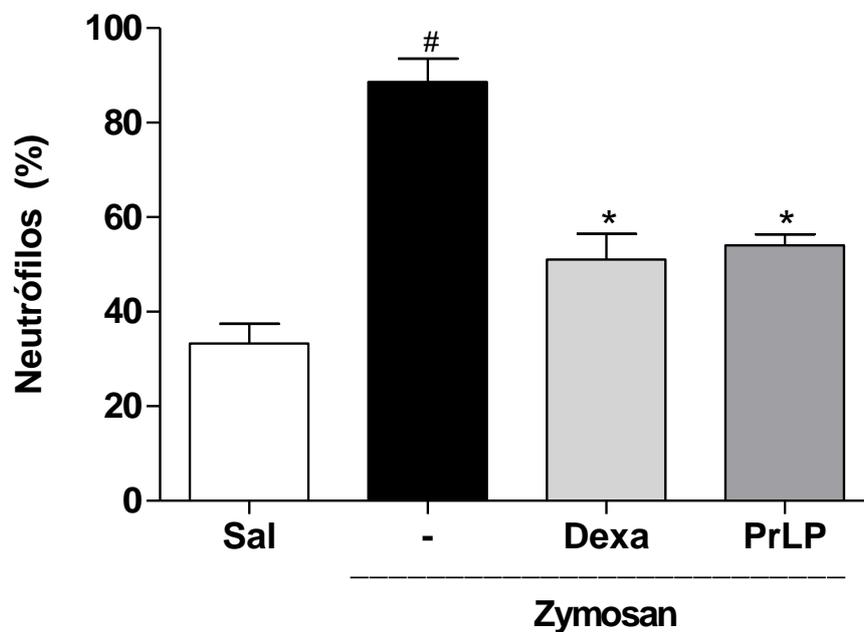
O padrão histológico da membrana sinovial foi avaliado através da análise histológica de lâminas coradas pelo método hematoxilina-eosina da membrana sinovial em animais tratados com PrLP 25 mg/kg (e.v) 1 hora após e dexametasona 2 mg/kg (e.v) ou salina (e.v) meia hora antes da administração do Zy. O 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). *p<0,05 em relação ao grupo Zy #p<0,05 em relação ao grupo salina.

FIGURA 7- Representação histológica da membrana sinovial na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

D

Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas pelo método hematoxilina-eosina de membrana sinovial de animais que tiveram a artrite induzida por zymosan e que foram tratados com PrLP 25 mg/kg (e.v) 1 hora após e dexametasona 2 mg/kg (e.v) ou salina (e.v) meia hora antes da administração do Zy. O grupo salina recebeu apenas salina (i.a.) A (salina); B (zymosan); C (PrLP); D (dexametasona): aumento de 100 vezes e E (salina), F (zymosan); G (PrLP); D (dexametasona): aumento de 400 vezes.

Figura 8 - PrLP reduz o número de neutrófilos na sinóvia de animais com artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos



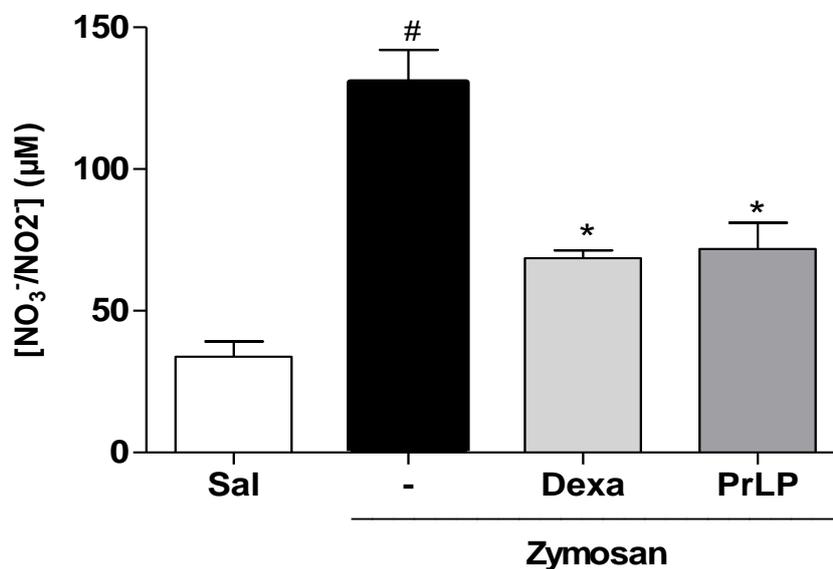
O influxo celular foi avaliado através da contagem diferencial na sinóvia de animais tratados com PrLP (25 mg/kg; e.v.) 1 hora após e dexametasona 2 mg/kg (e.v) ou salina (e.v) meia hora antes da administração do Zy. O grupo salina recebeu apenas salina (i.a.). Os resultados representam a média \pm e.p.m. do percentual de neutrófilos (%) a cada 100 células (n=6 animais por grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Zy # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina (ANOVA, seguido do teste de Newman-Keuls).

5.5 PrLP reduz a concentração de óxido nítrico na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

Já foi bem descrita a participação do óxido nítrico (NO) no processo inflamatório induzido por Zy na articulação de camundongos e essa participação foi avaliada indiretamente pela determinação de nitrito/nitrato no lavado articular. Os animais que receberam apenas Zy i.a. apresentaram aumento na concentração de nitrito/nitrato ($130,5 \pm 11,56$ mM) quando comparado ao grupo salina ($65,19 \pm 8,0$ mM). O grupo pré-tratado com Dexametasona (2 mg/kg; e.v.) teve a concentração de nitrito/nitrato reduzida em 47,5% ($71,84 \pm 9,1$ mM) quando comparado ao grupo Zy.

Apresentando efeito estatisticamente semelhante à droga padrão, o pós-tratamento com PrLP (25 mg/kg; e.v.) reduziu significativamente as concentrações de nitrito/nitrato em 44,7% ($71,84 \pm 9,1$ mM) quando comparado ao grupo não tratado **(FIGURA 9)**.

FIGURA 9 - PrLP reduz a concentração de óxido nítrico na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos



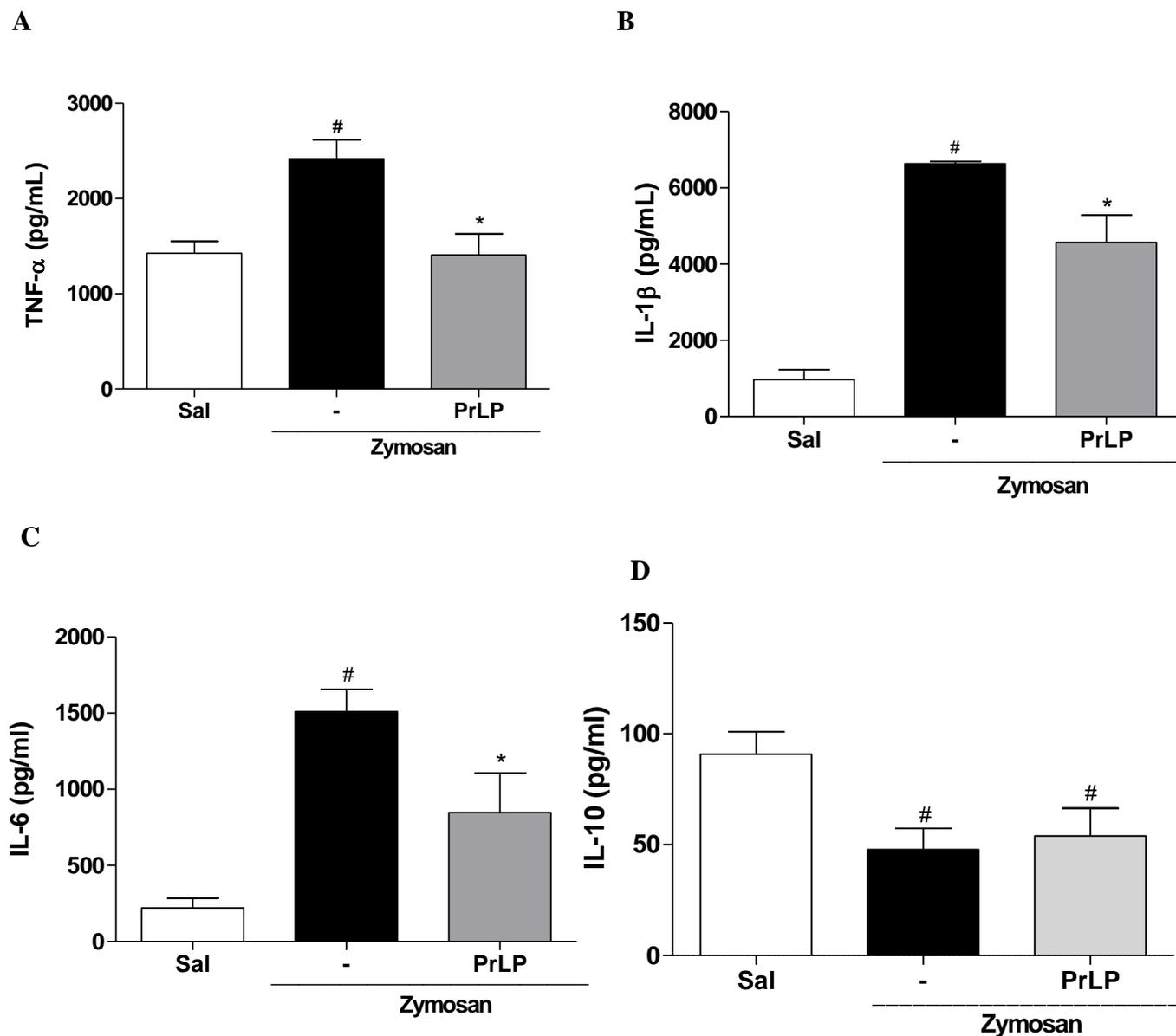
Foram avaliados os níveis de nitrito para determinação indireta do óxido nítrico em camundongos tratados com PrLP 25 mg/kg (e.v) 1 hora após e dexametasona 2 mg/kg (e.v) ou salina (e.v) meia hora antes da administração do Zy. O grupo salina recebeu apenas salina (i.a.). Os resultados representam a média ± 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<0,05 em relação ao grupo salina (ANOVA, seguido do teste de Newman-keuls).

5.6 PrLP reduz as concentrações de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) no lavado articular de camundongos com artrite induzida por zymosan (Zy)

Foi investigado o efeito de PrLP sobre a concentração das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 na sexta hora após a indução da artrite com zymosan. Observou-se que os animais que receberam apenas Zy apresentaram aumento significativo na concentração de IL-1 β ($6636 \pm 65,81$ pg/ml), TNF- α ($2025 \pm 195,9$ pg/ml) e IL-6 (1511 ± 146 pg/ml) e redução significativa da concentração de IL-10 ($47,77 \pm 9,4$) na sexta hora após a indução da artrite quando comparado com o grupo salina ($1427 \pm 123,9$; $969 \pm 259,9$; $220 \pm 65,81$ e $90,81 \pm 10,1$ pg/ml, respectivamente).

O grupo tratado com PrLP (25 mg/kg; e.v.) apresentou redução significativa nas concentrações das citocinas inflamatórias de 31,14% ($4569 \pm 712,5$ pg/ml) para IL-1 β , 30% ($1409 \pm 221,6$ pg/ml) para TNF- α e 43,92% ($847,3 \pm 260,4$ pg/ml) para IL-6 em relação ao grupo não tratado. Em relação a IL-10, PrLP não alterou sua concentração ($53,84 \pm 12,5$) quando comparado ao grupo Zy ($47,7 \pm 9,4$) (**FIGURA 10**).

FIGURA 10 - PrLP reduz a concentração de citocinas pró-inflamatórias no lavado articular de camundongos com artrite induzida por zymosan (Zy)



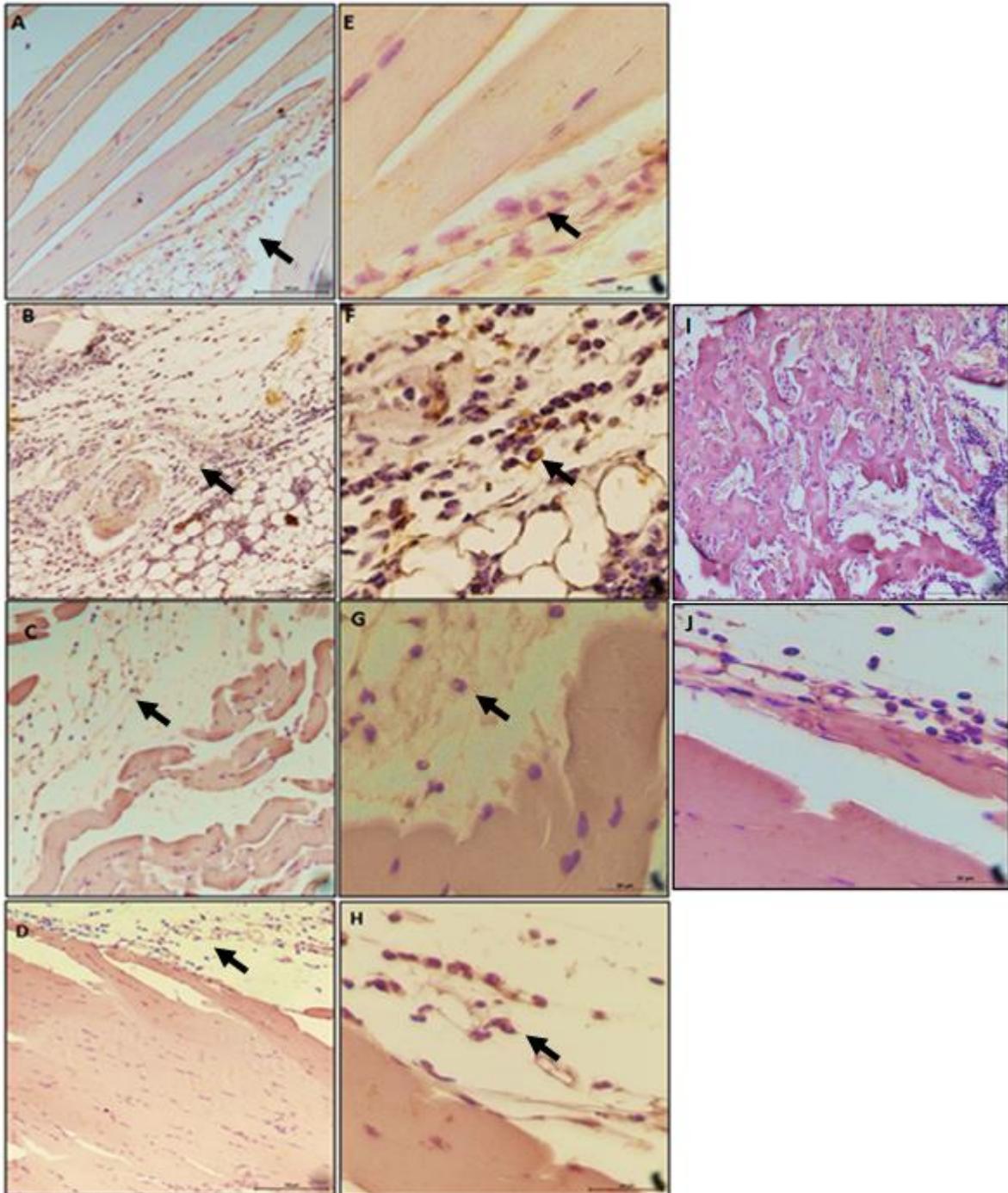
A concentração de citocinas foi avaliada no lavado articular de animais tratados com PrLP 25 mg/kg (e.v) 1 hora após e dexametasona 2 mg/kg (e.v) ou salina (e.v) meia hora antes da administração do Zy. O grupo salina recebeu apenas salina (i.a.). Os resultados representam a média \pm e.p.m. da concentração de citocinas em pg/mL lavado articular (n=6 animais por grupo). *p<0,05 em relação ao grupo Zy #p<0,05 em relação ao grupo salina (ANOVA, seguido do teste de Newman-keuls).

