



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA

BEATRIZ TORRES DE MELO CAVALCANTE

**PRÉ-CONDICIONAMENTO NUTRACÊUTICO COM MISTURAS DE ÓLEOS
ÔMEGA 3, 6 E 9 NA ARTRITE AGUDA INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS**

FORTALEZA

2014

BEATRIZ TORRES DE MELO CAVALCANTE

PRÉ-CONDICIONAMENTO NUTRACÊUTICO COM MISTURAS DE ÓLEOS ÔMEGA
3, 6 E 9 NA ARTRITE AGUDA INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mariana Lima Vale

FORTALEZA

2014

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

-
- C364p Cavalcante, Beatriz Torres de Melo.
Pré-condicionamento nutracêutico com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 na artrite aguda induzida por zymosan em ratos / Beatriz Torres de Melo Cavalcante. – 2014.
110 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Mestrado em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Metabolismo, Fisiologia e Biologia Celular no Estresse.
Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.
Coorientação: Profa. Dra. Mariana Lima Vale.
1. Ácidos Graxos Ômega-3. 2. Artrite. 3. Inflamação. 4. Articulações. I. Título.

BEATRIZ TORRES DE MELO CAVALCANTE

PRÉ-CONDICIONAMENTO NUTRACÊUTICO COM MISTURAS DE ÓLEOS ÔMEGA
3, 6 E 9 NA ARTRITE AGUDA INDUZIDA POR ZYMOZAN EM RATOS

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a. Dr^a. Maria Luisa Pereira de Melo
Universidade Estadual do Ceará - UECE

A Deus, que se mostra sempre presente na minha vida.

Aos meus avós, Artur de Freitas Torres de Melo e Margarida Nunes Torres de Melo, pelo exemplo, além de confiança e amor depositados em mim.

Aos meus pais, Joaquim Izídio Neto e Margarida Maria Torres de Melo, pelo amor, incentivo e apoio durante toda a minha vida, sem os quais eu não teria alcançado os meus objetivos.

Aos meus irmãos, Carolina Torres de Melo e Rafael Torres de Melo, pela confiança, força e amizade.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, Coordenador do Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, meu orientador, pela oportunidade do meu ingresso na pós-graduação, pelo incentivo no início da pesquisa, gentil orientação e por seus ensinamentos passados.

À Dr^a MARIANA LIMA VALE, Professora do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) da Universidade Federal do Ceará, minha co-orientadora, agradeço pelo tempo dedicado à orientação, por me ensinar o caminho da pesquisa, pela paciência, atenção e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dr^a GERLY ANNE DE CASTRO BRITO, Professora do Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagens (NEMPI) da Universidade Federal do Ceará pela colaboração nas leituras histológicas.

À Dr^a ANA PAULA MACEDO SANTANA, Doutora em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, por me ajudar a executar alguns experimentos fundamentais do trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, pelos conhecimentos transmitidos nas disciplinas cursadas.

Ao Dr. FRANCISCO FÁBIO BEZERRA DE OLIVEIRA, Mestre em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, meu agradecimento por sua dedicação e paciência na realização de todos os experimentos, na qual sem sua ajuda nada seria possível. Obrigada por tudo.

Ao aluno da Iniciação Científica, JOHNATA Kael MARINHO, pela dedicação e exímia ajuda, de domingo a domingo, durante toda a fase experimental.

À nutricionista ALINE MATOS CUNHA, pelo preparo das misturas de óleos e presteza com a qual atendeu às minhas inúmeras solicitações.

Às secretárias do programa de Pós-Graduação em Cirurgia, MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e MAGDA GOMES FONTENELE, secretárias do Programa de Pós-

Graduação *Strictu Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, por todo o apoio, compreensão e dedicação permanente aos alunos do Programa.

Às técnicas do laboratório MARIA DO SOCORRO FRANÇA MONTE e MARIA SILVANDIRA FRANÇA PINHEIRO, pela disponibilidade em ajudar e pelo apoio fundamental.

Ao Sr. BENTO FRANCISCO DE OLIVEIRA, técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina, pela atenção e prontidão com que atendeu às solicitações.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio de bolsa concedida à autora deste projeto.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.”

Roberto Shinyashiki

RESUMO

A artrite é uma condição inflamatória que afeta as articulações sinoviais. Os sintomas mais relevantes são aumento da sensibilidade à dor nas articulações e edema. Uma possível alternativa para o tratamento adjuvante da doença é a inclusão de nutracêuticos na dieta oral. No presente estudo foi realizado o pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 em um modelo experimental de artrite aguda em ratos por *zymosan* (Zy). O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo das misturas (MIX) de óleos, contendo elevada relação ω -9/ ω -6 (3,4:1) e baixa relação ω -6/ ω -3 (1,4:1) na artrite por Zy. As misturas oleosas continham diferentes fontes de ω -3: MIX-1, contendo o ácido α -linolênico; MIX-2, os ácidos α -linolênico, eicosapentaenóico e docosaexaenóico, e o MIX-3, os ácidos α -linolênico e docosaexaenóico. Os ácidos graxos monoinsaturados ω -9 têm ação antioxidante, os poliinsaturados ω -3 possuem ação anti-inflamatória, enquanto os ω -6 são pró-inflamatórios. Foram utilizados 30 ratos *Wistar* machos com peso médio corporal de 180-200 gramas, para cada grupo experimental. Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em dois grupos: o Controle (n=12) e o Teste (n=18). O grupo controle foi subdividido em dois grupos: Controle negativo cujos animais receberam água, por via orogástrica, durante 7 dias (n=6). Controle positivo, cujos animais não receberam nenhum dos MIX, durante esses sete dias e foram tratados com dexametasona (DEXA- n=6) no dia do experimento (dia 8). O grupo Teste foi subdividido em três grupos de 6 animais submetidos à administração orogástrica de MIX-1, MIX-2 e MIX-3, respectivamente. No 8º dia, em todos os grupos (Controle e Teste) foi induzida a artrite por meio de uma injeção intrarticular (i.a.) de *zymosan* (1mg/50 μ L) no joelho direito. As variáveis avaliadas foram: a incapacitação articular (I.A.), migração de leucócitos, atividade de mieloperoxidase (MPO), edema articular, permeabilidade vascular, imunomarcção de iNOS e NF-kB e análise histopatológica. Ainda foram realizados os testes de hipernocicepção induzida por carragenina e PGE2. Os resultados demonstraram uma diminuição significativa ($p < 0,05$), durante a 3ª hora da I.A. (pico de incapacitação) de todos os grupos pré-condicionados com as misturas (MIX-1, 2 e 3) à semelhança do controle positivo por DEXA. Em relação à migração de leucócitos para o líquido sinovial, todos os grupos pré-condicionados com (MIX-1, 2, e 3) apresentaram significativa redução da migração ($p < 0,05$) acompanhado da diminuição do número de neutrófilos e da atividade da MPO ($p < 0,05$) à semelhança do grupo tratado com DEXA. O edema foi inibido ($p < 0,05$) assim como, também, houve uma redução da permeabilidade vascular em todos os grupos pré-condicionados com diferenças significantes ($p < 0,05$), sendo