5.7 - PrLP reduz imunoexpressão de TNF- α , COX-2, NFkB e NOSi na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

No ensaio da imuno-histoquímica os animais que receberam apenas Zy i.a. exibiram significativo processo inflamatório na articulação com o aumento do percentual de área marcada TNF- α , COX-2, NFkB e NOSi (**FIGURA 15** - $10 \pm 0,69$; $10,5 \pm 1,19$; $12,5 \pm 0,20$; $14,23 \pm 0,28$, respectivamente) quando comparado com o grupo que recebeu apenas salina (**FIGURA 15** - $2,6 \pm 0,72$; $3,2 \pm 0,34$; $2,42 \pm 0,03$; $0,6 \pm 0,13$, respectivamente). O grupo pré-tratado com Dexametasona (2 mg/kg; e.v.) reduziu de forma significativa o percentual de área marcada de TNF- α , COX-2, NFkB e NOSi (**FIGURA 15** - $2,6 \pm 0,5$; $4,4 \pm 0,9$; $1,23 \pm 0,42$; $0,99 \pm 0,2$, respectivamente) quando comparado ao grupo zymosan.

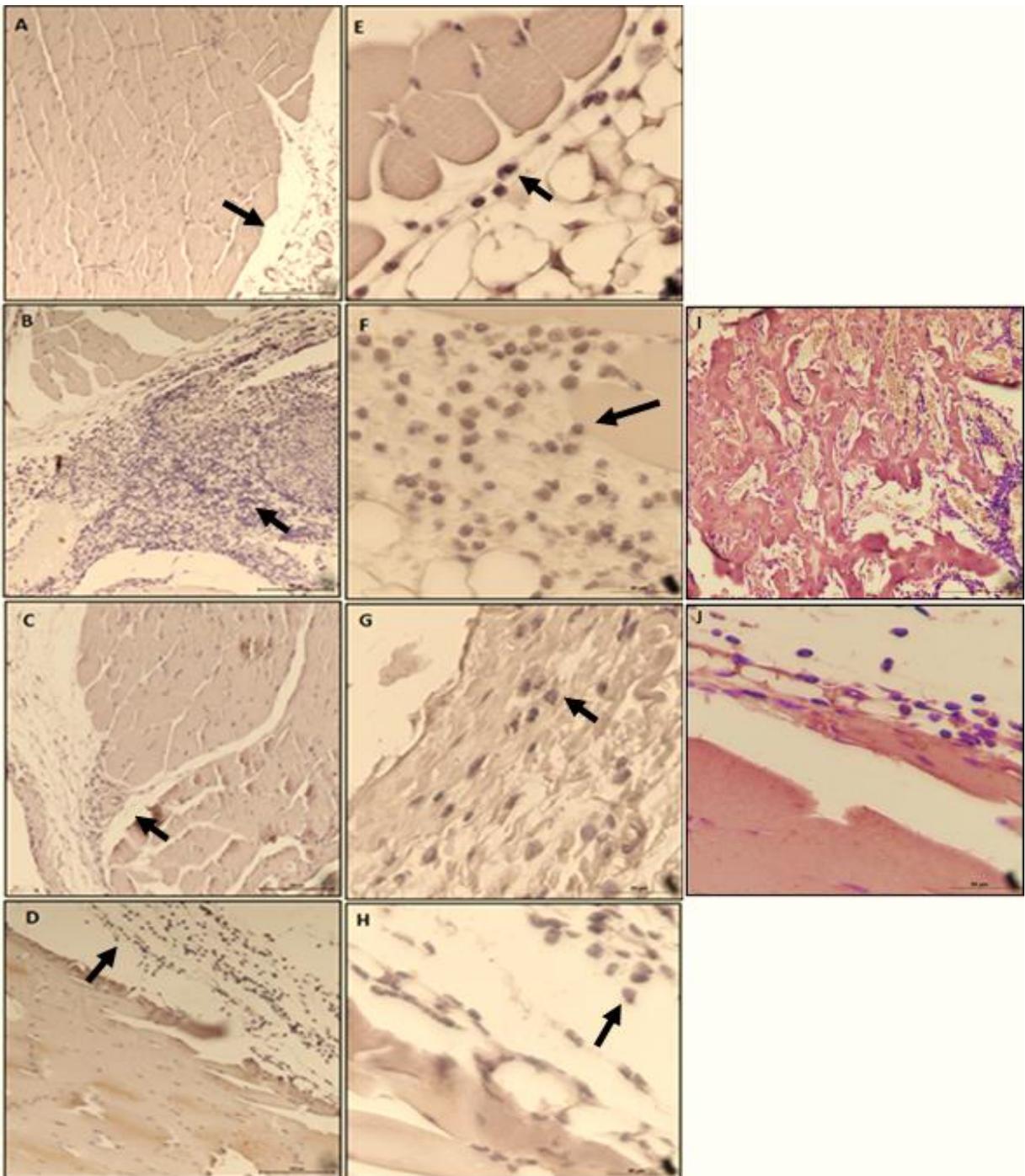
Foi possível verificar uma redução significativa do processo inflamatório no grupo que foi tratado com PrLP 25 mg/kg (e.v.) com redução significativa da imunomarcagem de TNF- α , COX-2, NFkB e NOSi (**FIGURA 15** - $3,4 \pm 0,5$; $5,07$; $0,43$; $3,3 \pm 0,8$; $1,8 \pm 0,1$). Para TNF- α , COX-2 e NOSi o efeito de PrLP foi estatisticamente semelhante ao da droga padrão.

FIGURA 11: PrLP reduz a expressão de COX-2 na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos



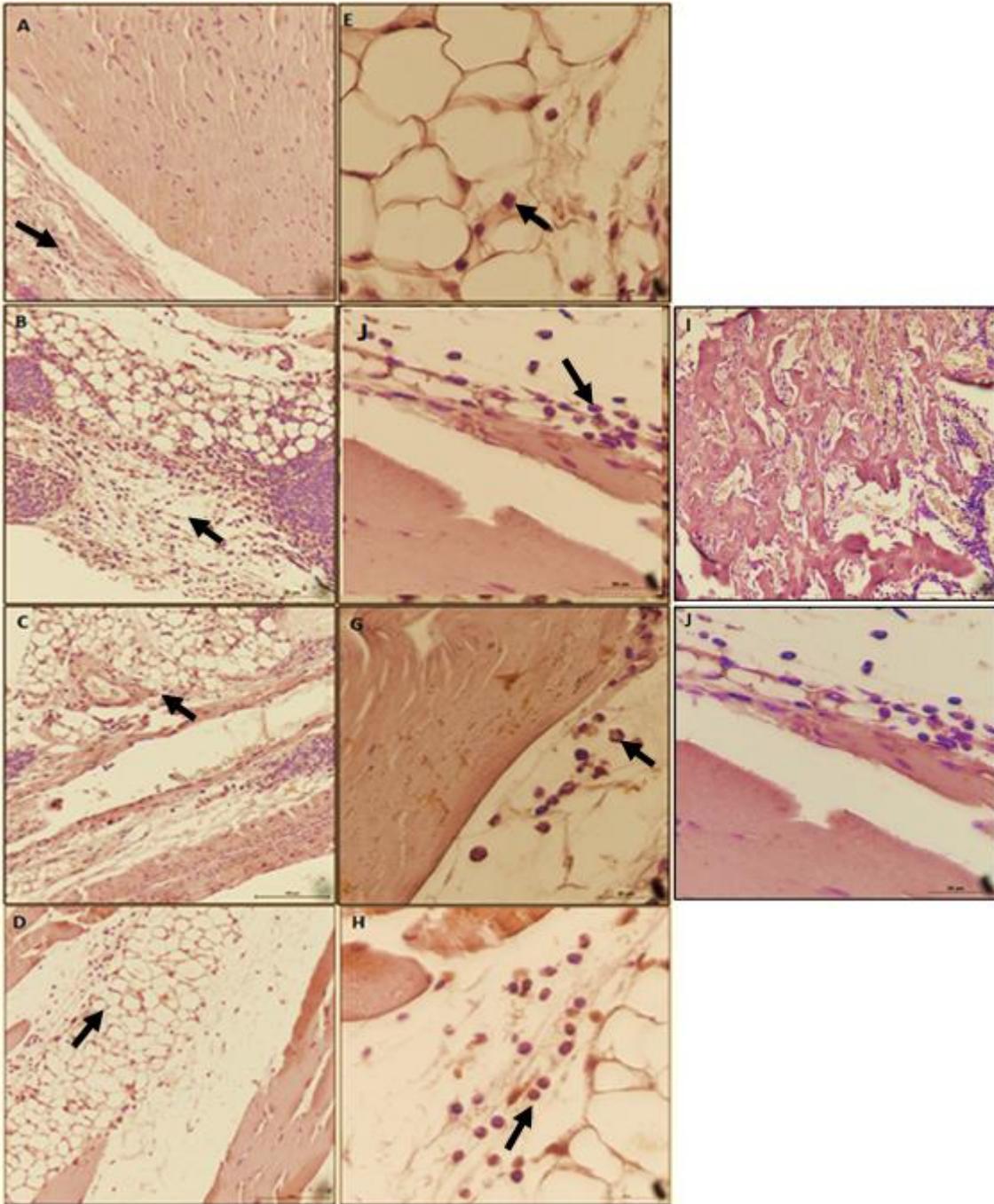
As figuras: A e E representam o grupo que recebeu apenas salina i.a.; B e F representam o grupo Zymosan; C e G representam o grupo tratado com PrLP; D e H o grupo tratado com Dexametasona. Figura I e J corresponde ao grupo controle negativo o qual não recebeu anticorpo primário durante o experimento. A (salina), B (zymosan), C (PrLP), D (dexametasona) e I (controle negativo): aumento de 100 vezes e E (salina), F (zymosan), G (PrLP), H (dexametasona) e J (controle negativo): aumento de 400 vezes.

FIGURA 12: PrLP reduz a expressão de NOSi na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos



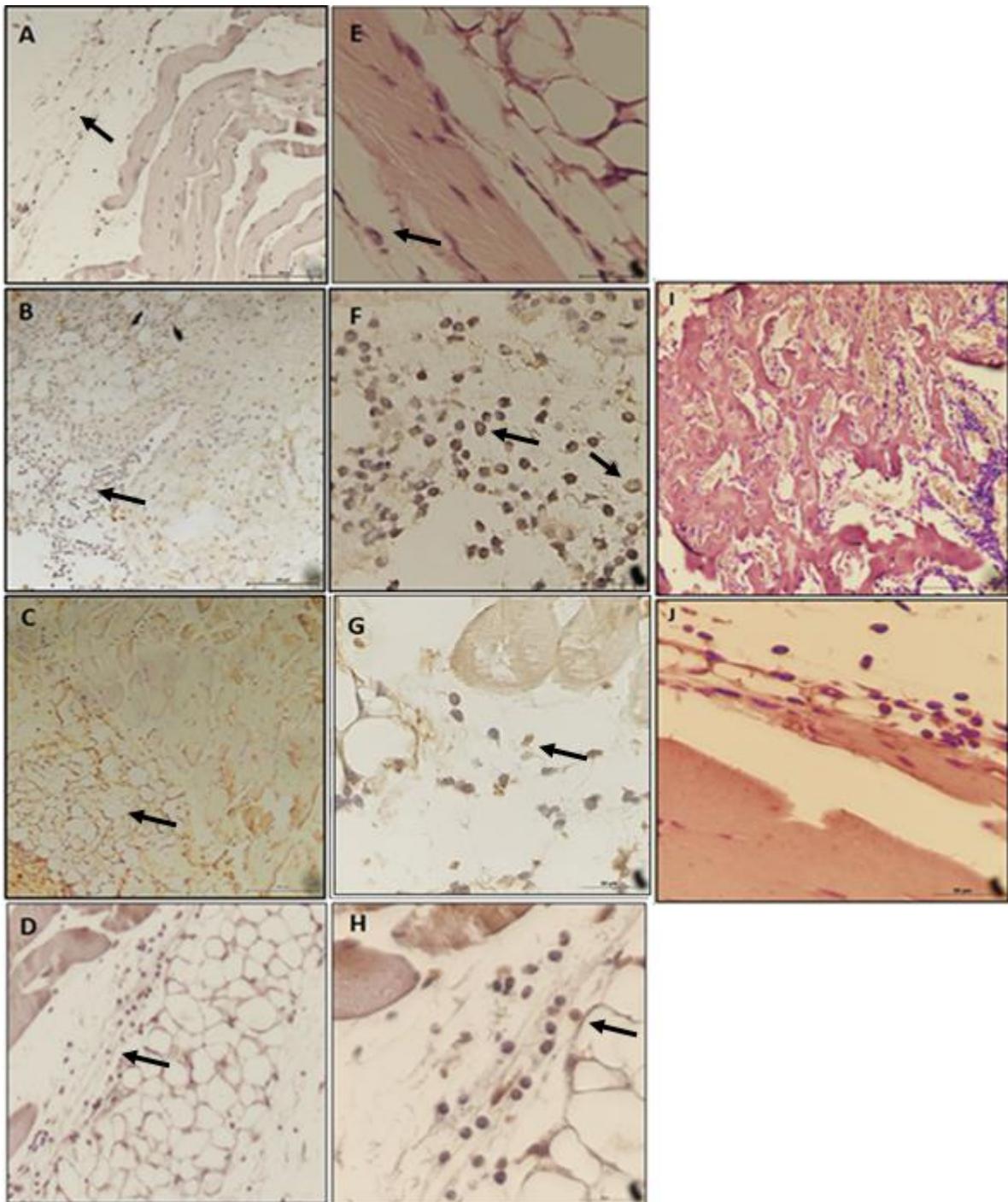
As figuras: A e E representam o grupo que recebeu apenas salina i.a.; B e F representam o grupo Zymosan; C e G representam o grupo tratado com PrLP; D e H o grupo tratado com Dexametasona. Figura I e J corresponde ao grupo controle negativo o qual não recebeu anticorpo primário durante o experimento. A (salina), B (zymosan), C (PrLP), D (dexametasona) e I (controle negativo): aumento de 100 vezes e E (salina), F (zymosan), G (PrLP), H (dexametasona) e J (controle negativo): aumento de 400 vezes.

FIGURA 13: PrLP reduz a expressão de NFkB na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos



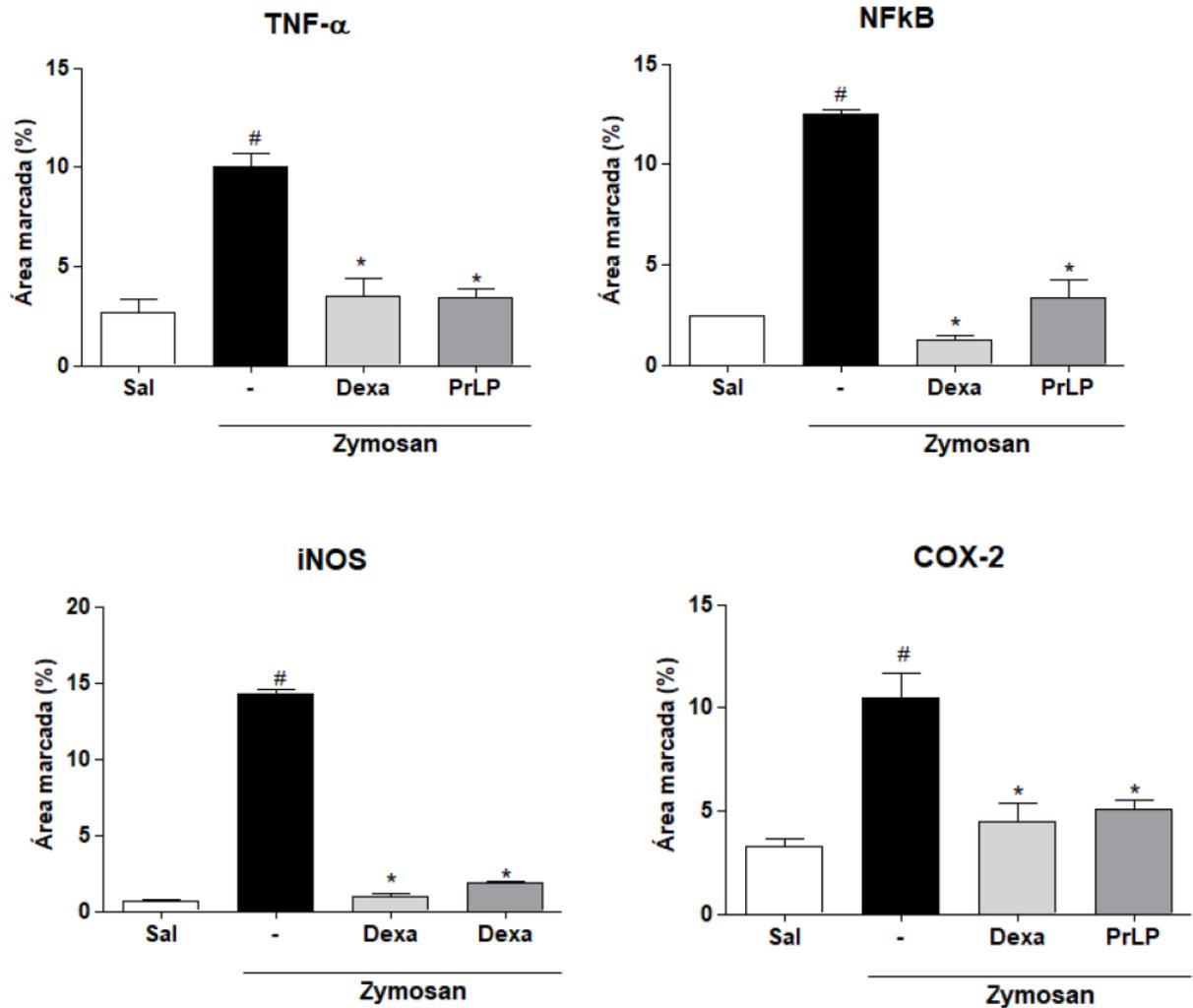
As figuras: A e E representam o grupo que recebeu apenas salina i.a.; B e F representam o grupo Zymosan; C e G representam o grupo tratado com PrLP; D e H o grupo tratado com Dexametasona. Figura I e J corresponde ao grupo controle negativo o qual não recebeu anticorpo primário durante o experimento. A (salina), B (zymosan), C (PrLP), D (dexametasona) e I (controle negativo): aumento de 100 vezes e E (salina), F (zymosan), G (PrLP), H (dexametasona) e J (controle negativo): aumento de 400 vezes.

FIGURA 14: PrLP reduz a expressão de TNF- α na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos



As figuras: A e E representam o grupo que recebeu apenas salina i.a.; B e F representam o grupo Zymosan; C e G representam o grupo tratado com PrLP; D e H o grupo tratado com Dexametasona. Figura I e J corresponde ao grupo controle negativo o qual não recebeu anticorpo primário durante o experimento. A (salina), B (zymosan), C (PrLP), D (dexametasona) e I (controle negativo): aumento de 100 vezes e E (salina), F (zymosan), G (PrLP), H (dexametasona) e J (controle negativo): aumento de 400 vezes.

FIGURA 15- PrLP reduz imunoexpressão de TNF- α , COX-2, NFkB e NOSi na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos



A imunoexpressão de TNF- α , COX-2, NFkB e NOSi foi avaliada através da análise semi-quantitativa do tecido articular de animais tratados com PrLP 25 mg/kg (e.v) 1 hora após e dexametasona 2 mg/kg (e.v) ou salina (e.v) meia hora antes da administração do Zy. O grupo salina recebeu apenas salina (i.a.). Os resultados representam a média \pm e.p.m. da área marcada (n=6 animais por grupo) *p<0,05 em relação ao grupo Zy #p<0,05 em relação ao grupo salina (ANOVA, seguido do teste de Newman-keuls).

5.8 PrLP reduz os níveis de malonaldeído (MDA) e restaura os níveis de GSH na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

No sentido de avaliar o efeito de PrLP sobre o estresse oxidativo induzido por Zy, foi realizada a dosagem de MDA e GSH no tecido articular de camundongos com artrite induzida por esse agente.

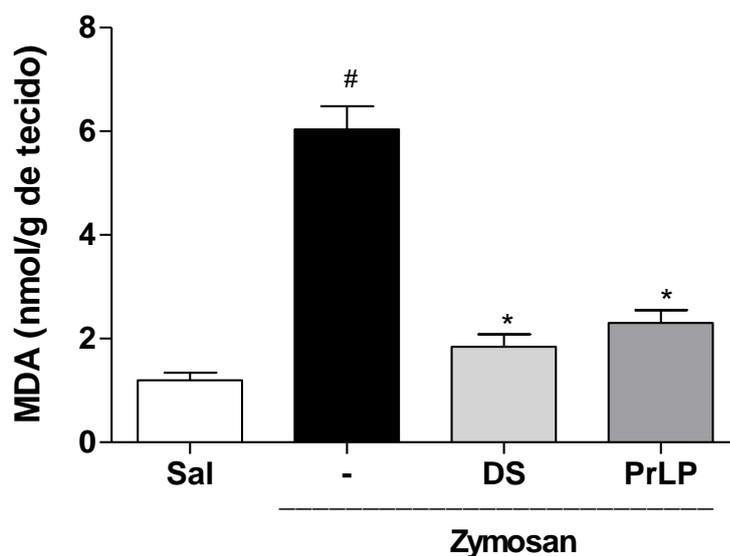
Os animais que receberam apenas Zy i.a. apresentaram aumento significativo na concentração de malonaldeído ($6,0 \pm 2,5$ nmol/g de tecido) quando comparado com o grupo que recebeu apenas salina ($1,1 \pm 0,14$ nmol/g de tecido). O grupo pré-tratado com Diclofenaco sódico (100 mg/kg; v.o.) reduziu significativamente os níveis de malonaldeído em 69,4% ($1,8 \pm 0,2$ nmol/g de tecido) quando comparado grupo Zy.

Apresentando efeito estatisticamente semelhante à droga padrão, o pós-tratamento com PrLP (25 mg/kg; e.v.) reduziu significativamente as concentrações de MDA em 61,8%% ($2,3 \pm 0,2$ nmol/g de tecido) quando comparado ao grupo não tratado (**FIGURA 16**).

Adicionalmente, foi feita a determinação da concentração de GSH e observou-se que os animais que receberam apenas Zy i.a. apresentaram redução significativa de nos níveis de glutathiona ($5794 \pm 245,7$ nmol/g de tecido) quando comparado ao grupo salina ($7820 \pm 293,9$ nmol/g de tecido). O grupo pré-tratado com Diclofenaco sódico (100 mg/kg; v.o.) aumentou significativamente a concentração de GSH em 26,7% ($7258 \pm 192,2$ nmol/g de tecido) quando comparado ao grupo Zy.

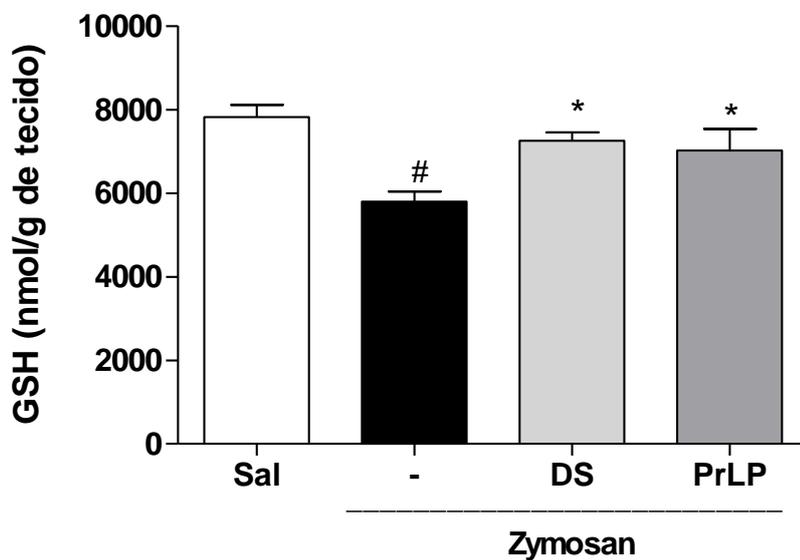
Demonstrando efeito sobre a concentração de GSH estatisticamente semelhante à droga padrão, o pós-tratamento com PrLP (25 mg/kg; e.v.) restaurou os níveis desse agente antioxidante ($7024 \pm 510,8$ nmol/g de tecido) que foram reduzidos por Zy (**FIGURA 17**).

FIGURA 16 - PrLP reduz os níveis de malonaldeído na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos



Foram avaliados os níveis de MDA no tecido articular de camundongos com artrite e tratados com PrLP 25 mg/kg (e.v) 1 hora após e diclofenaco sódico (DS) 100 mg/kg (v.o.) 1 hora antes ou salina (e.v) meia hora antes da administração do Zy. O grupo salina recebeu apenas salina (i.a.). Os resultados representam a média \pm e.p.m. de MDA no tecido articular (n=6 animais por grupo). *p<0,05 em relação ao grupo Zy #p<0,05 em relação ao grupo salina (ANOVA, seguido do teste de Newman-keuls).

FIGURA 17 - PrLP restaura os níveis de GSH na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos.



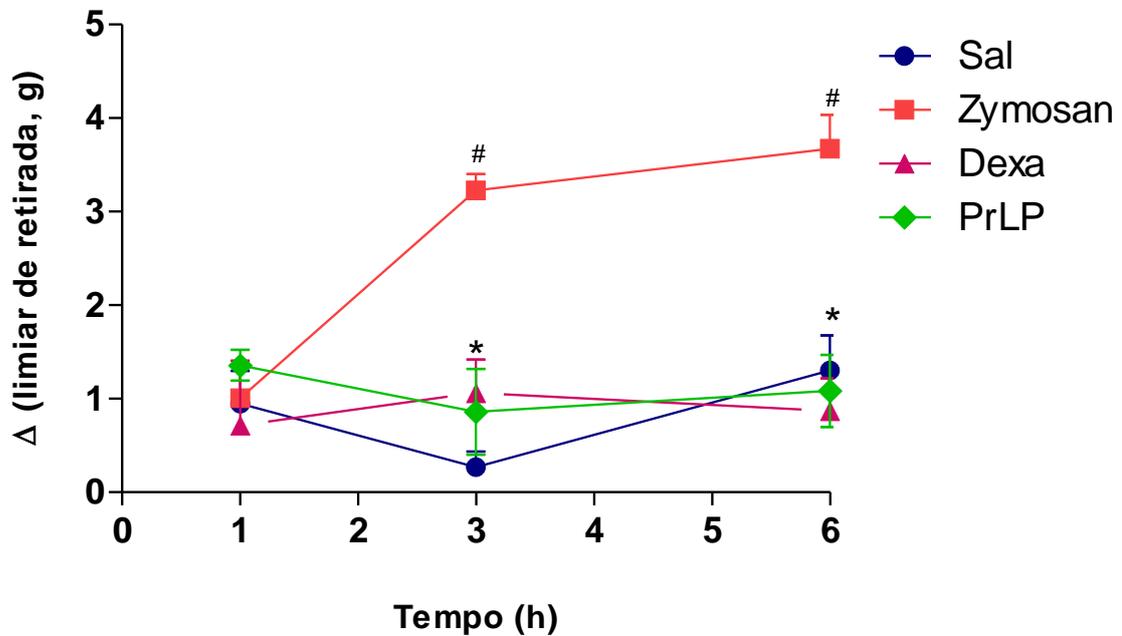
Foram avaliados os níveis de GSH no tecido articular de camundongos com artrite e tratados com PrLP 25 mg/kg (e.v) 1 hora após e diclofenaco sódico (DS) 100 mg/kg (v.o) 1 hora antes ou salina (e.v) meia hora antes da administração do Zy. O grupo salina recebeu apenas salina (i.a.). Os resultados representam a média \pm e.p.m. de GSH no tecido articular (n=6 animais por grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Zy # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina (ANOVA, seguido do teste de Newman-keuls).

5.9 PrLP reduz a hipernocicepção na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

Foi investigado o efeito de PrLP na hipernocicepção articular induzida por Zy. Observou-se um aumento significativo desse parâmetro na terceira ($3,2\pm 0,2$) e na sexta hora ($3,6\pm 2,3$) após administração de Zy i.a. quando comparado ao grupo salina ($0,27\pm 0,02$; $1,3\pm 0,03$, respectivamente). Os animais que receberam o tratamento com dexametasona (2 mg/kg; e.v.) apresentaram redução significativa de 66,8% ($1,06\pm 0,3$) na terceira e de 66,25% ($0,87\pm 0,3$) na sexta hora após indução da artrite quando comparada ao grupo Zy.

Apresentando efeito estatisticamente semelhante à droga padrão, o pós-tratamento com PrLP (25 mg/kg; e.v.) reduziu significativamente a hipernocicepção induzida pelo Zy em 73,1% ($0,86\pm 1,3$) na terceira hora e de 66,25% ($1,08\pm 2,3$) na sexta hora após a indução da artrite (**FIGURA 18**).

FIGURA 18 - PrLP reduz a hipernociceção na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

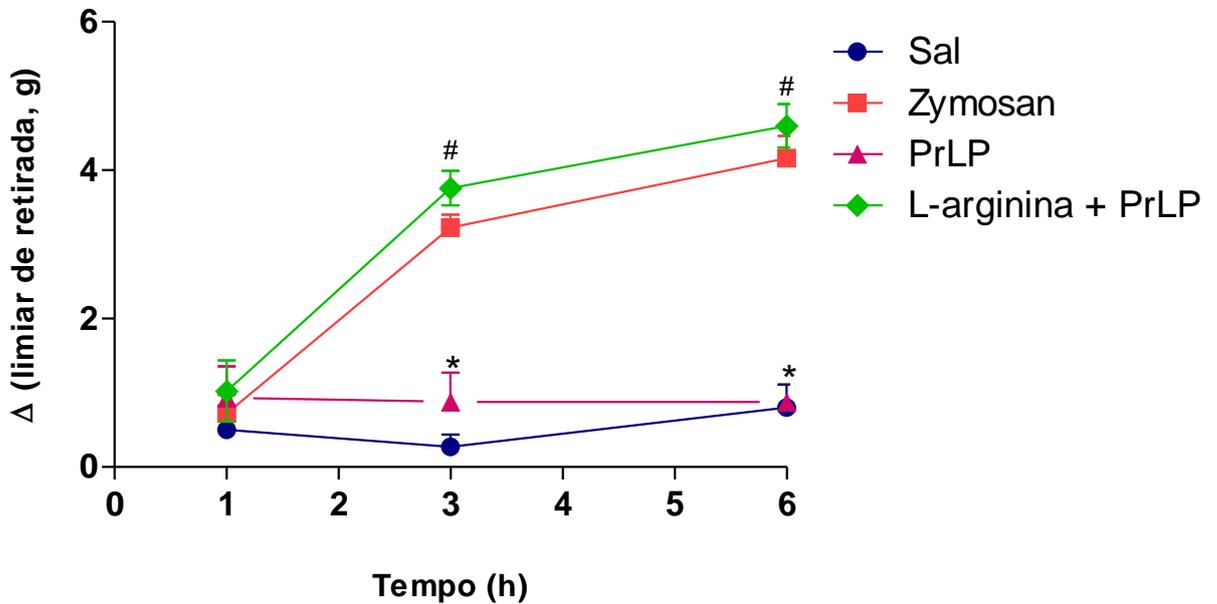


A intensidade da hipernociceção foi avaliada em animais tratados com PrLP 25 mg/kg (e.v) 1 hora após e dexametasona 2 mg/kg (e.v) ou salina (e.v) meia hora antes da administração do Zy. O grupo salina recebeu apenas salina (i.a.). Os resultados representam a média \pm e.p.m. do limiar de retirada da pata. (n=6 animais por grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Zy # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina (ANOVA, seguido do teste de Newman-keuls).

5.10 O efeito antinociceptivo de PrLP é revertido pela administração prévia de L-arginina na hipernocicepção articular induzida por zymosan (Zy) em camundongos

O composto L-arginina foi utilizada no teste da hipernocicepção articular induzida por Zy para avaliar se o efeito antinociceptivo de PrLP se dá via inibição da enzima NOS. Nos animais que receberam apenas o Zy foi observado um aumento significativo na hipernocicepção na terceira ($3,4 \pm 0,6$) e na sexta hora ($4,1 \pm 1,3$) quando comparado ao grupo salina ($0,27 \pm 0,1$; $0,87 \pm 0,1$, respectivamente). Os animais que receberam PrLP (25 mg/kg. e.v.) apresentaram uma redução significativa da hipernocicepção induzida pelo Zy em 74,1% na terceira hora ($0,88 \pm 1,1$) e de 72,9% na sexta hora ($0,85 \pm 2,6$). A administração de L-arginina 30 minutos antes de PrLP reverteu o efeito deste tanto na terceira ($3,76 \pm 0,9$) e como na sexta ($4,6 \pm 1,0$) hora (**FIGURA 19**).