o efeito maior do MIX-3 ($p < 0,001$) em relação aos outros. A análise histopatológica demonstrou uma diminuição do infiltrado celular e prevenção da perda da integridade da cápsula articular de forma significativa ($p < 0,05$) para os MIX-1 e 2. A marcação para iNOS e NF-kB mostrou uma diminuição nos grupos MIX-1, 2 e 3, igualmente como no grupo da DEXA. Na análise do efeito antinociceptivo no modelo de hiperalgesia mecânica plantar induzido por carragenina, todos os MIX demonstraram efeito inibitório significativo ($p < 0,05$), assim como a indometacina, fármaco usado no controle positivo. Entretanto, isso não foi observado na hiperalgesia induzida por PGE2. Os resultados sugerem que o pré-condicionamento com os MIX- 1, 2 e 3 possuem efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios, diminuindo, também, a expressão de iNOS e NF-kB no tecido sinovial. Porém, o efeito antinociceptivo parece ser indireto e decorrente do seu efeito anti-inflamatório.

Palavras-chave: Pré-Condicionamento. Ácidos Graxos Ômega 3, 6 e 9. Artrite. Zymosan.

ABSTRACT

Arthritis is an inflammatory condition that affects synovial articulations. The most relevant manifestations are decreased pain threshold and edema. A possible alternative as adjuvant therapy to this disease is the inclusion of nutraceuticals in the diet. In the present study preconditioning with mixes of oils omega 3, 6 and 9 was used at an experimental model of acute arthritis induced by zymosan (Zy) in rats. The objective of this study was to evaluate the antiinflammatory and antinociceptive effects of these mixes which contain high omega-9:omega-6 ratio (3.4:1) and low omega-6:omega-3 ratio (1.4:1). These oil mixes contained different sources of omega-3: Mix 1 with alfa-linolenic acid, Mix 2 with alfa-linolenic, eicosapentanoic and docosaexanoic acids, and Mix 3 with alfa-linolenic and docosaexanoic acids. The monounsaturated omega-9 fatty acids present antioxidant action whereas the polyunsaturated fatty acids omega-3 present antiinflammatory effects and the omega-6 fatty acids are proinflammatory. Thirty male wistar rats weighing 180-200g were used, for each experimental group. The animals were randomly distributed in two groups: Control (=12) and Test (n=18). The Control group was subdivided into groups: Negative Control whose animals received water orogastrically during 7 days (n=6), and Positive Controls whose animals received no oil mixes during 7 days but were treated with either dexametazone (DEXA – n=6) at the experiment day (day 8). The Test group was distributed into three groups of 6 rats subjected to orogastric administration of mixes 1, 2 and 3. On day 8 all animals had arthritis induction by intraarticular injection of zymosan (1mg/50microliters) in the right knee. Analised variables were articular incapacitation (A.I.), leucocyte migration, mieloperoxidase (MPO) activity, articular edema, vascular permeability, articular capsule immunostain for iNOS and NF-kB and histopathological analysis. Hypernociception was induced by carrageenan and PGE2. Results demonstrated a significant decrease ($p<0.05$) in A.I. during the third hour in animals preconditioned with mixes 1, 2 and 3, to level similar to that of those treated with DEXA. As concerned to leucocyte migration, there was a significant reduction ($p<0.05$) in the number of leucocytes in the articular wash in rats preconditioned with all three mixes, as well as decreased activity of MPO ($p<0.05$) similar to what was found in animals treated with DEXA. Edema was inhibited and vascular permeability diminished in all groups preconditioned with all mixes ($p<0.05$). In animals of Mix 3 the decrease in vascular permeability was even more pronounced as compared to all other groups ($p<0.001$). Histopathology analysis showed a decrease in cellular infiltration and prevention from loss of articular capsule integrity in rats preconditioned with mixes 1 and 2. Immunohistochemical

stain for iNOS and NFkB was significantly smaller in rats of groups 1, 2 and 3, similar to that of DEXA group. All oil mixes showed a significant inhibitory effect ($p < 0.05$) as concerned to antinociception through the use of a model of plantar mechanic hiperalgia induced by carrageenan, similar to that of rats of INDO group, a drug used in the positive control . On the other hand, the same did not occur when hiperalgia was induced by PGE2. The results therefore suggest that preconditioning with mixes 1, 2 and 3 present antiinflammatory and antinociceptive effects, as well as decreases synovial expression of iNOS and NFkB. However, the observed antinociceptive effect appears to be indirect and due to the antiinflammatory effect.

Keywords: Preconditioning. Omega 3, 6 and 9. Fatty acids. Arthritis. Zymosan.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Inflamação Articular	31
Figura 2 - Bases celulares e moleculares da dor inflamatória	35
Figura 3 - Estrutura dos ácidos graxos ω -3 e ω -6.....	45
Figura 4 - Classificação dos ácidos graxos, segundo a presença de dupla ligação	46
Figura 5 - Mediadores bioquímicos potentes envolvidos na inflamação, infecção, lesão tecidual, modulação do sistema imune e agregação plaquetária	48
Figura 6 - Mediadores bioquímicos menos potentes que a cascata do ω -6, que atuam no processo anti-inflamatório e não inibem o sistema imune	49
Figura 7 - Parte 1- Estímulo induzido por Zymosan (Zy).....	55
Figura 8 - Parte 2- Estímulo induzida pela Carragenina (Cg).....	56
Figura 9 - Parte 3- Estímulo induzida pela PGE2	57
Figura 10 - Artrite induzida por zymosan (teste de incapacitação articular em joelho de rato).....	59
Figura 11 - Teste de hipernocicepção mecânica plantar.....	64
Figura 12 - Efeito antinociceptivo do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato	67
Figura 13 - Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega-3, 6 e 9 sobre a migração celular para cavidade articular de ratos submetidos à artrite induzida por zymosan em joelhos de rato.....	68
Figura 14 - Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) na artrite induzida por zymosan em joelho de rato	70
Figura 15 - Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre o edema articular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato.....	71
Figura 16 - Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a permeabilidade vascular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato.....	72
Figura 17 - Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a imunoexpressão do NF- κ B no tecido sinovial.....	74
Figura 18 - Quantificação da imunoexpressão para NF- κ B em tecido sinovial, de ratos submetidos a artrite por zymosan	75
Figura 19 - Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a imunoexpressão do iNOS no tecido sinovial.....	76