FIGURA 19 – L-arginina reverte o efeito de PrLP na hipernocicepção na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos

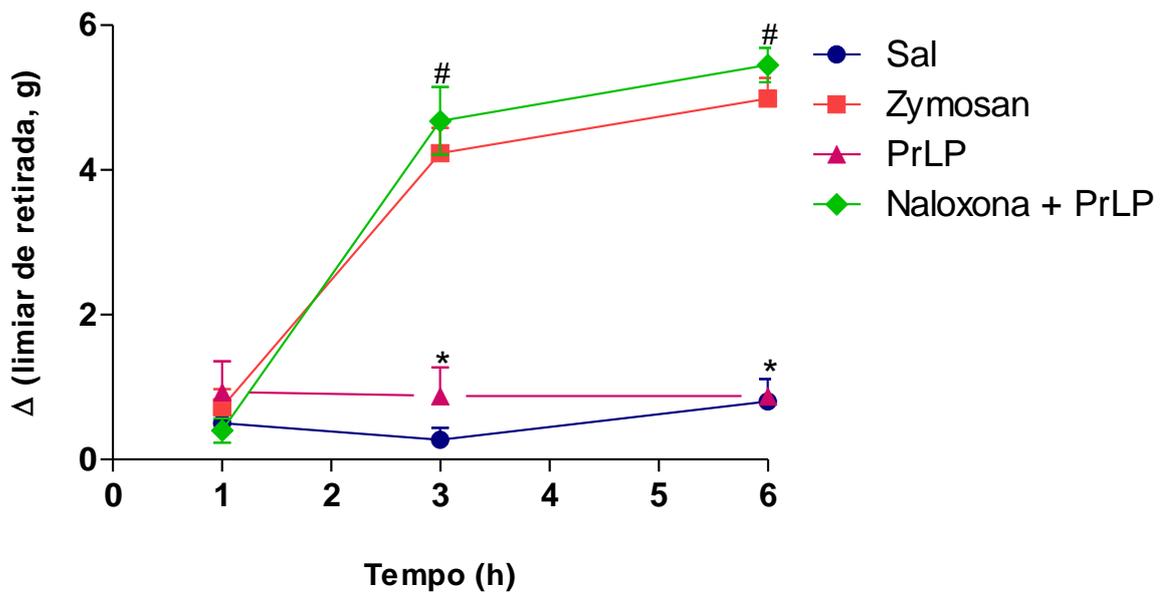


A intensidade da hipernocicepção foi avaliada em animais tratados com PrLP 25 mg/kg (e.v.), PrLP + L-arginina (1g/kg i.p.), ou salina (e.v) meia hora antes ou 1 hora após a administração do Zy. L-arginina foi administrada meia hora antes de PrLP. O grupo salina recebeu apenas salina (i.a.). Os resultados 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 # $p < 0,05$ em relação ao grupo PrLP (ANOVA, seguido do teste de Newman-keuls).

5.11 O efeito antinociceptivo de PrLP é revertido com a administração prévia de naloxona na hipernocicepção articular induzida por zymosan (Zy) em camundongos

A naloxona foi utilizada no teste da hipernocicepção articular induzida por Zy para avaliar se o efeito antinociceptivo de PrLP envolve o sistema opioide endógeno. Nos animais que receberam apenas o Zy foi observado um aumento significativo da hipernocicepção na terceira ($3,0 \pm 0,9$) e na sexta hora ($4,9 \pm 1,2$) quando comparado ao grupo salina ($0,28 \pm 0,09$; $0,78 \pm 0,1$, respectivamente). Os animais que receberam PrLP (25 mg/kg. e.v.) apresentaram uma redução significativa da hipernocicepção induzida pelo Zy em 71,6% ($0,85 \pm 1,1$) na terceira hora e de 82% ($0,88 \pm 1,9$) na sexta hora. A administração de Naloxona 30 minutos antes de PrLP reverteu o efeito deste tanto na terceira ($4,68 \pm 1,3$) e como sexta ($5,45 \pm 0,7$) hora após a indução da artrite. **(FIGURA 20)**.

FIGURA 20 – Naloxona reverte o efeito de PrLP na hipernocicepção na artrite induzida por zymosan (Zy) em camundongos



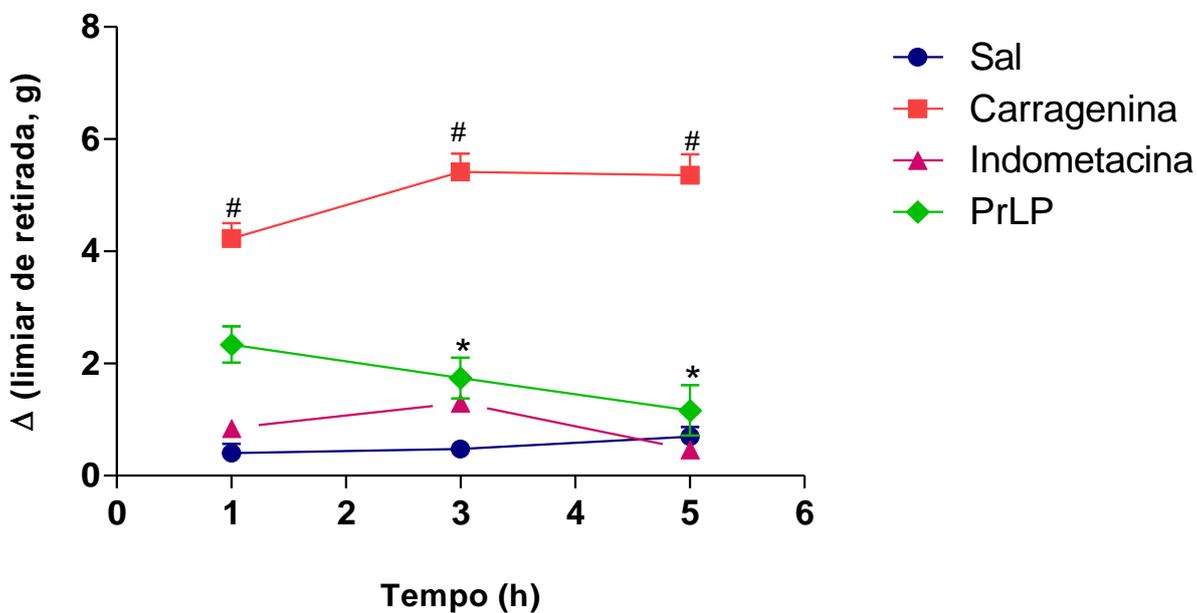
A intensidade da hipernocicepção foi avaliada em animais tratados com PrLP 25 mg/kg (e.v.), PrLP + naloxona (1mg/kg e.v.), ou salina (e.v) meia hora antes ou 1 hora após a administração do Zy. Naloxona foi administrada meia hora antes de PrLP. O grupo salina recebeu apenas salina (i.a.). Os resultados 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<0,05 em relação ao grupo PrLP (ANOVA, seguido do teste de Newman-keuls).

5.12 PrLP reduz a hipernocicepção mecânica plantar induzida por carragenina (Cg)

Foi investigado o efeito de PrLP na hipernocicepção plantar induzida por Cg. Observou-se um aumento significativo da hipernocicepção na primeira ($4,23 \pm 0,2$), terceira ($5,42 \pm 0,3$) e na quinta hora ($6,36 \pm 0,4$) após administração de Cg quando comparado ao grupo salina ($0,4 \pm 0,15$; $0,4 \pm 0,1$; $0,6 \pm 0,2$, respectivamente). Os animais que receberam o pré-tratamento com indometacina (5 mg/kg; i.p.) apresentaram redução significativa de 76,01% ($1,3 \pm 0,3$) na terceira e de 91,4% ($0,46 \pm 0,3$) na quinta hora após a administração de Cg intraplantar.

Apresentando efeito estatisticamente semelhante à droga padrão, o pós-tratamento com PrLP (25 mg/kg; e.v.) reduziu significativamente a hipernocicepção induzida pela Cg em 67,8% ($1,74 \pm 0,4$) na terceira hora e de 76,4% ($1,5 \pm 0,4$) na quinta hora após a administração do agente flogístico (**FIGURA 21**).

FIGURA 21 - PrLP reduz a hipernocicepção mecânica plantar induzida por carragenina (Cg)



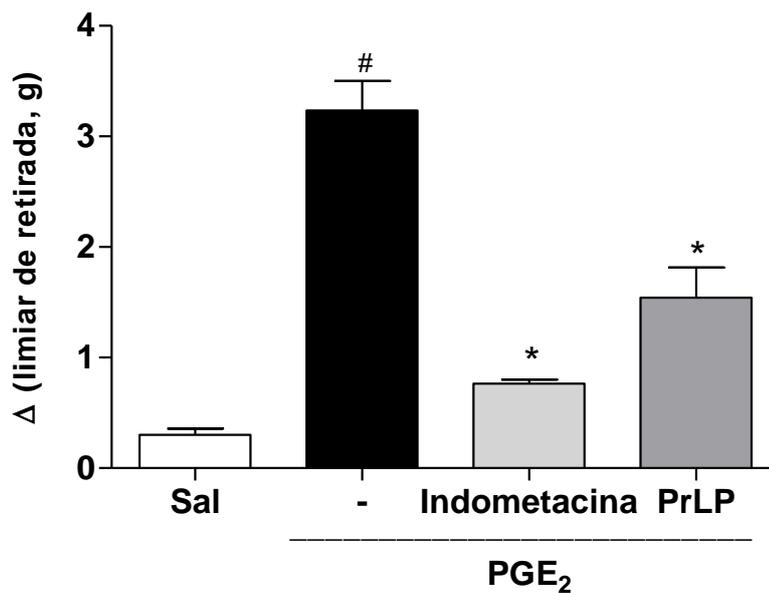
A intensidade da hipernocicepção foi avaliada em animais tratados com PrLP 25 mg/kg (e.v.) 1 hora após, indometacina (5 mg/kg; i.p) ou salina (e.v) meia hora antes ou 1 hora após a administração da Cg. O grupo salina recebeu apenas salina (i.a.). Os resultados representam a média \pm e.p.m. do limiar de retirada da pata. (n=6 animais por grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Cg # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina (ANOVA, seguido do teste de Newman-keuls).

5.13 PrLP reduz a hipernocicepção mecânica plantar induzida por prostaglandina E2 (PGE₂)

Foi investigado o efeito de PrLP na hipernocicepção plantar induzida por PGE₂. Os animais que receberam apenas PGE₂ tiveram um aumento significativo da hipernocicepção ($3,3 \pm 0,5$) quando comparado ao grupo salina ($0,3 \pm 0,1$). Os animais que receberam o pré-tratamento com indometacina (5 mg/kg; i.p.) apresentaram redução significativa de 78,7% ($0,7 \pm 0,03$) da hipernocicepção mecânica induzida pela PGE₂.

O grupo tratado com PrLP (25 mg/kg; e.v.) apresentou redução significativa da hipernocicepção mecânica induzida pela PGE₂ em 57,5% ($1,4 \pm 0,4$) quando comparada ao grupo não tratado (**FIGURA 22**).

FIGURA 22 - PrLP reduz a hipernocicepção mecânica plantar induzida por prostaglandina E2 (PGE2)



A intensidade da hipernocicepção foi avaliada em animais tratados com PrLP 25 mg/kg (e.v.) 1 hora após, indometacina (5 mg/kg; i.p) ou salina (e.v) meia hora antes da administração da PGE₂. Os resultados representam a média ± e.p.m. do limiar de retirada da pata. (n=6 animais por grupo). *p<0,05 em relação ao grupo PGE₂ #p<0,05 em relação ao grupo salina (ANOVA, seguido do teste de Newman-keuls).

6. DISCUSSÃO

As proteínas são substâncias que podem ser utilizadas como fármacos porque intervêm, essencialmente, em vários 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).

A ideia de que substâncias originadas das plantas são inofensivas e isentas de riscos à saúde humana é equivocada, considerando a toxicidade demonstrada para várias espécies vegetais (TAGLIATI & FÉRES, 2009). Sendo assim, a realização de estudos toxicológicos que investiguem ausência ou o nível de segurança terapêutica das drogas originadas de produtos naturais e de fitoterápicos é de fundamental importância para proteção da saúde humana.

Seguindo esta linha de raciocínio, PINHEIRO (2012) avaliou a fração proteica do látex de *P. rubra* (PrLP) em um modelo de toxicologia agudo adaptado e descrito anteriormente (BEZERRA et al., 2008). Foram avaliados parâmetros de toxicidade subcrônica, na qual utilizou-se a dose de 50 mg/kg. Esse tratamento não provocou nenhuma alteração macroscópica e no peso úmido dos órgãos avaliados (rim, coração, fígado e baço). Parâmetros de função renal (ureia) e função hepática (AST e ALT) também não foram modificados, bem como o número de leucócitos circulantes, quantidade de plaquetas e o peso corpóreo dos animais.

Da mesma forma, fração de látex de outras plantas também parecem não apresentar toxicidade aguda. Ramos et al. (2006) mostraram que o uso de proteínas laticíferas de *Calotropis procera* durante 35 dias consecutivos não provocou morte dos animais e nem ocasionou rejeição ao consumo da amostra. Toxicidade aguda não foi registrada durante o período experimental.

Os principais objetivos do tratamento da artrite reumatoide (AR) são prevenir e/ou controlar a lesão articular, a perda de função e o controle da dor, maximizando a qualidade de vida do paciente (BÉRTOLO et al., 2007). O tratamento farmacológico inclui o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), anti-inflamatórios esteroidais (AIEs), imunossupressores e fármacos modificadores do curso da doença sintéticos e biológicos (GOELDNER et al., 2011). No entanto esses medicamentos causam efeitos indesejáveis que muitas vezes causam o abandono do tratamento pelos pacientes (CARVALHO et al., 2016).

O presente trabalho estudou o efeito da fração proteica do látex de *Plumeria rubra* (PrLP) no modelo de artrite induzida por zymosan (Zy). Esse agente induz inflamação na articulação com erosão da cartilagem e do tecido ósseo acompanhado de migração leucocitária, aumento da permeabilidade vascular, formação de edema e hipernocicepção (ROCHA et al., 2009). Esse modelo é amplamente utilizado pelo fato de mimetizar as principais características clínicas verificadas na artrite reumatoide em humanos além de ser fácil de executar, ter boa reprodutibilidade dos dados e permitir a obtenção de resultados em um curto período de tempo (CARMO, 2015).

As doses e a via de administração de PrLP foram determinadas baseando-se em trabalhos do nosso laboratório com espécies vegetais da família Apocynaceae. Alencar e colaboradores (2015) demonstraram que PrLP reduz a úlcera induzida por etanol nas doses de 0,5; 5 e 50 mg/kg por via endovenosa. Luz (2012) demonstrou que a fração proteica de *Calotropis procera* nas doses de 5 e 50 mg/kg e.v. apresenta efeito anti-inflamatório e antinociceptivo em camundongos. Outro trabalho utilizando a fração proteica isolada do látex de *Himatanthus drasticus* (HdLP) (50 mg/kg e.v.) mostrou efeito antinociceptivo e anti-inflamatório no modelo de artrite induzida por Zy em camundongos (CARMO, 2015).

Para o controle positivo foi utilizado um grupo tratado com dexametasona na dose de 2 mg/kg e.v., esse medicamento foi escolhido por ser da classe dos glicocorticoides, ser bastante utilizado no tratamento da artrite e por apresentar efeitos anti-inflamatórios, prevenindo a destruição da cartilagem e diminuindo os primeiros sinais de inflamação (GEGOUT et al., 1995).

Para a investigação do mecanismo de ação de PrLP foi utilizada a dose de 25 mg/kg por ser a menor dose avaliada que apresentou efeito significativo nos experimentos iniciais. É importante salientar que os tratamentos com as proteínas foram feitos uma hora após da administração do agente flogístico, indicando que sua ação parece se dar após o início do processo inflamatório. Esse fator mimetiza a situação real de um paciente com artrite, pois apenas após o surgimento dos primeiros sintomas, ou seja, após o início do processo inflamatório, o paciente busca atendimento médico e conseqüentemente o tratamento. Esses pós tratamento com PrLP é um avanço no estudo de produtos naturais na artrite induzida por zymosan em camundongos, visto que na maioria dos trabalhos o que ocorre é um tratamento prévio à indução da artrite (PINTO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015; ROSAS et al., 2015; CORREA et al., 2016).

O recrutamento de leucócitos é uma etapa fundamental para o desenvolvimento do processo inflamatório incluindo as doenças autoimunes como a artrite reumatoide (TARRANT; PATEL, 2006). Essas células são responsáveis pela fagocitose e remoção de patógenos (caso a inflamação tenha sido induzida por agente infeccioso) e pela liberação de mediadores químicos que estimulam o crescimento celular e a regeneração tecidual (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

Estudos em modelos experimentais de artrite demonstraram que os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para a articulação e contribuem para o dano tecidual associado a doenças inflamatórias, desempenhando importante papel na eliminação do agente infeccioso (ISSEKUTZ, 1980; KITSIS e WEISSMANN, 1991). Essas células contêm em seus grânulos azurófilos a enzima mieloperoxidase (MPO) que é amplamente utilizada como marcador quantitativo da sua migração nos processos inflamatórios (POSADAS et al., 2004).