Figura 20 - Quantificação da imunexpressão para iNOS em tecido sinovial, de ratos submetidos a artrite por zymosan	77
Figura 21 - Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre as alterações histopatológicas na artrite induzida por zymosan em joelho de rato.....	79
Figura 22 - Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a hipernocicepção mecânica plantar induzida por carragenina	81
Figura 23 - Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a hipernocicepção mecânica plantar induzida por PGE2	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Representação e abreviação de ácidos graxos insaturados.....	44
Quadro 2 - Soluções e composição com respectiva fonte de ω -3	54
Quadro 3 - Efeito das misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre as alterações histopatológicas na artrite induzida por zymosan em joelho de ratos.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
AG	Ácido graxo
AGPIs	Ácido graxo poliinsaturados
AGS	Ácido graxo saturado
AINEs	Anti-inflamatórios não esteróides
ALA	Ácido α -linolênico
AL	Ácido Linoléico
AMPc	Monofosfato Cíclico de Adenosina
AO	Ácido oléico
AP	Atrite Psoriática
AR	Artrite Reumatóide
ARe	Artrite Reativa
AZy	Artrite induzida por zymosan
BSA	Soro de albumina bovina
C5a	Componente complemento 5a
C3a	Componente complemento 3a
CAMs	Molécula de adesão celular
CFA	Completo Adjuvante de Freund
Cg	Carragenina
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX-1e 2	Ciclooxigenase 1 e 2
DAB	3,3-diaminobenzidina-peróxido
DEXA	Dexametasona
DHA	Ácido docosaexaenóico
DMARDs	Drogas Modificadoras da Doença
DPE	Doença Peridontal Experimental
EA	Espondile Anquilosante
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epitelial
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPA	Ácido eicosapentaenóico

EPM	Erro padrão da média
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina 1
GM- CSF	Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos de Macrófagos
HE	Hematoxilina-eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HTAB	Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio
I.A	Incapacitação Articular
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
i.a.	Intra-articular
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular 1
i.pl.	Intraplantar
IFN- γ	Interferon gama
IgG1	Imunoglobulina G1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
i.p.	Intraperitoneal
I κ B	Inibidor Kappa B
LAFICA	Laboratório da Farmacologia da Inflamação e do Câncer
LFA-1	Antígeno Associado à Função de Linfócitos 1
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
LTB ₄	Leucotrieno B4
MMP	Metaloproteinase
MPO	Mieloperoxidase

NF-Kb	Fator nuclear-kappa B
NK	Natural Killers
Nm	nanômetro
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOSe	Óxido nítrico sintase endotelial
NOSi	Óxido nítrico sintase induzida
NOSn	Óxido nítrico sintase neuronal
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPCC	Óleo de Pequi (<i>Caryocar coriaceum</i>)
PAF	Fator de Agregação Plaquetária
PBS	Tampão Fosfato Salina
Pg	Picograma
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
PMN	Polimorfonucleares
PKA	Proteína Quinase A
PKC	Proteína Quinase C
PPAR	Receptor de ativação de proliferação de peroxissomas
RPM	Rotações por Minuto
RLs	Radicais Livres
s.c.	Subcutânea
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR	Receptor do Fator de Necrose Tumoral
TSP	Tempo de Suspensão da Pata
TX	Tromboxano
v.o.	Via Oral
VCAM-1	Proteína de Adesão da Célula Vascular 1

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
C	Carbono
-COOH	Carboxila
Δ	Delta
γ	Gama
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
-OH	Hidroxila
=	Igual a
K	Kapa
>	Maior que
+	Mais
\pm	Mais ou menos
®	Marca Registrada
<	Menor que
CH ₃ -	Metila
μL	Microlitro
μm	Micrometro
ω	Ômega
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Pré-condicionamento	21
1.2 Inflamação	24
1.3 Mediadores Celulares na Inflamação Articular (AR)	29
1.4 Nocicepção e Dor Inflamatória	32
1.5 Artrite e Fármacos Empregados	36
1.6 Modelos Experimentais da Artrite que mimetizam a AR	39
1.6.1 Artrite Induzida por zymosan	41
1.7 Ácidos Graxos	42
1.7.1 Classificação e Nomenclatura dos Ácidos Graxos	43
1.7.2 Ácidos Graxos e Inflamação.....	46
1.8 Justificativa	50
2 OBJETIVO	52
2.1 Objetivo Geral	52
2.2 Objetivos Específicos	52
3 MÉTODO	53
3.1 Aspectos Éticos	53
3.2 Animais	53
3.3 Delineamento Experimental	53
3.3.1 Divisão dos Grupos de Estudo	53
3.4 Protocolos Experimentais	57
3.4.1 Indução da Artrite por Zymosan em Joelho de Rato	57
3.4.2 Análise da Incapacitação Articular (Hipernocicepção).....	58
3.4.3 Coleta do Lavado Articular	59
3.4.4 Contagem Total de Leucócitos	59
3.4.5 Contagem Diferencial de Leucócitos	60
3.4.6 Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO)	60
3.4.7 Coleta do Tecido Sinovial de Joelho de Rato.....	60
3.4.8 Análise de Edema nas Articulações do Joelho	61
3.4.9 Permeabilidade Vascular por Extravasamento de Azul de Evans na Articulação	61
3.4.10 Análise Imunohistoquímica para detecção de NF- κ B e iNOS	62
3.4.11 Análise Histopatológica Articular	63

3.4.12 Teste de Hipernociceção Mecânica Plantar.....	63
3.5 Análise Estatística.....	64
4 RESULTADOS	66
4.1 Efeito antinociceptivo do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato.....	66
4.2 Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega-3, 6 e 9 sobre o infiltrado de leucócitos na artrite induzida por zymosan em joelhos de rato	67
4.3 Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a atividade de mieloperoxidase na artrite induzida por zymosan em joelho de rato.....	69
4.4 Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre o edema articular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato	70
4.5 Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a permeabilidade vascular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato	71
4.6 Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a imunoexpressão do NF-kB e iNOS no tecido sinovial	73
4.7 Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre as alterações histopatológicas na artrite induzida por zymosan em joelho de rato.....	77
4.8 Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a hipernociceção mecânica plantar induzida por carragenina	80
4.9 Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a hipernociceção mecânica plantar induzida por PGE2.....	81
5 DISCUSSÃO	83
6 CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS	93
APÊNDICE A - DADOS BRUTOS	108
ANEXO A - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	110

1 INTRODUÇÃO

As afecções articulares englobam um grande número de doenças que têm em comum o comprometimento do sistema musculoesquelético, ou seja, ossos, cartilagem, estruturas periarticulares (localizadas próximas às articulações, tendões, ligamentos e fâscias) e/ou músculos. Destacam-se por serem altamente prevalentes, afetando 3 a 8 % da população mundial. Esta realidade provoca importante impacto médico, social e econômica decorrente de sua significativa frequência na população causando o afastamento no trabalho e do gasto das entidades pública e privada (BRESSAN, 2005).

Segundo relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), as condições reumáticas ou musculoesqueléticas compreendem mais de 150 doenças e síndromes que são frequentemente progressivas e associadas com dor. Dentre as condições com maior impacto na sociedade incluem-se a artrite reumatóide, as osteoartrites, as espondiloartropatias (espondilite anquilosante, artrite reativa, etc.), a osteoporose, as desordens espinhais e o trauma severo de membros (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2003 apud BRESSAN, 2005).