Na artrite reumatóide (AR) também é evidenciado o acúmulo de neutrófilos no líquido sinovial dos pacientes e sabe-se que essas células quando ativadas secretam proteases que contribuem para destruição da cartilagem e de outras estruturas do joelho (WRIGHT et al., 2014).

Nesse trabalho verificamos que PrLP nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg reduziram de forma significativa a migração celular total e a de neutrófilos induzida por Zy. Adicionalmente, essas proteínas laticíferas (25 mg/kg; e.v) também foram

eficientes em reduzir concentração de mieloperoxidase (MPO) no lavado articular desses animais. Isso sugere que PrLP apresenta efeito anti-inflamatório e que essa ação parece se dar pela diminuição da migração de neutrófilos, que é a célula mais importante no desenvolvimento da inflamação na artrite.

Assim como PrLP, outras frações do látex de plantas também reduzem migração celular para o foco inflamatório. Trabalho desenvolvido por Alencar et al. (2004) demonstrou que a fração não-dialisável de *Calotropis procera* (LP) reduziu de forma significativa a migração neutrofílica induzida por carragenina. Outro estudo com as subfrações de LP demonstrou que estas reduzem o rolamento e adesão de neutrófilos em endotélio vascular mesentérico no modelo de microscopia intravital de animais tratados com carragenina (RAMOS et al., 2009). Outras proteínas de vegetais também foram sugeridas como sendo moléculas capazes de reduzir a interação entre células de defesa e endotélio e como consequência impedir a migração celular in vivo (MOTA et al., 2006; NAPIMOGA et al., 2007; ALENCAR et al., 2010).

Um dos efeitos característico da artrite é o edema (ROCHA et al., 1999). Os fenômenos vasculares na artrite se iniciam com uma rápida constrição, seguida de vasodilatação e aumento de fluxo local, aumento de permeabilidade vascular e extravasamento de fluido e proteínas levando a formação de edema (GARCIA-LEME et al., 1993; MORAIS, 2008).

Neste trabalho, PrLP reduziu o edema articular evidenciado tanto pela medida do diâmetro da articulação como pela determinação do extravasamento do azul de evans no lavado articular. Esses resultados mostram que o efeito anti-inflamatório de PrLP se dá também com redução do edema que é um sinal característico do processo inflamatório. Pode-se sugerir que a ação antiedematogênica de PrLP é uma consequência da redução da migração leucocitária para a articulação já demonstrada anteriormente, uma vez que as células inflamatórias liberam mediadores responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e consequentemente do edema (XAVIER, 2005; BEZERRA et al., 2004).

Estudos com proteínas laticíferas já demonstraram efeito de redução de edema em modelos de inflamação. Alencar *et al.*, (2004) demonstraram que uma fração proteica não dialisável do látex de *Calotropis procera* inibiu o edema induzido

por carragenina, efeito não observado quando foi induzido por dextrana. 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. Outro trabalho com o látex de *Calotropis procera* utilizou a subfração contendo proteínas de alto peso molecular (PI) da porção não dialisável do látex. Foi demonstrado que PI reduz o edema de pata induzido por carragenina e possui um efeito antioxidante por normalizar os níveis de GSH e TBARS. Adicionalmente PI também reduziu a quantidade de MPO (marcador de neutrófilos), no tecido da pata dos animais (CHAUDHARY et al., 2015).

Semelhante aos resultados desse trabalho, Carmo (2015) demonstrou o efeito de proteínas laticíferas de *Himantanthus drasticus* (HdLP) sobre o edema articular induzido por zymosan com redução tanto do diâmetro articular como do extravasamento de azul de evans na articulação dos animais. Vale ressaltar que HdLP também diminuiu o infiltrado leucocitário induzido por zymosan assim como PrLP. O trabalho de Oliveira et al. (2015) demonstrou resultados parecidos com o de PrLP, já que que óleo da polpa de *Cariocar coriaceum* apresentou efeito anti-inflamatório na artrite induzida por zymosan com redução do infiltrado inflamatório e do edema articular em ratos.

Para confirmar os resultados anteriores, foi realizada a análise histopatológica do tecido articular de animais com artrite induzida por zymosan. O grupo que recebeu apenas a injeção de zymosan apresentou, como já era de se esperar, denso infiltrado inflamatório leucocitário com inúmeros granulócitos polimorfonucleares, edema e descontinuidade da membrana sinovial. Isso valida o modelo estudado, já que o agente flogístico foi eficiente em induzir a inflamação.

Corroborando com os resultados anteriores, a PrLP foi eficiente em reduzir o infiltrado celular no tecido, bem como o edema. Foi realizada ainda a contagem diferencial das células do infiltrado inflamatório na sinóvia e observou-se que o tratamento com PrLP mudou o padrão celular na membrana sinovial inflamada com redução significativa do número de neutrófilos. Adicionalmente essa fração proteica protegeu a membrana sinovial mantendo-a preservada.

Os efeitos benéficos de PrLP sobre o dano causado pela injeção intra-articular de zymosan foi semelhante ao da dexametasona, um corticoide amplamente

utilizado nessa doença, isso dá uma maior relevância ao estudo, uma vez que os resultados apresentados aqui não diferem dos apresentados por uma droga com uso bem consolidado para essa patologia.

A interação entre os neutrófilos e células residentes (macrófago, mastócitos e fibroblastos) no sítio inflamatório resulta na liberação de mediadores inflamatórios tais como citocinas, quimiocinas, óxido nítrico, diversas enzimas e espécies reativas de oxigênio. Esses mediadores, por sua vez, aumentam a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais facilitando a migração de leucócitos para o local da inflamação resultando na sua amplificação (KASAMA et al., 2005; PALMER; GABAY; IMHOF, 2006; CATTANI et al., 2006; TANAKA, 2006; KIM et al., 2006).

As selectinas são moléculas de rolamento presentes na superfície das células endoteliais e tem sua expressão aumentada em resposta aos patógenos ou a citocinas produzidas pelos macrófagos ativados, principalmente IL-1 β e TNF- α (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Essas citocinas também promovem o aumento da expressão endotelial de ligantes das integrinas, principalmente V-CAM-1, ligante para integrina VLA, e ICAM-1, ligante para integrina LFA-1 e Mac-1 que facilitam a migração celular (FUHLBRIGGE e WEISHAUPT, 2007). As quimiocinas, então, atuam sobre os leucócitos aderentes e estimulam a migração entre as células endoteliais para o local da infecção (ABBAS e LICHTMAN, 2012).

Diversos trabalhos demonstram o importante papel dos mediadores inflamatórios TNF- α e IL-1 β no processo de migração neutrofílica através do aumento da expressão das moléculas de adesão na superfície endotelial, sendo estas citocinas necessárias para o correto endereçamento dos neutrófilos (HICKEY et al., 1997; KELLY et al. 2007; CANETTI et al., 2001; SAUNDERS et al., 2005). No entanto, neutrófilos ativados são essenciais para a liberação de grandes quantidades destas citocinas. Sendo este dado confirmado através do bloqueio da migração de neutrófilos por fucoidina, ferramenta farmacológica que bloqueia a interação entre selectinas do tipo E e P. A diminuição do influxo celular atenua fortemente as concentrações de TNF- α e IL-1 β no local inflamado (SACHS et al., 2011).

Sabendo do importante papel dos mediadores inflamatórios para a migração celular no processo inflamatório, fomos investigar qual o efeito da fração proteica de

P. rubra sobre a concentração de citocinas e óxido nítrico no lavado articular dos animais com artrite por zymosan (Zy).

Na artrite as citocinas regulam os processos inflamatórios que estão envolvidos na patogênese da inflamação articular e nessa condição ocorre um desequilíbrio na liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias. Assim, várias citocinas pró-inflamatórias são produzidas aumentando sua atividade tais como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-2, IL-8 e IFN- γ , no entanto, as citocinas cruciais para o desenvolvimento da AR são a IL-1 β e TNF- α , pois estas estão envolvidas na imunopatogenia da artrite resultando na degradação da cartilagem e na ativação endotelial e celular (AGARWAL e MAVIYA, 2005; BEVAART, VERVOORDELONK e TAK, 2010).

Um dos efeitos da liberação de TNF- α é a indução da secreção de outras citocinas inflamatórias tais como IL-1 e IL-6. Além disso, essa citocina tão importante na resposta inflamatória também estimula sua própria secreção (NAWROTH et al., 1986; HAWORTH et al., 1991; BUTLER et al., 1995). Corroborando com esses achados, foi demonstrado em estudo desenvolvido por Berg (2000) que TNF- α está envolvida com o inchaço nas articulações que aparece no início da inflamação na artrite. Em resumo, a TNF- α é a citocina pró-inflamatória que apresenta papel chave no desencadeamento da inflamação, imunomodulação, angiogênese, citotoxicidade e dor (AGGARWAL; NATARAJAN, 1996; CUNHA et al., 1992).

A IL-1 β é um citocina pró-inflamatória que pode ser produzida por condrócitos e por osteoblastos, podendo ser associada aos eventos que iniciam o ciclo de destruição da cartilagem óssea (JOOSTEN et al., 1999). IL-1 β também está envolvida na ativação de metaloproteinases da matriz e angiogênese na membrana sinovial (AGARWAL e MAVIYA, 2005). Além disso, esse citocina estimula a ativação de osteoclastos, o aumento da expressão de moléculas de adesão pelas células sinoviais e o aumento da liberação de óxido nítrico e prostaglandina (MCLNESS e SCHETT, 2007; ABRANSON e AMIN, 2002; CROFFORD et al., 1994).

A IL-6 também é uma citocina pró-inflamatória que tem seus níveis aumentados na artrite e está relacionada com destruição articular e manifestações sistêmicas (YUSOF e EMERY, 2013; PARK, PILINGER, 2007). Essa citocina estimula a infiltração celular, o aumento da permeabilidade vascular e o

recrutamento de osteoclastos que promovem a reabsorção causando a erosão óssea (SRIRAGAN e CHOY, 2010).

O óxido nítrico (NO) é um gás diatômico sintetizado por enzimas constitutiva e induzível, tendo a L-arginina como substrato, ele penetra livremente as membranas celulares, agindo como efator molecular e sinalizador (ALVAREZ et al., 1999). O NO desempenha um papel crítico na sinalização celular, está envolvido em vários processos fisiológicos podendo ter efeitos biológicos opostos, dependendo de condições ambientais e fisiopatológicas diversas (WAN, 2013).

A lesão tecidual dependente do NO tem sido implicada em uma variedade de doenças reumáticas, incluindo a artrite reumatoide (NAGY et al., 2010). Na artrite o NO promove a mediação de muitas funções celulares diferentes no local da inflamação sinovial, como por exemplo a transdução de sinal, a função mitocondrial e a apoptose (PHILLIPS et al., 2010). Foi relatado o aumento dos níveis de NO soro e no líquido sinovial em pacientes com AR, espondilite anquilosante e osteoartrite (ERSOY et al., 2002).

Fortes evidências demonstram o envolvimento de NO na degradação da cartilagem e 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. O NO também pode se combinar com espécies reativas de oxigênio produzindo peroxinitrito, que promove a apoptose de condrócitos (BINGHAM, 2002).

Os resultados desse estudo mostram que PrLP reduz significativamente as concentrações de citocinas (IL-1 β , TNF- α e IL-6) e do óxido nítrico (NO) no lavado articular de camundongos com artrite induzida por zymosan. Esses dados sugerem que o efeito anti-inflamatório de PrLP também se dá pela depleção desses mediadores inflamatórios que são fundamentais para o desenvolvimento da condição inflamatória e suas complicações.

Os aspectos imunohistoquímicos do tecido dos animais dos grupos demonstrou perfis imunológicos distintos. O tecido articular do grupo salina apresentou estrutura normal, com pouca presença de infiltrado celular com uma leve imunexpressão de TNF- α , COX-2, NF κ B e NOSi. Enquanto que nos animais que receberam apenas Zy observou-se a presença de intenso infiltrado celular com

marcada expressão desses marcadores inflamatórios. No grupo tratado com dexametasona observou-se uma redução significativa da expressão desses parâmetros, resultado esse que foi semelhante estatisticamente ao grupo que recebeu PrLP.

Esses dados apresentam forte correlação com a redução do influxo celular descrito anteriormente pois sabe-se que os neutrófilos participam da destruição de microrganismos através de alguns fatores, dentre eles, a produção de quantidades significativas de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, tais como os íons superóxido e óxido nítrico (FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007). Foi demonstrado que nesse modelo a liberação máxima de NO ocorre na 6ª hora após a injeção do zymosan. É interessante salientar que essa liberação está associada ao pico de migração de neutrófilos para a cavidade articular, sugerindo que essas células estão associadas à produção de NO no ambiente articular (BEZERRA et al., 2004). Essas células têm a expressão da enzima óxido nítrico sintase (NOSi) aumentada e sabe-se que o bloqueio da NOSi resulta em proteção dos tecidos sinoviais (MONCADA et al., 1991; BEZERRA et al., 2004). Com base nesses dados podemos sugerir que PrLP reduz a concentração de óxido nítrico no líquido sinovial dos animais através da redução da migração de células inflamatórias reduzindo assim a expressão de NOSi no tecido articular inflamado.

Os achados inibitórios de PrLP sobre a citocina TNF- α são bastante relevantes uma vez que é sabido que na artrite reumatoide (AR) os pacientes apresentam concentrações elevadas de TNF- α tanto no fluido sinovial quanto na sinóvia reumatoide (CHU et al., 1991; FELDMANN et al., 1996). O mecanismo de ação de PrLP também parece envolver a inibição de TNF- α e agentes biológicos que tem essa ação, já são utilizados no tratamento da AR e são considerados eficazes na redução da atividade e no retardamento do dano estrutural articular, especialmente nas formas refratárias aos tratamentos convencionais (FALEIRO et al., 2011).

A ciclo-oxigenase (COX) também participa do processo inflamatório através da produção de prostanoídes que são importantes mediadores pró-inflamatórios. Durante a fase inicial da inflamação a PGE₂ é o principal produto da ciclo-oxigenase (KAPPOR et al., 2005). Há duas formas principais de COX, a ciclo-oxigenase 1

(COX-1) que constitutivamente expressa em tecidos como o vascular, renal e gastrointestinal e medeia funções fisiológicas e a ciclo-oxigenase 2 (COX-2) que é a forma induzida sobre a estimulação pró-inflamatória de várias citocinas e está envolvida com a inflamação (HERMANN, 2010; HOOZEMANS et al., 2011).

O tratamento com PrLP reduziu a imunomarcagem de COX-2 no tecido sinovial de animais com artrite por zymosan, isso sugere que o efeito anti-inflamatório dessas proteínas laticíferas também está relacionado com a inibição dessa enzima e conseqüentemente dos mediadores inflamatórios produzidos por ela.

Outro marcador da inflamação que merece destaque é o NFkB, pois a sua presença no tecido sinovial é indicativa de resposta inflamatória. O NFkB é considerado um potente fator transcricional e se liga a genes específicos no núcleo controlando a produção de citocinas pró-inflamatórias, COX-2, enzima NOSi, quimiocinas e outros genes importantes (GLEZER et al., 2000). Logo, substâncias ou drogas que conseguem inibir ou prevenir a translocação do NFkB para o núcleo são consideradas anti-inflamatórias. Nos estudos imunohistoquímicos desse trabalho a expressão de NFkB no tecido sinovial foi reduzida significativamente por PrLP reforçando seu efeito anti-inflamatório.

Um trabalho realizado por Ren e Chung (2007) demonstrou que o efeito anti-inflamatório do ácido linolênico se dá pela redução da expressão de NOSi, COX-2 e TNF- α através do bloqueio de NFkB. Assim a redução da expressão de NOS, TNF- α e COX-2 pelo tratamento com PrLP pode ser explicada pelo fato de as proteínas laticíferas reduzirem a expressão de NFkB e, por conseguinte, este, reduz a expressão das outras moléculas.

Frações proteicas de látex de espécimes vegetais parecem apresentar efeitos anti-inflamatórios com redução de citocinas e outros marcadores inflamatórios. Proteínas laticíferas de *C. procera* reduziram o infiltrado de células inflamatórias e edema, com redução da atividade de MPO e da expressão de TNF- α , IL-1 β , NOSi e COX-2 no tecido conjuntivo e epitelial de animais com mucosite oral induzida por 5-fluoracil (FREITAS et al., 2012). Essa mesma fração, em modelo de mucosite intestinal induzida pelo irinotecano, reduziu a concentração de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) com redução da imunexpressão de COX-2, TNF- α , IL-1 β , NOSi e

NFkB no tecido intestinal (ALENCAR et al., 2017). Ademais, proteínas laticíferas de *Himantanthus drasticus* (HdLP) também reduziram a concentração de NO e de citocinas inflamatórias (IL-1 β e IL-6) no lavado articular de animais com artrite por zymosan (CARMO, 2015).