Dentre as várias artropatias, a artrite reumatóide (*reumatoid arthritis*, AR) é a artrite inflamatória mais comum (prevalência mundial estimada em 0,8%) (BRAUN; SIEPER, 2002) e a maior causa de invalidez. O processo inflamatório pode ser gerado em decorrência de uma lesão tecidual, do contato do organismo com agentes infecciosos como bactérias, vírus e fungos ou ainda, de forma inapropriada por meio do reconhecimento de componentes do organismo como sendo não próprios pelo sistema imune. Neste último caso, a inflamação acaba sendo prejudicial ao organismo, contribuindo para o estabelecimento das lesões teciduais como as que ocorrem em algumas doenças inflamatórias, entre elas a AR (WEISSMANN; KORCHAK, 1984; WEISS, 1989).

A dor é um dos principais sintomas da AR, levando o paciente a procurar tratamento, uma vez que esta incapacita a realização de atividades diárias, comprometendo a qualidade de vida do indivíduo (PINTO, 2010). A terapêutica convencional de primeira escolha são os anti-inflamatórios não esteroidais, drogas modificadoras da doença e glicocorticóides. Porém o uso, em longo prazo, dessas drogas resulta em desordens hepáticas e gastrointestinais somadas aos custos elevados desses fármacos quando usados ao longo do tratamento (OLIVEIRA, 2013).

Uma alternativa para o tratamento adjuvante dessa doença pode vir a ser a inclusão de alguns nutrientes isolados, ou combinados, administrados em doses farmacológicas, classificados como nutracêuticos ou fármacnutrientes. Estes nutrientes têm sido utilizados como modificadores da resposta biológica exercendo ações antioxidantes (ácidos graxos monoinsaturados ω -9), ações anti-inflamatórias (ácidos graxos poliinsaturados ω -3) e ações pró-inflamatórias (ácidos graxos poliinsaturados ω -6). Quando a relação entre ω -9 e ω -6 é maior que 1 (ω -9/ ω -6 > 1), ocorre função anti-oxidante. Quando a relação entre ω -6 e ω -3 é menor que 4 (ω -6 / ω -3<4), uma função anti-inflamatória é desencadeada (VASCONCELOS, 2013).

Esse estudo mostra pela primeira vez, à luz da literatura consultada, o efeito, por via oral, do uso de misturas de lipídios (ácidos graxos) ω -3, 6 e 9, ofertadas antes do estabelecimento do processo inflamatório (pré-condicionamento) em modelo de artrite aguda experimental induzida por zymosan.

1.1 Pré-condicionamento

Pré-condicionamento é um conceito no qual um organismo, quando é exposto propositalmente a um estímulo, seja este nocivo ou não, há o estabelecimento de maior resiliência, tolerância ou proteção contra uma situação adversa subsequente. O pré-condicionamento sugere, portanto, a necessidade de exposição a uma condição prévia frente a uma situação posterior. A vacinação e a prática de atividade física são exemplos comuns de pré-condicionamento (PINHEIRO, 2011). Existem na literatura dois tipos de pré-condicionamento relatados: o pré-condicionamento isquêmico (nocivo) e o nutracêutico (não nocivo).

O pré-condicionamento isquêmico é a técnica por meio da qual uma isquemia breve e subletal protege um tecido de lesões isquêmicas subsequentes mais graves (BHUIYAN; KIM, 2010; STAGLIANO et al., 1999). Murry, Jennings e Reimar (1986) descreveram em um modelo experimental de oclusão intermitente de artérias coronárias (5 minutos de oclusão seguidos por reperfusão), proteção miocárdica contra um evento isquêmico mais intenso (40 minutos de oclusão). O conceito de pré-condicionamento isquêmico já havia sido aplicado ao cérebro por Pérez-Pinzón et al. (1996).

Quanto ao pré-condicionamento nutracêutico, é um método no qual são utilizados suplementos alimentares que contém a forma concentrada de um composto bioativo com a finalidade de melhorar a saúde em doses que excedem aquelas que poderiam ser obtidas da

dieta alimentar (ZEISEL, 1999). O termo nutracêutico, ou fármacônútriente, faz referência a um alimento, ou parte de um alimento, capaz de proporcionar benefícios à saúde, incluindo prevenção e/ou tratamento de doenças (ANDLAUER; FÜRST, 2002). Esses produtos podem incluir desde nutrientes isolados, suplementos dietéticos na forma de suplementos orais e cápsulas, até produtos benéficamente projetados, e alimentos processados tais como cereais, sopas e bebidas. Podem ser classificados como nutracêuticos as fibras dietéticas, ácidos graxos poliinsaturados, proteínas, peptídios, aminoácidos ou cetoácidos, minerais, vitaminas antioxidantes e outros antioxidantes. Em suma, é uma substância de ocorrência natural, com evidente efeito benéfico à saúde, que faz parte como ingrediente de alimentos específicos, alimentos funcionais ou suplementos alimentares (MORAES; COLLA, 2006).

O trauma e procedimentos cirúrgicos podem induzir alterações graves no sistema imunológico, o que resulta em uma elevação das taxas de complicações pós-operatórias, sépticas e inflamatórias. Até mesmo a imunonutrição pós-operatória realizada de forma agressiva não é capaz de prevenir a imunossupressão na primeira semana após o procedimento, podendo apenas melhorar, e não reverter, a resposta imunológica e catabólica ao trauma (SENKAL et al., 1999).

Embora vários fatores influenciem a recuperação do paciente, tais como dietas imunomoduladoras, técnicas de assepsia e habilidade cirúrgica, a terapia nutricional é uma estratégia potencialmente benéfica para reduzir infecções e melhorar a morbidade. Estudos prévios indicam que o estado nutricional pré-operatório é um importante fator preditivo de complicações pós-operatórias, uma vez que afeta de forma considerável a imunidade e a resposta inflamatória (NAKAMURA et al., 2005; XU et al., 2006; ZHENG et al., 2007). Portanto, iniciar imunonutrição no período pré-operatório é, provavelmente, mais efetivo, por melhorar o estado nutricional e reduzir as complicações pós-operatórias (SENKAL et al., 1999).

O período mais indicado para se iniciar uma suplementação parece ser antes do evento traumático, ou seja, no período pré-operatório. Vários ensaios mostraram efeitos benéficos da suplementação de substâncias como arginina, ácidos graxos essenciais e ácidos nucléicos em período de 5 a 7 dias antes do ato cirúrgico, provocando diminuição de 30 a 50% nas taxas de complicações (MARTINDALE; McCLAVE; McCARTHY, 2013). Essa observação encoraja a idéia atual de que os nutrientes capazes de modular funções imunológicas/inflamatórias devem ser administrados antes da cirurgia, para que, no momento do traumatismo, já se tenha elevação de seus níveis teciduais e plasmáticos (TORRINHAS; RODRIGUES; WAITZBERG, 2013). A terapia nutricional especializada, com o uso de imunonútrientes ou

nutracêuticos, pode ser considerada uma forma de profilaxia contra a morbidade pós-operatória (WAITZBERG et al., 2006).