Outros compostos de origem natural apresentam efeito anti-inflamatório na artrite com redução dos níveis de citocinas e da expressão de moléculas inflamatórias. Como por exemplo um composto fenólico chamado metil galato (MG) que apresentou efeito na artrite induzida por zymosan com redução da concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6, CXCL-1, LTB4 e PGE2) (CORREIA et al., 2016). O extrato hidro alcoólico de *Schinus terebinthifolius* também exibiu efeito anti-inflamatório na artrite induzida por zymosan com diminuição na atividade de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-1 β , CXCL1/KC, TNF- α) (ROSAS, 2015). Já o óleo da polpa de *Caryocar coriaceum* exibiu efeito anti-inflamatório e antinociceptivo no modelo de artrite por Zy em ratos com redução da concentração de citocinas (TNF- α e IL-1 β) e da imunexpressão de TNF- α e COX-2 (OLIVEIRA et al., 2015).

Conforme foi demonstrado, o efeito de PrLP na artrite também parece estar relacionado com a redução de mediadores inflamatórios e da imunexpressão de moléculas implicadas no processo inflamatório. No entanto, essa fração proteica não restaurou a concentração de IL-10 que foi reduzida pela administração de Zy. Esse resultado é semelhante ao obtido com proteínas laticíferas de *Himantanthus drasticus* (HdLP) e com óleo da polpa de *Caryocar coriaceum*, uma vez que esses compostos não interferiram na concentração de IL-10 no lavado articular de animais com artrite induzida por Zy (CARMO, 2015; OLIVEIRA et al., 2015).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas do nitrogênio (ERN's) são produzidas pelo metabolismo celular normal e parecem ter um papel dual nos sistemas vivos, já que são capazes de exercer efeitos fisiológicos ou fisiopatológicos (VALKO et al., 2006). Elas participam do mecanismo de defesa contra agentes infecciosos e sistemas de sinalização celular, sendo nesse último caso, liberados em baixas concentrações e com função em células ou tecidos próximos ao seu sítio de produção (VALKO et al., 2007). No estresse oxidativo há produção excessiva de EROs e ERNs e/ou deficiência dos sistemas antioxidantes,

assim essas espécies podem reagir com lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA) causando dano celular.

Em condições normais, a concentração destas espécies reativas dentro das células é extremamente baixa pelo fato de existirem enzimas antioxidantes que as removem, ou impedem sua formação. Estes radicais tendem a serem eliminados do organismo pelo conjunto das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GR) e catalase (CAT) (FEITOSA, 2011).

Estudos demonstram que há um desequilíbrio do sistema redox na reposta inflamatória na artrite reumatoide, e o agravamento desse evento resulta no estresse oxidativo com piora na clínica da doença (FLIPIN et al., 2008). Esse evento pode ser explicado por defeitos genéticos, bem como problemas no mecanismo de imunorregulação que resultam no aumento da concentração de agentes oxidantes e redução dos sistemas antioxidantes, levando a uma desordem de sinalização e descontrole dos danos moleculares (JONES, 2006, OZKAN et al., 2007).

Dessa forma, na sinovite as células inflamatórias respondem com aumento na produção de citocinas e intensa formação de radicais livres levando ao estresse oxidativo e amplificando o processo inflamatório que resulta em destruição articular, edema e dor (HEROTIN et al., 2005). Adicionalmente, estudos demonstram que a inflamação persistente característica da artrite é também resultante do aumento dos radicais livres no tecido articular inflamado e do déficit dos sistemas antioxidantes que estão envolvidos nessa patologia (FANG, YANG e WO, 2002). Foi experimentalmente confirmado que a excessiva produção de EROS leva a ativação dos osteoclastos acelerando o dano articular (GOLDRIG, 2002).

Nesse estudo, foi demonstrado que PrLP reduz a concentração de malonaldeído (um metabólito oxidante) e restaura os níveis de glutathione (mecanismo antioxidante celular). Pode-se, então, sugerir que PrLP inibe a reação em cadeia que resulta na formação de radicais oxidantes e também estimula mecanismos antioxidantes da célula possibilitando o controle do estresse oxidativo.

Um estudo feito com pacientes com artrite reumatoide (AR) mostrou que eles apresentavam níveis elevados de estresse oxidativo e que a concentração de MDA também estava mais elevada do que em pacientes normais. Outros dados sugerem

que o uso de antioxidantes na dieta pode reduzir a incidência dessa doença (JIA e HE, 2016; SAHEBARI et al., 2015; CERHAN et al., 2003).

Chanda e colaboradores (2011) demonstraram que PrLP apresenta efeito antioxidante e proteolítico *in vitro*. Outro estudo desenvolvido por Alencar e colaboradores (2015) demonstrou que PrLP possui efeito antioxidante em úlceras gástricas induzidas por etanol, por aumentar a concentração de GSH na mucosa do estômago desses animais.

Outras frações proteicas de látex de plantas também reduzem o estresse oxidativo no tecido sinovial de animais com artrite. A subfração FI do látex de *C. procera* modulou o estresse oxidativo na artrite por adjuvante de Freund através da restauração das concentrações de GSH e da depleção do ácido tiobarbitúrico (T-BARS). A sub-fração FI reduz ainda o infiltrado celular e edema, podendo inferir que essa redução do metabólito reativo oxidante pode se dar por inibição da migração de células inflamatórias que são responsáveis pela produção de radicais livres na inflamação.

O óxido nítrico também parece estar envolvido com o estresse oxidativo na artrite. Bezerra e colaboradores (2004) demonstraram que a inibição da enzima óxido nítrico sintase induzível (NOSi) reduziu a lesão da cartilagem de animais submetidos à artrite experimental por Zy e que isso pode ser explicado pelo fato de que a produção de grandes quantidades de NO pela NOSi em processos inflamatórios resulta na sua combinação com outras espécies reativas, como o ânion superóxido (O₂⁻), formando peroxinitrito (ONOO⁻) que é um radical livre. O aumento desses metabólitos promove o estresse oxidativo e conseqüentemente o dano tecidual. Já foi demonstrado que PrLP reduz os níveis de óxido nítrico no lavado articular, e esse também pode ser um dos mecanismos da sua ação antioxidante.

Dessa forma, esses estudos corroboram com os resultados encontrados no presente trabalho reforçando que o efeito anti-inflamatório de PrLP também é resultado da modulação do estresse oxidativo.

Os achados até aqui demonstraram que PrLP possui efeito anti-inflamatório na artrite induzida por zymosan que parece ser mediado via redução da migração de neutrófilos que tem como resultado a diminuição do edema, de mediadores inflamatórios (NO, IL-1 β , TNF- α , IL-6), da expressão de moléculas envolvidas no

processo inflamatório (TNF- α , IL-1 β , NOSi e COX-2) e modulação do estresse oxidativo. Vale ressaltar, que em muitos dos resultados apresentados, PrLP exibiu efeito estatisticamente semelhante ao da dexametasona. Dando continuidade ao estudo de PrLP fomos investigar o seu efeito na hipernocicepção induzida por diferentes agentes.

A dor articular pode ocorrer mesmo quando a articulação é mantida imóvel, entretanto, é induzida ou agravada durante movimentos ou com a estimulação mecânica (quando o paciente está com sobrepeso por exemplo) (KELLGREN, 1939; MC EWEN, 1943; D' CRUZ e HUGHES, 1993). No caso da artrite, a hiperalgesia ocorre mesmo quando a articulação é submetida a esforço normal ou à suave pressão (SCHAIBLE e GRUBB, 1993).

A limitação de movimentos representa um problema importante para pacientes portadores de artropatias inflamatórias. Dessa forma o alívio da dor é frequentemente o principal objetivo no tratamento agudo dessas condições (JUNIO & ROCHA, 2006).

A dor na artrite está relacionada ao processo de sinovite, desencadeado pela infiltração de células migratórias na sinóvia, que são responsáveis pela produção de mediadores indutores da nocicepção os quais, em conjunto, agem nas fibras nociceptivas primárias causando hiperalgesia (em humanos) (FIRESTEIN, 2003; GARNERO, DELMAS, 2003). Em modelos animais a dor avaliada através da medida da hipernocicepção pode ser definida como um estado de hiperalgesia e/ou alodinia devido à sensibilização de nociceptores.

Diversos estudos demonstram que a presença e ativação de neutrófilos no foco inflamatório desempenham um papel crucial na gênese da hipernocicepção inflamatória. Em trabalho de Cunha e colaboradores (2008) foi demonstrado que a atividade nociceptiva das citocinas pró-inflamatórias depende do recrutamento de neutrófilos e ainda da capacidade destas células produzirem mediadores como PGE₂ e aminas simpáticas. Estes resultados sugerem claramente a importância de neutrófilos no estabelecimento da dor inflamatória. Isto é confirmado por outros estudos que mostram que apenas a presença de neutrófilos no foco não é suficiente para o aparecimento da hipernocicepção. Os neutrófilos precisam ser ativados. Por exemplo, o recrutamento dos neutrófilos utilizando glicogênio não causa

hipernocicepção, mas quando neutrófilos foram ativados com LPS, C5a ou Cg o estado hipernociceptivo é estabelecido (CASTRO; FERREIRA 1979; LEVINE, et al., 1984; 1985; GUERRERO et al., 2008; SOUTO et al., 2011).

Reforçando esses achados, um estudo desenvolvido por Rocha (1999) demonstrou que a hipernocicepção induzida por zymosan no modelo de artrite está associado diretamente com a migração de neutrófilos para a cavidade articular.

Nesse contexto, a fração proteica do látex de *P. rubra* (PrLP) foi avaliada na hipernocicepção induzida pela injeção intra-articular de Zy, e observou-se redução significativa da nocicepção, efeito esse que foi estatisticamente semelhante à dexametasona (droga padrão utilizada). Com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação antinociceptivo de PrLP, foram utilizadas modulações farmacológicas com naloxona e L-arginina para verificar se essa ação se dá via liberação de opióides endógenos e/ou envolvimento de NOSi. Essas substâncias, quando dadas meia hora antes de PrLP reverteram o efeito antinociceptivo apresentado, sugerindo que a ação dessa fração proteica também envolve essas duas vias.

Um trabalho desenvolvido por Rocha e colaboradores (2003) demonstrou que a inibição da enzima NO sintase por L-NAME reduz a hiperalgesia inflamatória e o influxo celular na artrite induzida por zymosan em ratos quando dados de forma profilática. Essa ação parece ser decorrente de um efeito anti-inflamatório geral e não por causa de efeito antinociceptivo próprio da inibição da NOS. A administração de um doador de NO, por outro lado, parece ter um efeito antinociceptivo direto na dor inflamatória articular, efeito esse, que precisa ser melhor esclarecido. Nesse mesmo estudo a naloxona quando administrada antes do L-NAME reverteu o efeito antinociceptivo deste sugerindo que há interação entre a liberação de NO e a ativação de receptores opioides por liberação endógena dessas substâncias.

Nesse contexto, outro estudo mostrou que a administração de inibidores da NOS na artrite por zymosan resulta em um efeito anti-inflamatório, com preservação do metabolismo da cartilagem (BEZERRA et al., 2004).

Ainda há controvérsias com relação ao papel do NO em fenômenos dolorosos e inflamatórios, como a artrite, uma vez que a injeção local de NO em humanos produz dor, possivelmente via estimulação local de nociceptores (HOLTHUSEN et al., 1994).

Esse resultado na hipernocicepção por Zy sugere que a fração proteica tem ação antinociceptiva na qual parece ter forte correlação com a atividade anti-inflamatória já demonstrada nesse trabalho. Pode-se sugerir que o efeito de PrLP sobre a migração celular resulta na diminuição das concentrações de mediadores nociceptivos que reduzem, portanto, a nocicepção. Adicionalmente, PrLP pode apresentar efeito antinociceptivo devido à ativação de receptores opióides via liberação de opioides endógenos e inibição da NOSi com redução de NO. Esse último resultado corrobora com os resultados vistos anteriormente que PrLP reduz a concentração de nitrito/nitrato no lavado articular e reduz a marcação de NOSi no tecido articular de animais com artrite por Zy.

Assim como PrLP, outras frações proteicas obtidas a partir de látex de espécies vegetais têm potencial efeito anti-inflamatório e antinociceptivo em modelos animais de artrite. Uma subfração proteica de alto peso molecular do látex de *Calotropis procera* (LP_{PI}) apresentou esses efeitos na artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund em ratos. LP_{PI} reduziu o influxo de neutrófilos, edema articular e hiperalgesia nos animais, assim como melhorou significativamente a mobilidade e normalizou os marcadores de stress oxidativo como GSH e TBARS (CHAUDHARY et al., 2015).

Carmo (2015) também demonstrou o efeito de proteínas laticíferas na hipernocicepção articular induzida por zymosan. Esse trabalho mostrou que uma fração proteica obtida a partir do látex de *Himantanthus drasticus* (HdLP) apresenta efeito antinociceptivo que parece ser explicado pela sua ação anti-inflamatória com redução da migração leucocitária e dos níveis mediadores inflamatórios (NO, IL-1 β e IL-6).

A exemplo de PrLP, pode-se inferir que drogas que bloqueiam a migração de neutrófilos para o foco inflamatório possivelmente são uma alternativa para o controle da dor, já que essas células, também, são potencialmente capazes de modificar o processo fundamental de certas doenças inflamatórias induzindo à lesão dos tecidos (FERREIRA et al., 2009).

No sentido de melhor avaliar o mecanismo de ação de PrLP na hipernocicepção, utilizou-se o modelo de hipernocicepção plantar induzido por carragenina e PGE₂.

Estímulos inflamatórios como a carragenina (Cg) induzem a hipernocicepção de forma indireta através da liberação de uma cascata de citocinas pró-inflamatórias e posterior aumento da migração de neutrófilos que promovem, após diapedese, a liberação de outros mediadores hiperalgésicos amplificando ainda mais o processo doloroso (LEVINE et al., 1994).

A administração intraplantar de Cg estimula duas importantes vias da hipernocicepção inflamatória. A primeira inicia-se com a produção de bradicinina, que estimula a produção de TNF- α . Essa citocina, por sua vez, induz a liberação de IL-1 β e IL-6 e que ativam a COX-2 resultando na produção de eicosanoides, principalmente a PGE₂. Na segunda via o TNF- α induz a liberação de quimiocinas, que estimulam a liberação/produção de aminas simpáticas (FERREIRA, et al., 1988; CUNHA, et al., 1991; 1992; FERREIRA et al., 1993a; 1993b; LORENZETTI et al., 2002).

As prostaglandinas são consideradas mediadores finais da dor inflamatória, visto que ativam diretamente os nociceptores, ou seja, independem da liberação de outros mediadores (FERREIRA et al., 2009). De uma forma geral, a PGE₂ aumenta a permeabilidade vascular, promove vasodilatação além de diminuir o limiar de disparos de potenciais de ação, facilitando a excitação neuronal, levando à hiperalgisia (CALDER, 2009; FERREIRA et al., 2009).

As proteínas laticíferas de *Plumeria rubra* (PrLP) foram eficientes em reduzir a hipernocicepção plantar induzida por carragenina (Cg) demonstrando efeito antinociceptivo. Como já discutido anteriormente, a Cg induz a hipernocicepção através de uma cascata de mediadores que culminam com a sensibilização do nociceptor (CUNHA et al., 2005). Desse modo, drogas que inibem produção de mediadores inflamatórios são agentes antinociceptivo, como por exemplo os corticosteroides e a talidomida (MOREIRA et al., 1993; RIBEIRO et al., 2000). Os dados apresentados reforçam a hipótese de que PrLP age reduzindo a nocicepção em decorrência da modulação da inflamação com redução da migração celular e de mediadores inflamatórios.

Adicionalmente, PrLP também apresentou efeito antinociceptivo frente à PGE₂, como esse mediador atua diretamente sobre os receptores presentes nas membranas dos nociceptores, provocando sua sensibilização (CUNHA et al., 1992),

podemos sugerir também que a fração proteica pode reduzir de forma direta a sensibilização do nociceptor. Vale ressaltar que o efeito de PrLP foi semelhante estatisticamente ao apresentado pela indometacina, um anti-inflamatório não esteroideamente utilizado na prática clínica, o que reforça os achados do presente estudo.