Há algumas publicações que remetem ao conceito de pré-condicionamento em vários trabalhos. O emprego da ornitina alfa-cetoglutarato na isquemia-reperfusão intestinal em ratos diminuiu a lesão tecidual (GONÇALVES, et al., 2011). O uso do dipeptídeo L-alanil-glutamina reduziu a peroxidação lipídica na isquemia e protegeu o testículo de ratos contra o estresse oxidativo (LEITÃO et al., 2011). Este dipeptídeo também restringiu a lesão de isquemia e perfusão promovendo proteção hepática no fígado de ratos (ARAÚJO JÚNIOR et al., 2011). O uso endovenoso de l-alanil-glutamina (50g) no período pré-operatório imediato atenuou os danos em tecidos musculares e protegeu contra o estresse oxidativo em pacientes com isquemia crítica em membros inferiores submetidos a revascularização arterial (ALVES et al., 2010). Este dipeptídeo, administrado por via endovenosa na dose de 0,5g/kg de peso diminuiu a resposta inflamatória aguda no período pós-operatório imediato em crianças submetidas à palatoplastia (CUNHA FILHO et al., 2011). Estudos experimentais de isquemia/reperfusão cerebral demonstraram redução do estresse oxidativo, da degeneração nuclear e da morte celular em cérebros de Gerbils da Mongólia pré-condicionados com l-alanil-glutamina (PIRES et al., 2011).

Estudo relacionando pré-condicionamento com o uso de ácidos graxos ômega-3 foi publicado por Abdukeyum, Owen e McLennan (2008), no qual os autores demonstraram limitação da lesão cardíaca isquêmica e infarto do miocárdio em coração de rato, de forma semelhante ao pré-condicionamento isquêmico (estímulo nocivo). Já no estudo de Coelho et al. (2011), o pré-condicionamento com ácidos graxos ômega-3 minimizou a isquemia e perfusão hepática em modelo experimental em rato. McGuinness et al. (2006) demonstraram que os ácidos graxos ômega-3 utilizados protegeram o miocárdio diminuindo o tamanho do infarto por dois possíveis mecanismos: elevação da regulação de HSP-72 e aumento da presença de ômega 3 nas membranas miocárdicas.

Há estudos reportados na literatura sobre o pré-condicionamento com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9. Pinheiro et al. (2011), verificaram que tais misturas de óleos protegeram os neurônios cerebrais da lesão de isquemia e perfusão em ratos. Vasconcelos (2013) utilizou o pré-condicionamento com misturas de óleos, e demonstrou redução das características da inflamação crônica na periodontite experimental. Por outro lado, em estudos clínicos, Tavares (2013) e Cavalcante (2013) não demonstraram diferença em marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em pacientes pré-condicionados com suplemento oral contendo arginina e óleos ômega 3, 6 e 9.

1.2 Inflamação

A inflamação ou flogose (do latim *inflamare*, do grego *phlogos*, que significa pegar fogo) é uma reação complexa dos tecidos conjuntivos vascularizados em resposta a estímulos endógenos ou exógenos que podem causar dano celular (BRASILEIRO FILHO, 2011). Esse mecanismo de defesa do organismo tem como objetivo destruir, imobilizar ou diluir o agente lesivo que podem ser estímulos agressores de origem química (toxinas, substâncias cáusticas), física (radiação, trauma, queimaduras) ou biológica (bactérias, vírus) (IWALEWA et al., 2007; ROBBINS; CONTRAN, 2005). Os estímulos endógenos seriam derivados de degenerações ou necroses tissulares e de alterações na resposta imunológica, por imunocomplexos ou reações autoimunes. Já os exógenos podem ser atribuídos a agentes físicos, químicos e/ou biológicos (PEREIRA; BOGLIOLO, 2004). Essa resposta inflamatória localizada se instala para eliminar o agente de lesão ensejando iniciar a recuperação da integridade tecidual local (SCHMID-SCHONBEIN, 2006; GALLIN; SNYDERMAN, 1999; MAJNO, 1961).

Cada estímulo provoca um padrão de resposta inflamatória, proporcional a sua intensidade, porém com variação relativamente pequena em sua natureza. Essas variações resultam na necessidade de abordagens corretivas diferentes para cada situação (INSEL, 1996; GALLIN; SNYDERMAN, 1999).

A capacidade em desenvolver uma resposta inflamatória é fundamental à sobrevivência em vista dos patógenos e lesões ambientais. Estes tipos de reações foram mantidos durante o processo evolutivo em organismos superiores. São classificadas em duas formas: aguda e crônica. A forma aguda é de curta duração (minutos, horas ou poucos dias) e sua principal característica é a exsudação do fluido ou proteínas para o interstício, o que provoca edema e migração leucocitária (MAJNO, 1961b; JAMES et al., 2007). A forma crônica é de longa duração (semanas, meses ou anos), pode ser precedida pela forma aguda, entretanto, pode surgir de maneira insidiosa, como resposta de baixo grau, latente e, muitas vezes, assintomática (ROBBINS; CONTRAN, 2005; MEDZHITOV, 2008). Esta forma pode estar associada à presença de linfócitos, macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (DRAY, 1995; ROBBINS, CONTRAN, 2005; MEDZHITOV, 2008). No entanto, o estado de inflamação crônica subclínica gera lesão tecidual incipiente por meio da ativação constante do sistema imune inato (FELDMANN et al., 2004), podendo causar futura manifestação de doenças crônicas não transmissíveis, como as cardiovasculares, diabetes,

obesidade, câncer, dentre outras. O mecanismo pelo qual estes mediadores pró-inflamatórios levam à manifestação dessas doenças parece envolver a atenuação da atividade insulínica, mobilização de gorduras, disfunção endotelial e estresse oxidativo (RODRIGUEZ-VITA; LAWRENCE, 2010).

A inflamação, por ser um mecanismo de defesa natural, consiste em uma cascata de eventos celulares e microvasculares, organizados temporalmente, envolvendo a interação entre diferentes tipos de células inflamatórias, dentre eles incluindo: macrófagos, células polimorfonucleares (PMN) e linfócitos, as quais deixam a corrente sanguínea e atravessam a parede endotelial e são recrutadas para o local da lesão (CALDER, 2006; RODRIGUEZ-VITA; LAWRENCE, 2010). Além dessas células, as células endoteliais (do endotélio) que estão no sítio da lesão, participando ativamente as quais possuem moléculas de adesão específicas para o recrutamento de leucócitos (KIM; DEUTSCHMAN, 2000; CHOI, CHA; JEON, 2012).

Na inflamação, a primeira etapa corresponde a resposta imune inata. Uma das características desta resposta é a “abertura de caminho” para a resposta imune adaptativa, o que normalmente ocorre quando a resposta não foi efetiva no seu propósito, devido às características do agente etiológico. A segunda etapa equivale a resposta imune adaptativa, além dos eventos e mediadores característicos desse tipo de resposta, muitas vezes há também a participação de citocinas hiperalgésicas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) e outros mediadores característicos da imunidade inata. Assim observa-se o desencadeamento de uma resposta tecidual com dor característica de uma resposta inflamatória aguda. Isso é comum nos períodos de agudização da artrite reumatóide, por exemplo.

Macroscopicamente, a reação inflamatória é caracterizada pelos sinais clínicos clássicos, tais como: tumor, calor, rubor, dor e, eventualmente, perda de função do órgão ou tecido lesado (SCHMID-SCHONBEIN, 2006). Dessa maneira, promove um processo inflamatório que envolve uma cascata de eventos celulares bastante organizadas e cronológicas. Este tipo de inflamação envolve, primeiramente a resposta aguda ou imediata, que acontece em curto prazo, geralmente resulta em cura, envolve o surgimento dos quatro sinais cardiais primários da inflamação. O aumento da permeabilidade causado pela inflamação permite o extravasamento de um líquido rico em proteínas para o interstício. (MEDZHITOV, 2008). Este acúmulo de líquido no interstício promove o edema (tumefação). Além disso, ocorre vasodilatação a qual leva ao aumento do fluxo sanguíneo caracterizando o calor e o rubor. A resposta inflamatória aguda evolui a partir de uma fase vascular iniciada pelas células residentes (macrófagos) no tecido imediatamente após o dano. Processos

patológicos causados pela exacerbação de quadros inflamatórios agudos estão entre os maiores desafios de gerenciamento para anestesiistas e profissionais de cuidados intensivos. Sepsis, traumas severos e grandes procedimentos cirúrgicos são exemplos de situações que apresentam os principais componentes inflamatórios agudos (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Se, por algum motivo, a resposta inflamatória aguda falhar na eliminação do agente patogênico, o processo permanece e adquire novas características. O infiltrado de neutrófilos é substituído por macrófagos, e se o recrutamento destas células é insuficiente, uma condição inflamatória crônica se segue, causando a destruição do tecido (perda de função). A fase crônica, em geral, está associada em termos histológicos, à presença de linfócitos e de macrófagos e a substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, que ocorre por meio da proliferação de pequenos vasos sanguíneos (angiogênese) e fibrose (IWALEWA et al., 2007; DRAYTON et al., 2006). Todas as respostas envolvidas nos eventos inflamatórios, em qualquer fase do processo, são ocasionadas por mediadores químicos provenientes de proteínas do plasma sanguíneo ou secretadas de células que se encontram no local, sejam elas residentes ou não (MEDZHITOV, 2008).

Os mediadores de origem tecidual são liberados por células residentes que habitam originariamente determinados tecidos, incluindo macrófagos, mastócitos, linfócitos, fibroblastos e células endoteliais, dentre outras. Duas das mais importantes células residentes são os macrófagos e os mastócitos, que na presença de um agente agressor, são ativadas e liberam mediadores químicos que desencadeiam os eventos iniciais da resposta inflamatória. Esses mediadores liberados, derivados do AA, em destaque com as prostaglandinas, promovem cascata de eventos inflamatórios levando a hipernocicepção. Essa cascata envolve tanto os eventos vasculares quanto os celulares e, desta forma, realizam a quimiotaxia recrutando os leucócitos e outras células de defesa especializadas na fagocitose de restos celulares resultantes do processo inflamatório (CARVALHO et al., 2003 apud TAVARES, 2013). Ao longo do processo causam a amplificação da resposta inflamatória, gerando a evolução desta resposta (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Portanto, caso estes mediadores sejam inibidos pode haver a modulação negativa da inflamação ou vice-versa. Isto justifica a busca de novas drogas que idealmente possam controlar as consequências nocivas do processo inflamatório (ROBBINS; CONTRAN, 2005).

Outros mediadores (tais como a histamina e serotonina) são pré-formados e armazenados nos grânulos de mastócitos, basófilos e plaquetas. Enquanto outros são pré-formados e circulam como precursores inativos no plasma. E por fim, outros mediadores são

produzidos diretamente em resposta à estimulação adequada por indutores da inflamação (OLIVEIRA, 2013).

A quimiotaxia promovida pelas células residentes para o local da lesão podem ser realizadas por quimiotaxinas endógenas e exógenas. As endógenas são os componentes do sistema complemento (C3a e C5a), que são metabólitos do ácido araquidônico (eicosanóides) e as citocinas produzidas pelos macrófagos que agem nos leucócitos. As principais quimiotaxinas exógenas são os produtos bacterianos. A quimiotaxia ocorre através da ligação do estímulo quimiotático a receptores específicos dos leucócitos. Os neutrófilos são as principais células recrutadas para o sítio infeccioso, devido à liberação de mediadores inflamatórios (IL-1 β e TNF- α) (CUNHA et al., 2008). Eles saem do interior do leito capilar para o espaço extracelular envolvendo os seguintes passos: marginação, rolamento, adesão e diapedese (migração através do endotélio). Este processo envolve uma ação combinada de múltiplas moléculas de adesão celular, as quais são classificadas em três famílias: integrinas, imunoglobulinas e selectinas, essas moléculas que participam das interações entre leucócitos e células endoteliais (CRONSTEIN; WEISSMAN, 1993). Quando o neutrófilo chega ao local da lesão, ocorre a ativação leucocitária a que se dá pela produção de metabólitos do ácido araquidônico; degranulação e secreção de enzimas lisossômicas; modulação de moléculas de adesão e potenciação que acontece quando há um mediador que não é capaz de gerar resposta pela célula. Então, outro mediador faz com que a célula responda àquele mediador inicial. Isto ocorre por soma de efeitos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Dentre os componentes moleculares de inflamação, os principais envolvidos são as citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral – TNF- α) e as interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8), anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13); quimiocinas (citocinas com capacidade quimioatrativas); proteínas de fase aguda (PFA); lipídeos bioativos, tais como eicosanóides, produzidos nas vias metabólicas do ácido araquidônico, incluindo produtos da via cicloxigenase (prostaglandinas – PGE e tromboxanos – TX) e da via lipooxigenase (leucotrienos – LT e lipoxinas) (AZEVEDO et al., 2002). A produção de quantidades adequadas de citocinas é benéfica para a resposta à infecção, mas quantidades inapropriadas ou superprodução pode ser perigosa e essas citocinas, especialmente TNF- α , estão implicadas nas causas de algumas das respostas danosas que ocorrem em condições inflamatórias (SIMOPOULOS, 2002).