Trabalhos com proteínas laticíferas na hipernocicepção corroboram com os achados nos ensaios com PrLP. Um estudo desenvolvido por Luz (2012) demonstrou o efeito antinociceptivo de proteínas laticíferas de *Calotropis procera* frente a vários estímulos inflamatórios tais como Cg e PGE₂. Esse efeito parece estar relacionado com a prevenção da sensibilização dos nociceptores pela inibição de mediador hiperálgico final (PGE₂) e pela redução a liberação de citocinas (TNF- α , IL-1 β e KC) com provável envolvimento de neutrófilos. Além disso, LP possivelmente bloqueia diretamente a sensibilização do nociceptor, ao inibir a hipernocicepção induzida por PGE₂ e epinefrina, com envolvimento da via L-arginina/NO/K⁺_{ATP}.

Proteínas isoladas do látex de *Plumeria pudica* exibem efeito antinociceptivo e anti-inflamatório por inibição de diferentes mediadores inflamatórios, do influxo de neutrófilos e da liberação de citocinas pró-inflamatórias. Esses dados são semelhantes aos encontrados nesse trabalho e reforçam a hipótese de que PrLP apresenta efeito anti-inflamatório e antinociceptivo na artrite pela redução da migração leucocitária que inibe secreção de mediadores que vão modular o processo inflamatório e reduzir a dor.

A fração proteica de *P. rubra* pode ainda atuar na via analgésica periférica L-arginina/NO/GMPc/K_{ATP}, uma vez que já foi demonstrado que PrLP reduz os níveis de NO no lavado articular com redução da imunoexpressão de NOSi e sabe-se que PrLP têm ação gastroprotetora com envolvimento de NO e canais de potássio ATP dependente (ALENCAR et al., 2015).

Já foi discutido que a dor é um dos principais sintomas da artrite e é o primeiro sinal que leva o doente a buscar o tratamento, pois leva a incapacidade de realizar atividades diárias comprometendo a qualidade de vida (PINTO, 2010). A terapêutica convencional de primeira escolha são os anti-inflamatórios não esteroidais, drogas modificadoras da doença e glicocorticoides. Porém o uso a longo prazo resulta em desordens hepáticas e gastrintestinais somadas aos custos

elevados (OLIVEIRA, 2013). PrLP poderia ser uma alternativa a esses medicamentos, uma vez que apresenta efeitos benéficos com redução da inflamação e dor na artrite e também exibe efeito gastroprotetor (ALENCAR et al., 2015) que seria muito interessante, pois geralmente esses pacientes são polimedicados e acabam por causar desordens gástricas. Somado a isso, PrLP não parece apresentar sinais de toxicidade aguda (PINHEIRO, 2012) sugerindo uma segurança na utilização do mesmo.

Adicionalmente, o desenvolvimento de drogas que reduzam a inflamação e dor na artrite torna-se mais relevante quando se leva em consideração a atual epidemia de Febre *Chikungunya* uma doença que tem como principal manifestação clínica fortes dores nas articulações, que muitas vezes podem estar acompanhadas de edema que podem persistir por mais de três meses após a infecção (MINISTÈRIO DA SAÙDE, 2017).

Assim, os resultados do presente trabalho somado aos demais estudos com PrLP abrem novas oportunidades para seu uso clínico, no entanto devem ser realizados mais estudos para confirmar as hipóteses aqui levantadas.

7. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a fração proteica de *Plumeria rubra* (PrLP) apresenta efeito anti-inflamatório e antinociceptivo em modelo de artrite induzida por zymosan devido a redução da migração celular que leva a diminuição do edema, da concentração de mediadores inflamatórios, do estresse oxidativo e consequentemente da nocicepção. O efeito antinociceptivo de PrLP também parece envolver liberação de opioides endógenos, redução da produção de NO e inibição direta dos nociceptores.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; **Imunologia Celular e Molecular**. 7 ed. São Paulo: Elsevier, 2012. 560p.
- ABRAMSON, S. B. *et al.* NO and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. **Curr. Rheumatol. Resp.** v.3, p.535-541, 2001. **Arthritis and Rheumatism**, v.36, p.51-58, 1993.
- ABU-AMER, Y. *et al.* Tumor necrosis factor receptors types 1 and 2 differentially regulate osteoclastogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 35, p. 27307, 2000.
- AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology and evolution plant defense against herbivory. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.** v. 40, p. 311-331, 2009.
- AJUEBOR, M.N., DAS, A.M., VIRÁG, L., FLOWER, R.J., SZABÓ, C., PERRETTI, M., Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. **J. Immunol.** 162, 1685–1691, 1999.
- ALEY, K.O.; LEVINE, J.D. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. **The Journal of neuroscience.**, v. 19, p.2181-2186, 1999.
- ALENCAR, N.M.N.; OLIVEIRA, R.S.B.; FIGUEIREDO, J.G.; CAVALCANTE, I.J.M.; MATOS, M.P.V.; CUNHA, F.Q.; NUNES, J.V.S.; BONFIM, L.R.; RAMOS, M. V. An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammation models. **Inflamm Res.**, v.59, p.245–254, 2010.
- ALENCAR, N.M.N.; OLIVEIRA, J.S.; MESQUITA, R.O.; LIMA, M.W.; VALE, M.R.; ETCHELLS, J.P.; FREITAS, C.D.T.; RAMOS, M.V. Pro- and anti-inflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflamm. Res.**, v.55, p. 559-564, 2006.
- ALENCAR, N.M.N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; VALE, M.R.; BITENCURT, F.S.; OLIVEIRA, J. S.; RIBEIRO, R. A; RAMOS, M. V. Anti-inflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in: Three different experimental models: Peritonitis, Paw edema and Hemorrhagic cystitis. **Plant. Med.**, v.7, p.1144-1149, 2004.
- ALENCAR NM, DA SILVEIRA BITENCOURT F, DE FIGUEIREDO IS, LUZ PB, LIMA-JÚNIOR RC, ARAGÃO KS, MAGALHÃES PJ, DE CASTRO BRITO GA, RIBEIRO RA, DE FREITAS AP, RAMOS MV. Side-Effects of Irinotecan (CPT-11), the Clinically Used Drug for Colon Cancer Therapy, Are Eliminated in Experimental Animals Treated with Latex Proteins from **Calotropis procera** (Apocynaceae). **Phytother Res.**, v. 31, p. 312-320, 2017.

ARCHER, B.L.; AUDLEY, B.G.; MCWEENEY, G.P.; HONG, T.C.J. Studies on composition of latex serum and "bottom fraction" particles. **J Rub Res Inst Malaysia**, vol.21, p.560-569, 1969.

ARCHER, B. An alkaline protease inhibitor from *Hevea brasiliensis* latex. **Phytochemistry**. v. 23, p.633-639, 1983.

AREND W. P., DAYER G.M. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 38, p. 151-60, 1995.

ARTHRITIS FOUNDATION. **Artrite Reumatóide**. [S.L.], 2000. Disponível em: <http://www.reumatologia.com.br/images/artrite2.pdf> Acesso em: 04 jan 2017.

AVIÑA-ZUBIETA, J. A. et al. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis of observational studies. **Arthritis Rheum**. v. 59, n. 12, p. 1690-7, 2008.

BALSA, A. et al. Influence of HLA DRB1 alleles in the susceptibility of rheumatoid arthritis and the regulation of antibodies against citrullinated proteins and rheumatoid factor. **Arthritis Res Ther**. v. 12, n. 2, p. R62, 2010.

BANU, J. R.; JAYAKAR, B. Anti cancer activity of ethanolic extract of Leaves of *Plumeria rubra* (Linn). **Curr. Pharm. Res.**; v. 1, p. 175-179, 2011.

BEGUM, H. et al. Antioxidant and hypolipidemic effect Of *Plumeria Rubra* L. In alloxan Induced hyperglycemic rats. **J. Chem.**; v.7, p.1-5, 2010.

BERTOLINI, D. R. et al. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. **Nature**, v. 319, n. 6053, p. 516, 1986.

BERTOLO, M. B. Como diagnosticar e tratar artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 65, n. 12, p. 64-72, nov. 2008.

BEZERRA, M. M. et al. 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.

BEZERRA, M. C. RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. **Pub Med**, v. 38, n. 2, p.1-8, 2008.

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

BLAY, S. L. et al. Prevalence and concomitants of arthritis in the elderly in Rio Grande do Sul, Brazil. **PLoS Med.** v. 7, n. 9, 2012.

BLUMBERG, S. N.; FOX, D. A. Rheumatoid Arthritis: guidelines of emerging therapies. **Am. J. Manag. Care.** v. 7, n. 6, p. 617-26, 2001.

BOYCE, B. F. et al. Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice. **Endocrinology**, v. 125, n. 3, p. 1142-1150, 1989.

BONICA, J.J. Anatomic and physiologic basis of nociception and pain. Management of Pain. 2. Ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p.28-99, 1990

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

BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo: **Patologia Geral.** 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 378, 2009.

BRENNAN, F.M. et al. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin- 1 production in rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 2, n. 8657, p. 244, 1989.

BRUNTON L.L.; CHABNER B.A.; KNOLLMANN B.C. (Eds.). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 12ª ed. New York: McGraw-Hill, p. 1209-35, 2011.

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

BURNSTOCK, G.; wood, j.n. Purinergic receptors: their roles in nociception and primary afferent neurotransmission. **Curr Opin Neurobiol.**, v.4, p.526-532, 1996.

CALABRÒ, A. et al. One year in review 2016: novelties in the treatment of rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol.**, v.34, n.3, p. 357-72, 2016.

CARMO, L. D. Proteínas isoladas do látex de *Himatanthus drasticus* (mart.) plumel apocynaceae reduzem a resposta inflamatória e nociceptiva na artrite induzida por zymosan em camundongos. **Universidade Federal do Ceará.**, 2012

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

CHANCE, B.; MAEHLY, A.C. Assay catalases and peroxidases. **Methods Enzymol.** v. 2, p. 764-768, 1955.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Bio. Res.**, v. 33, p. 179 – 189, 2000.

CAMBON, E. et al. Comparison of the lipase activity in hydrolysis and acyl transfer reactions of two latex plant extracts from Babaco (*Vasconcellea X Heilbornii* Cv.) and *Plumeria rubra*: Effect of the aqueous microenvironment. **J. Agric. Food Chem.** v. 54, p. 2726-2731, 2006.

CERHAN, J. R. et al. Antioxidant micronutrients and risk of rheumatoid arthritis in a cohort of older women. **Am J Epidemiol.** v. 157, n. 4, p. 345-54, 2003.

CESARE, P.; MCNAUGHTON, P.A. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin (pain sensory transduction protein kinase C sensory neuron). **Neurobiology.**, v.93, p. 15435-14439, 1996.

CHANDA, I. et al. A Protease Isolated from the Latex of *Plumeria rubra* Linn (Apocynaceae) 2: Anti-inflammatory and Wound-Healing Activities. **Trop. J. Pharm. Res.** v. 10, p. 755-760, 2011.

CHATHAM, W. W. et al. Degradation of human articular cartilage by neutrophils in factors. **J. Rheumatol.** V.26, p.2002-2014, 1999.

CHATTERJEE, M. et al. Anxiolytic effects of *Plumeria rubra* var. *acutifolia* (Poiret) L. flower extracts in the elevated plus-maze model of anxiety in mice. **Asian J Psychiatr.** 2013.

CHEYE, M. L.; CHEUNG, K.Y. Beta-1,3-glucanase is highly-expressed in laticifers of *Hevea brasiliensis*. **Plant. Mol. Biol.** v. 29, p. 397-402, 1995.

CNUBBEN, N.H. et al. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 10, p. 141-152, 2001.

CONTE, F. P. et al. Effect of Gedunin on Acute Articular Inflammation and Hypernociception in Mice. **Molecules.** v. 20, p. 2636-57, 2015.

COSTA, O. J. et al. Infliximabe, metotrexato e sua combinação no tratamento da artrite reumatoide: revisão sistemática e metanálises. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 55, n. 2, p. 146-158, 2015.

COATES, N.J.; MCCOLL, S.R. Production of chemokines in vivo in response to microbial stimulation. **J. Immunol.**, v.166, p. 5176-5182, 2001.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v.72, p.359-371, 2005.

COURTENAY, J. S. et al. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. **Nature**, v. 283, p. 666-668, 1980.

CROSS, M. et al. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. **Ann Rheum Dis.** v. 73, n. 7, p. 1316-22, 2014.

CRUVINEL, W. de M. et al. Sistema imunitário – parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rer. Bras. Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

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

CUNHA, F.Q. et al. Tumour necrosis factor-alpha mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. **Eur J Pharmacol.**, v. 1-3, n. 496, p. 197-204, ago. 2004.

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

CUNHA, T.M.; BARSANTE, M.M.; GUERRERO, A.T.; VERRI JR, W.A.; FERREIRA, S.H.; COELHO, F.M.; BERTINI, R.; Di GIACINTO, C.; 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. **Br J Pharmacol.** v. 154, p.460-470, 2008

DOMSALLA, A.; MELZIG, M. F. Occurrence and properties of proteases in plant latices. **Planta Med.** v.74, p.699-711, 2008.

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

EGWAIKHIDE, P. A.; OKENIYI, S. O.; GIMBA, C. E. Screening for anti-microbial activity and phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **J Med Plants Res.** v. 3, p.1088–1089, 2009.

ELLIOTT, M. J. et al., Repeated therapy with monoclonal-antibody to tumor-necrosisfactor- alpha (Ca²) in patients with rheumatoid-arthritis. **Lancet**, v. 344, p. 1125-27, 1994.

EVANS, A.R.; VASKO, M.R.; NICOL, G.D. The cAMP transduction cascade mediates the PGE₂-induced inhibition of potassium currents in rat sensory neurones. **J. Physiol.**, v.516, p.163-78, 1999.

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.

FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nat. New Biol.**, v.240, p.200-3, 1972.

FERREIRA, S.H. Local analgesic effect of morphine on the hyperalgesia induced by cAMP, Ca²⁺, isoprenaline, and PGE2. **Adv Prostaglandin Thromboxane Res**, v.8, p.1207–1215, 1980.

FERMOR, B. et al. Oxygen, nitric oxide and articular cartilage. **Eur Cell Mater.** v. 11, n. 13, p. 56-65, 2007.

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. et al. The snake venom metalloproteinase BaP1 induces joint hypernociception through TNF-alpha and PGE2-dependent mechanisms. **Br J Pharmacol.** v. 151, n. 8, p. 1254-61, 2007.

FILIPPIN, L. I. et al. Reumatóide Redox Influence on the Inflammatory Response in Rheumatoid Arthritis. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 48, n.1, p. 17-24, 2008.

FIGUEIREDO, I. S. T.; RAMOS, M. V.; RICARDO, N. M. P. S.; GONZAGA, M. L. C.; ; PINHEIRO, R. S. P.; DE ALENCAR, N. M. N. Efficacy of a membrane composed of polyvinyl alcohol as a vehicle for releasing of wound healing proteins belonging to latex of *Calotropis procera*. **Process Biochemistry**, v. 1, p. 1-8, 2014.

FRASNELLI, M. E. et al. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Res. Ther.**, v. 7, n.8, p. 370-379, 2005.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.**, v.48, p.129-141, 1999

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

GABAN, S. V. F. et al. Latex extract of *Plumeria rubra* induces antihypertensive and vasodilator effects on rat aorta. **International Journal of Indigenous Medicinal Plant**, v. 46, p. 1209-1216, 2013.

GABRIEL, S. E.; MICHAUD, K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. **Arthritis Res. Ther.** v. 11, n. 3, p. 229, 2009.

GAITÁN, I. et al. Subcutaneous antifungal screening of Latin American plant extracts against *Sporothrix schenckii* and *Fonsecaea pedrosoi*. **Pharm Biol.** V. 49, p. 907-19, 2011.

GERARD-MONNIER, D. et al. Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical Research and Toxicology*. v. 11, p. 1176–1183, 1998.

GIBOFSKY, A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Manag Care*. v. 18, n. 13, p. S295-302, 2012.

GIORDANI, R.; LAFON, L. Action of *Carica papaya* latex on cell wall glycosidases from *Lactuca sativa*. *Phytochemistry*. v.34, p.1473-1475, 1993.

GLEZER, I. et al. O fator de transcrição NF-kappaB nos mecanismos de ação de psicofármacos;. *Rev. Bras. Psiquiatria*., São Paulo, v.22, n.1, p-26-30, jan/mar., 2000.

GOLD, M.S.; LEVINE, J.D.; CORREA, A.M. Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *J. Neurosci.*, v.18, p.10345-55, 1998.