Existem três mecanismos desencadeados pelo processo inflamatório que merecem destaque: O fator de transcrição NF-K β , a atividade de mieloperoxidase e a expressão de iNOS.

O NO é um mensageiro molecular com múltiplas funções biológicas, sendo produzido por diversos tipos de células. Desempenha um papel relevante em várias áreas, como na transmissão de estímulos nervosos, na fisiologia pulmonar, na coagulação sanguínea, na defesa e imunidade, incluindo a modulação de respostas inflamatórias. É formado a partir do aminoácido L-arginina por um grupo de enzimas denominadas NO sintetases (NOS) (MONCADA et al., 1991). Três isoformas distintas de NOS foram identificadas: uma isoforma neuronal (NOS_n), uma endotelial (NOS_e), e uma isoforma induzida (NOS_i), isolada inicialmente de macrófagos. A ativação da enzima iNOS, resulta na liberação de maior quantidade de NO (concentrações nanomolares) por períodos mais longos. Este mediador tem sido apontado como o mediador adicional dos efeitos das citocinas nas atividades celulares, visto que citocinas são importantes reguladores da síntese de NO em vários tipos de células (LOWIK et al., 1994) Essa liberação de NO produz outras conseqüências biológicas, as quais incluem vasodilatação e danos aos tecidos do hospedeiro, resultando em apoptose, lesão tecidual e dor (LIMA et al., 2008).

Em condições normais, o fator de transcrição NF- κ B encontra-se no citoplasma celular, em repouso e inativo. O mesmo estão ligados a uma ou mais proteínas designadas inibidores de κ B (IkBs), impedindo a translocação do NF- κ B para o núcleo. Para que ocorra a ativação e, conseqüentemente, a translocação do NF- κ B, as proteínas IkBs têm que ser degradadas pelo complexo proteossoma que só acontecerá depois de haver a hiperfosforilação dessas IkBs por ação de proteínas quinases específicas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2005). Na presença de estímulos indutores, durante o processo inflamatório, incluindo vírus, lipopolissacarídeos (LPS), o NF- κ B é ativado e transloca-se para o núcleo (GLEZER et al, 2000). Este se liga a genes específicos inflamatórios e imunes promovendo a ativação destes, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão, as metaloproteinases de matriz (MMP), a COX-2 e óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (VERRI et al., 2006). Este é o fator de transcrição gênica pró-inflamatório mais potente ligando-se a genes específicos, estimulando a produção e a liberação das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6), moléculas de adesão e imunomoduladoras (MONTERA, 2007).

A mieloperoxidase (MPO) é proteína (enzima), contida nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, liberada durante a fagocitose, sendo também encontrada nos monócitos e alguns subtipos de macrófagos teciduais exercendo papel essencial na defesa imune inata (WINTERBOURN; VISSERS; KETTLE, 2000; KLEBANOFF, 2005; LAU; BALDUS, 2006). A MPO pode gerar vários agentes oxidantes e muitos substratos podem ser oxidados, gerando, nesta oxidação, radicais livres e/ou modificação das propriedades destes substratos

(biomoléculas). Por isso, a superexpressão da MPO está relacionada a danos macromoleculares e degradação tecidual (ARNHOLD, 2004) presente em muitas doenças inflamatórias como artrite (HANSSON; OLSSON; NAUSEEF, 2006; LAU et al., 2005; SALAVEJ; SPALTEHOLZ; ARNHOLD, 2006). Por isso, a atividade de MPO é um importante marcador para detecção do estresse oxidativo e um, marcador indireto, da infiltração neutrofílica local (YAP; WHITEMAN; CHEUNG, 2007; BRADLEY et al., 1982). Logo, substâncias que inibam ou modulem a atividade da MPO são promissores agentes terapêuticos para doenças inflamatórias crônicas (REYNOLDS; STEGEMAN; TERVAERT, 2002; REYNOLDS et al., 2006).

1.3 Mecanismos celulares na Inflamação Articular (AR)

A fisiopatologia da AR é bastante complexa e parece ser iniciada quando a resposta imune inata local está instalada. As células da membrana sinovial preparam-se para promover a resposta imune adaptativa em indivíduos mais susceptíveis (FIRESTEIN; ZVAIFLER, 1990). Quando o sistema imunitário adaptativo (celular ou humoral) reconhece antígenos, principalmente, por linfócitos T CD4+ (DOAN; MASSAROTTI, 2005) e desencadeia uma série de mecanismos inflamatórios efetadores distintos, que incluem o recrutamento de leucócitos. A maioria destes mecanismos é mediada por uma série de citocinas e quimiocinas (SILVA-JUNIOR e ROCHA, 2006; PINTO et al., 2010; XU et al., 2013). Trata-se de uma artrite poliarticular simétrica que acomete principalmente as pequenas articulações das mãos e dos pés, e também os joelhos (WALSH et al., 2005).

Hamilton em 1983 já descreveu em seus relatos que o tecido sinovial de pacientes com AR era caracterizado por infiltração de células mononucleares, proliferação e neovascularização da sinóvia (revestimento em torno da articulação) e sinoviócitos do tipo fibroblastos. Já Tarner et al. (2005) referem que a artrite reumatoide caracteriza-se pela sinovite crônica, formação do pannus e destruição óssea, os sinoviócitos e os leucócitos como os macrófagos, linfócitos e neutrófilos são células envolvidas na inflamação da sinóvia tornando-a hiperplásica (DENG; LEONARDO, 2006).

O processo inflamatório da AR é caracterizada por um aumento da infiltração de células imunes (incluindo neutrófilos, macrófagos, células T e B) na membrana sinovial, cavidade articular e tecidos peri-articulares. As células T CD4+ encontram-se em grande quantidade na membrana sinovial de pacientes com artrite reumatóide (MATSUOKA et al., 1991), acredita-se que ela seja desencadeada por estes linfócitos os quais reconhecem

antígenos apresentados pela AR (CHOY; PANAYI, 2001). Esses linfócitos, uma vez ativados, estimulam monócitos, macrófagos, fibroblastos sinoviais e células B (CHIKANZA; KINGSLEY; PANAYI, 1995) Embora os linfócitos T sejam predominantes no infiltrado leucocitário, as células B também estão envolvidas na patogênese da artrite reumatóide (DE VITA et al., 2002), produzindo o fator reumatóide (FR). Cerca de 80% dos portadores de AR apresentam esse fator (KHURANA; BERNEY, 2005). O termo FR engloba um grupo de auto-anticorpos das classes IgG, IgM e IgA.