GUERRERO, A. T.; ZARPELON, A.C.; VIEIRA, S.M.; PINTO, L.G.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; VERRI, W.A.J.; CUNHA, T.M. The role of PAF/PAFR signaling in zymosan-induced articular inflammatory hyperalgesia. *Naunyn Schimiedebergs Arch Pharmacol.*, v.1, n.386, 2003.

HAFIZUR, R. et al. Antioxidant, cytotoxic and hypolipidemic activities of *Plumeria alba* L. and *Plumeria rubra* L. *American Journal of Life Sciences*. v. 2, p. 11-15, 2014.

HAGEL, J. M.; YEUNG, E. C.; FACCHINI, P. J. Got milk? the secret life of laticifers. *Trends in Plant Sci*. v.13, p.631-639, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*. New York, v.186, p-1-85, 1990.

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

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

HARRIS, R. R. Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. *N.Eng. J. Med*. v. 322, p.1277-1289, 1990.

HILLIGES, M.; WEIDNER, C.; SCHMELZ, M.; SCHMIDT, R.; ORSTAVIK, K.; TOREBJORK, E.; HANDWERKER, H. ATP responses in human C nociceptors. *Pain.*, v. 1-2, 2002.

- HOCHBERG, M.C. et al. **Rheumatology**, 3th edition, Mosby, vol. 1, 2003.
- HOOTMAN, J. M.; HELMICK, C. G.; BRADY, T. J. A public health approach to addressing arthritis in older adults: the most common cause of disability. **Am J Public Health**. v. 102, n. 3, p. 426-33, 2012.
- JEKEL, P. A.; HARTMANN, B. H.; BEINTEMA, J. J. The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. **Eur. J. Biochem**. v.200, p.123-130, 1991.
- JIA, Z.; HE, J. Paeoniflorin ameliorates rheumatoid arthritis in rat models through oxidative stress, inflammation and cyclooxygenase 2. **Exp ther med**. v. 11, n. 2, p. 655-9, 2016.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, p.203-10, 2001.
- KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. The perception of pain. Principles of neural science. 4.ed. EUA: MacGraw-Hill., p. 472-91, 2000.
- KARNODO, L. B. S. et al. Cytotoxic constituents of the bark of *Plumeria rubra* collected in Indonesia. **Journal of Natural Products**.; v. 53, p. 1447-1455, 1990.
- KEKWICK, R.G.O. Latex and laticifers. **Encyclopedia of Life Science**.; Nature Publishing Group, p. 1-6, 2001.
- KELCHTERMANS, H. et al. Effector mechanisms of interleukin-17 in collagen-induced arthritis in the absence of interferon- gamma and counteraction by interferon-gamma. **Pub Med**, Brussels, Belgium, p.1-13, 2009.
- KEYSTONE EC, SCHORLEMMER HU, POPE C, ALLISON AC. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis Rheum.**, 20:1397-1401, 1977.
- KHASAR, S.G.; LIN, Y.H.; MATIN, A.; DADGAR, J.; MCMAHON, T.; WANG, D.; HUNDLE, B.; ALEY, K. O.; ISENBERG, W.; MCCARTER, G.; GREEN, P.G.; HODGE, C.; LEVINE, J.D.; M,ESSING, R. O. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C eapsilon mutante mice. **Neuron**., v. 1, p. 253-260, 1999.
- KHURANA, R.; BERNEY, S. M. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, v. 12, p. 153–165, 2005.
- KITSIS, E.; WEISSMANN, G. The role of the neutrophil in rheumatoid arthritis. **Clin Orthop Relat Res**., v. 265, p. 63-72, abr. 1991.
- KLEIN, D. C.; RAISZ, L. G. Prostaglandins: Stimulation of bone resorption in tissue culture. **Endocrinology**, v. 86, n. 6, p. 1436- 1440, 1970.

KLIPPEL, J.H. et al. Primer on the Rheumatic Diseases. 12 ed. Canada: Arthritis Foundation, 2001.p. 209-217.

KOLACZKOWSKA, R., ANDERSIN, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation proceeding.**, v.18, p.412-416, 1959.

KOTARO KONNO. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry.** v.7, p.1510–1530., 2011.

KUMAR, V. L. et al. In Vivo Efficacy of Latex from *Calotropis procera* in Ameliorating Fever-Biochemical Characteristics and Plausible Mechanism. **Appl Biochem Biotechnol.** v. 182, n. 3, p. 1229-1239, 2017.

KOURILOVITCH, M.; GALARZA-MALDONADO, C.; ORTIZ-PRADO, E. Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. **J Autoimmun.** v. 48-49, p. 26-30, 2014.

KUIGOUA, G.M. et al. Minor secondary metabolic products from the stem bark of *Plumeria rubra* Linn. displaying antimicrobial activities. **Planta Med.** v. 76, p. 620-625, 2010.

KUKAR, M.; PETRYNA, O.; EFTHIMIOU, P. Biological targets in the treatment of rheumatoid arthritis: a comprehensive review of current and in-development biological disease modifying anti-rheumatic drugs. **Biologics.** v. 3, p. 443-57, 2009.

KUMAR, V.L.; CHAUDHARY, P.; RAMOS, M.V.; MOHAN, M.; MATOS, M.P. Protective Effect of proteins derived from the latex *Calotropis procera* against inflammatory hyperalgesia in monoarthritic rats. **Phytother. Res.**, v.25, p.1336-1341, 2011.

KUMAR VL, GURUPRASAD B, CHAUDHARY P, FATMI SM, OLIVEIRA RS, RAMOS MV. Protective effect of proteins derived from **Calotropis procera** latex against acute inflammation in rat. **Auton Autacoid Pharmacol.**, v. 35, p. 1-8, 2015.

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

LAURINDO, I. M. M. et al. Artrite reumatóide: diagnóstico e tratamento. **Rev. Bras. Reumatol.**, v.44, n. 6, 2004.

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

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: na overview. **The Lancet**, v. 353, p.1607-1609, 1999.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 2. ed. São Paulo: **Instituto Planatarum**. p. 250, 1999.

LORENZO, J. A. The role of cytokines in the regulation of local bone resorption. **Critical Reviews in Immunology**, v. 11, n. 3-4, p. 195-213, 1991.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with follin phenol reagent. **J Biol Chem**. v. 193, p. 265-275, 1951.

LIMA RC, SILVA MC, AGUIAR CC, CHAVES EM, DIAS KC, MACÊDO DS, DE SOUSA FC, CARVALHO KDE M, RAMOS MV, VASCONCELOS SM. Anticonvulsant action of *Calotropis procera* latex proteins. **Epilepsy Behaveb.**, v.23, p.123-6, 2012.

LIMA-FILHO, J.V.M.; PATRIOTA, J.M.; SILVA, A.F.; FILHO, N.T.; OLIVEIRA, R.S.B.; ALENCAR, N.M.N.; RAMOS, M.V. Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enteric* serovar Typhimurium. **J. Ethnopharmacol.**, v.129, p.327-334, 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. **Universidade Federal do Ceará.**, 2012.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Acid phosphatases from latices of Euphorbiaceae. **Phytochemistry**. v.26, p.655-657, 1987.

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

MACGREGOR, A. J. et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using from twins. **Arthritis reumathoid**, v. 43, n. 1, p. 30–37, 2000.

MCGREGOR, A. J. Classification criteria for rheumatoid arthritis. **Baillieres Clin Rheumatol.**, v. 9, n. 2, p. 287-304, 1995.

MILLER, M. C. et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase is a crucial promoter of synovial invasion in human rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**. v. 60, n. 3, p. 686-97, 2009.

MIOSSEC, P. An update on the cytokine network in rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol.**, v.16, n.3, p. 218-22, 2004.

MOLLACE, V. et al. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. **Pharmacol. Reviews**. v. 57, p. 217-252, 2005.

MONCADA, S. et al. Increased concentrations of nitrite in the synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 51, p. 1219-1222, 1992.

MOR, A.; ABRAMSON, S. B.; PILLINGER, M. H. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. **Clin immunol.** v. 115, n. 2, p. 118–28, 2005.

MORCELLE, R. S.; CAFFINI, N. O.; PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funarium clausum* latex. **Fitoterapia.**; v. 75, p. 480–493, 2004.

MOTA, L. M. H. et al. 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. et al. Consensus of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and early assessment of rheumatoid arthritis. **Rev Bras Reumatol.** v. 51, n. 3, p. 199–219, 2011.

MOURSY, L. E. Insecticidal activity of *Calotropis procera* extracts of the flesh fly, *Sarcophaga haemorrhoidalis* fallen. **J Egypt Soc Parasitol.** v.27, p.505-514, 1997.

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

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

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

NOBACK, C.R.; STROMINGER, N.L.; DAMAREST, R.J. The human nervous system: structure and function. In: Pain and temperature. 5.ed. New York: Williamns & Wilkins, p.123-37, 1996

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, R.S.B.; FIGUEIREDO, I.S.T.; FREITAS, L.B.N.; PINHEIRO, R.S.P.; BRITO, G.A.C.; ALENCAR, N.M.N.; RAMOS, M.V.; RALPH, M.T.; LIMA-FILHO, J.V. Inflammation induced by phytochemical proteins from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against *Salmonella* infection in a murine model of typhoid fever. **Inflamm Res**, v.61, p.689–698, 2012.

OLIVEIRA, J.S.; COSTA-LOTUFO, L.V.; BEZERRA, D.P.; ALENCAR, N.M.; MARINHO-FILHO, J.D.; FIGUEIREDO, I.S.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; ALVES, A.P.; RAMOS, M.V. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v.382, p.139-149, 2010.

OLIVER, S.J.; BRAHN, E. Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective. **J. Rheum.**, V.23, p. 56-60, 1996.

PELLETIER, J. P. *et al.* Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic synovial fluid. **Curr. Rheumatol. Resp.** v.3, p.535-541, 2001.

PINTO, L. G. *et al.* IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. **Pain**, v. 148, n. 2, p. 247-256, fev. 2010.

PINHEIRO, R. S. P. Efeito gastroprotetor de uma fração proteica isolada do látex de *Plumeria rubra* L. (APOCYNACEAE) em lesão gástrica induzida por etanol: envolvimento dos receptores TRPV1, da via do NO/GMPc/K_{ATP} e da glutatona. **Universidade Federal do Ceará.**, 2012.

RAMOS, M.V.; GRANGEIRO, T.B.; FREIRE, E.A.; SALES, M.P.; SOUZA, D.P.; ARAÚJO, E.S.; FREITAS, C.D.T. The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. **Arthropod Plant Interact**, v.4, p.57-67, 2010.

RAMOS, M.V.; OLIVEIRA, J.S.; FIGUEIREDO, J.G.; FIGUEIREDO, I.S.T.; KUMAR, V.L.; BITTENCURT, F.S.; CUNHA, F.Q.; OLIVEIRA, R.S.B.; BOMFIM, L.R.; LIMA-FILHO, J.V.; RAMOS, M.V. Involvement of NO in the inhibitory effect of *Calotropis procera* latex protein fractions on leukocyte rolling, adhesion and infiltration in rat peritonitis model. **J. Ethnopharmacol.**, v.125, p.1-10, 2009.

RAMOS, M.V.; VIANA, C.A.; SILVA, A.F.; FREITAS, C.D.; FIGUEIREDO, I.S.; OLIVEIRA, R.S.; ALENCAR, N.M.; LIMA-FILHO, J.V.; KUMAR, V.L. Proteins derived from latex of *Calotropis procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin-and plasmin-like activities. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 385, p.455-463, 2012.

RAMOS MV, DE ALENCAR NM, DE OLIVEIRA RS, FREITAS LB, ARAGÃO KS, DE ANDRADE TA, FRADE MA, BRITO GA, DE FIGUEIREDO IS. Wound healing modulation by a latex protein-containing polyvinyl alcohol biomembrane. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** v 389, p. 747-756, 2016.

ROCHA, F.A.C., ARAGÃO, Jr.A.G.M., OLIVEIRA, R.C., POMPEU, M.M.L., VALE, M.R., RIBEIRO, R.A. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan – induced arthritis in rats. **Inflammation Research**, v. 48, n. 9, p. 485-490, 1999.

ROCHA, J. C. S. *et al.* Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan induced arthritis in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 136, p. 588-596, 2002.

ROCHA, F.AC., TEIXEIRA, M.M., ROCHA, J.C.S., GIRÃO, V.C.C., BEZERRA, M.M., RIBEIRO, R.A., CUNHA, F.Q. Blockade of leukotriene B4 prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. **European Journal of Pharmacology**, v. 497, n. 1, p. 81– 86, 2004.

ROCHA, F. A. C. et al. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflamm Res**, v.48, p.485-490, 1999.

ROCHA, F.A.C., DE BRUM-FERNANDES, A.J. Evidence that peroxynitrite affects human osteoblast proliferation and differentiation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 3, p. 434-442, 2002.

ROCHA, F. A. et al. Tadalafil analgesia in experimental arthritis involves suppression of intra-articular TNF release. **Br J Pharmacol**. v. 164, n. 2, p. 828-35, 2011.

ROUBILLE, C. et al. The effects of tumour necrosis factor inhibitors, methotrexate, non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids on cardiovascular events in rheumatoid arthritis, psoriasis and psoriatic arthritis: a systematic review and meta-analysis. **Ann Rheum Dis**. v. 74, p. 480-9, 2015.

SAHEBARI, M. et al. Pro-oxidant- Antioxidant Balance (PAB) in Rheumatoid Arthritis and its Relationship to Disease Activity. **Curr Rheumatol Rev**. 2015.

SCHIMMER, B.P.; FUNDER, J.W. **Pharmacokinetics and pharmacodynamics**. The dynamics of drugs absorption, distribution, action, and elimination. In:

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

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SILVA, C. et al. **Administração oral de peptídios 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.

SRITANYARAT, W. et al. Isolation and characterization of iso-inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber tree, *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**. v.67, p.1644-1650, 2006.

STAHL, E. A. et al. Genome-wide association study metaanalysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. **Nat Genet**. v. 42, n. 6, p. 508-14, 2010.

SOARES, P. M.; LIMA S. R.; MATOS, S. G.; ANDRADE, M. M.; PATROCÍNIO, M. C. A.; FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V.; CRIDDLE, D. N.; CARDI B. A.; CARVALHO, K. M.; ASSREUY, A. M. S.; VASCONCELOS S. M. M. Anti-nociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.99, p.125-129, 2005.

SUSSMAN, G. L.; BEEZHOLDB, D. H.; LISSC, G. Latex allergy: historical perspective. **Methods.** v. 27, p.3-9, 2002.

SWEENEY, S. E.; FIRESTEIN, G. S. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. **Int. J Biochem Cell Biol.** v. 36, n. 3, p. 372–378, 2004.

TAYLON, I.H. et al. The beta-glucan receptor, dectin -1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. **J. Immunol.**, v.169, p. 3878-3882, 2002.

TARRANT, T. K.; PATEL, D. D. Chemokines and leukocyte trafficking in rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, v.13, p.1-14, 2006.

TEH, J. *et al.* Power Doppler ultrasound of rheumatoid synovitis: quantification of therapeutic response. **Br. J. Radiol.**, v. 76, n. 912, p. 875-879, 2003.

THOMSON, N. et al. Chemoattraction of human T cells by IL-18. **J Immunol.** v.170, p. 1084-90, 2003.

TREVISANI, V. F. M.; FIDELIX, T. S. A.; APPENZELLER, S. Uso dos anti-inflamatórios não hormonais na artrite reumatoide, osteoartrite e na lombalgia. **RBM.** v. 69, n. 1/2, 2011.

TURESSON, C.; MATTESON, E. L. Vasculitis in rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol.** v. 21, n. 1, p. 35-40, 2009.

USNAYO, M. J. G. et al. 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.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemicobiological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

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

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiol Mol Plant Pathol.** v. 55, p. 85-97, 1999.

VAN VENROOIJ, W. J.; VOSSENAAR, E. R.; ZENDMAN, A. J. Anti-CCP antibodies: the new rheumatoid factor in the serology of rheumatoid arthritis. **Autoimmun.Rev.**, v.3, p.S17-S19, 2004.

VOGELPOEL, L. T. C. et al. Control of cytokine production by human Fc gamma receptors: implications for pathogen defense and autoimmunity. **Front Immunol.** v. 6, p. 79, 2015.

VOLTARELLI, J. C. Febre e inflamação. **Medicina, Ribeirão Preto.** v. 27, n. 1/2, p. 7-48, 1994.

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

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.

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

WILLMENT, J. A. et al. Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone and lipopolysaccharide. **Journal of Immunology.**, v.171, p. 4569-4573, 2003.

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

ZHANG, W. et al. Validity of the work productivity and activity impairment questionnaire--general health version in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Res. Ther.** v. 12, n. 5, p. 1-7, 2010.