Os macrófagos, por sua vez, se acumulam na membrana sinovial e na junção cartilagem-*pannus* (interface entre a cartilagem e o sítio com erosão ativa) produzindo algumas citocinas que desempenham um papel importante na condução da ativação das células sinoviais que resulta em inflamação e destruição do osso condral (Figura 1). Essas citocinas são pró-inflamatórias tais como, TNF- α , IL-1, IL-6, quimiocinas (KINNE et al., 2000) que estimulam a atração de leucócitos (PMNs) para a membrana sinovial com subsequente sinovite inflamação sinovial (FELDMANN; BRENNAN; MAINI, 1996). O TNF- α estimula a proliferação de sinoviócitos, induzindo a hiperplasia sinovial e a formação do *pannus*, uma característica marcante da progressão do quadro patológico (DENG et al., 1999; FELDMAN; MAINI, 2003). O “*pannus*” é um tecido localmente invasivo na articulação, um tecido de granulação constituído por células mononucleares e fibroblastos que se transforma em *pannus* fibroso formado de camada vascularizada (COURTENAY et al., 1980). Esse estágio contém infiltrado de células T, B, *natural killer*, plasmócitos, células dendríticas e mastócitos na membrana sinovial (MULLER-LADNER et al., 2005).

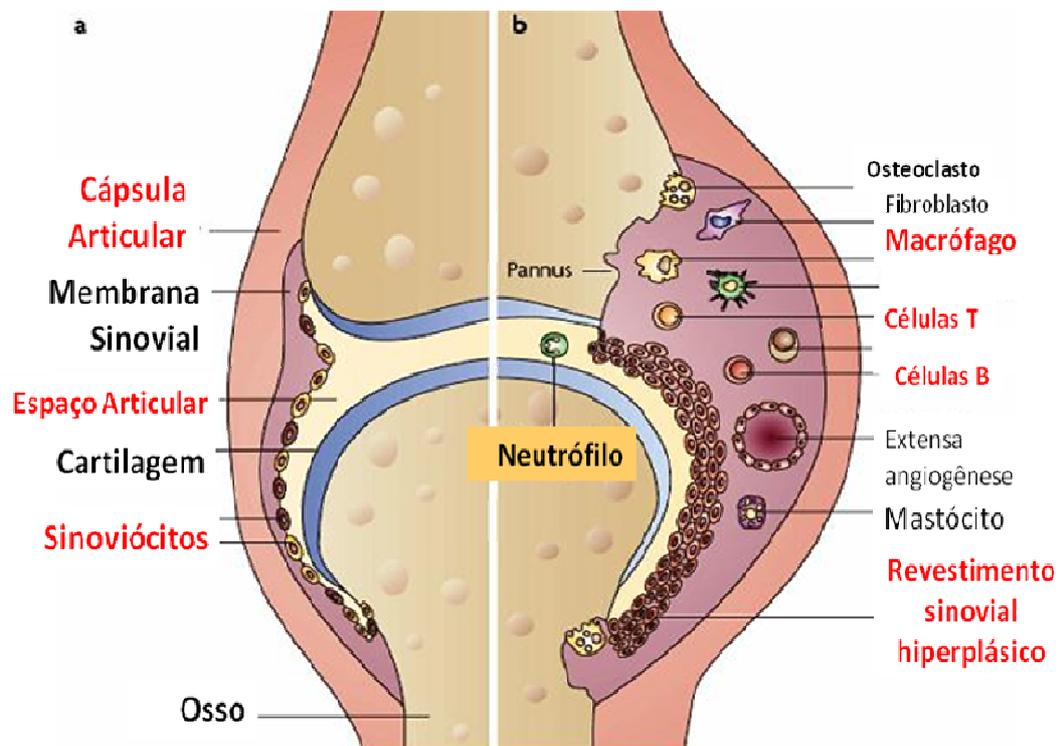
A IL-1 estimula a proliferação de fibroblastos sinoviais e condrócitos que estão envolvidos na regulação da expressão de moléculas de adesão (VCAM-1), citocinas e enzimas degradativas como as metaloproteinases (MMP) e neovascularização (SAKAGUCHI; SAKAGUCHI, 2005; PAP et al., 2000; PINTO et al., 2010). As MMPs são responsáveis por digerirem a matriz extracelular ocasionando erosão e destruição da cartilagem e osso (FIRESTEIN, 2003; HARRIS et al., 1990).

Outro leucócito que merece destaque na patogênese da AR é o neutrófilo, uma das primeiras células a chegar no local acometido, o qual exerce um papel importante no quadro inflamatório agudo (PILLINGER; ABRAMSON, 1995) (Figura 1). Os neutrófilos estimulam a produção de IL-8 e da anafilatoxina C5a no fluido sinovial as quais participam da atração de leucócitos para o interior da articulação e provocam a destruição da cartilagem através da produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enzimas proteolíticas (HARRIS, 1990; CHATHAM et al., 1993). Estudos sugerem que a IL-17 é uma citocina pró-nociceptiva

na artrite, que atua causando dor dependente de neutrófilo, liberação de citocinas (TNF- α , IL-1 β), ligantes de quimiocinas, MMP, endotelinas, prostaglandinas e aminas simpáticas (PINTO et al., 2010). Estudos também sugerem que a IL-33 pode, em parte, contribuir para a patogênese da AR (XU et al., 2013).

Histologicamente, é possível observar hiperplasia da camada íntima da membrana sinovial e a presença de infiltrado inflamatório na camada subítima, resultando em expansão de vilosidades sinoviais, as quais se projetam para dentro do espaço articular (Figura 1). Os mediadores inflamatórios liberados pelas células dos tecidos sinoviais contribuem para a destruição do tecido ósseo e cartilaginoso (WALSH et al., 2005).

Figura 1 - Inflamação Articular



Fonte: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (2011).

A figura ilustra a sequência de uma articulação normal (a) para uma articulação com inflamação (b).

Finalmente, a AR pode evoluir com progressão da erosão do tecido ósseo, invasão de cartilagem pelo pannus e preenchimento do espaço articular. A dor e o edema tornam-se mais intensos, logo, ficam-se visíveis a perda da função e deformidade das articulações, o que é revelado pelo exame radiográfico como diminuição do espaço articular e erosões em vários locais dos ossos (HARRIS, 1990).

1.4 Nociceção e Dor Inflamatória

A nociceção é o mecanismo através do qual, estímulos dolorosos são transmitidos para o sistema nervoso central (VERRI et al., 2006; FURST, 2000). Esse mecanismo envolve trocas bioquímicas e neuronais que ativam os nociceptores (receptores), ou terminações nervosas livres especiais, sensíveis a lesões que existem na pele, periósteo, paredes das artérias, superfícies articulares, e nas paredes de outros órgãos internos (como a foice, e o tentório na abóbada craniana em resposta a estímulos prejudiciais) (MORALES-ALPIZAR; SALAS-HERRERA, 2004).

Já a dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tissular potencial ou real, ou mesmo, a nenhuma lesão. Embora, ainda assim, descrita com termos sugestivos de que o dano tecidual tivesse de fato ocorrido. A dor é sempre subjetiva. Cada indivíduo aprende a aplicação da palavra através de experiências relacionadas com lesões no início da vida (IASP, 2007).

A distinção entre nociceção e dor deve ser considerada quando se utilizam modelos animais nos estudos pré-clínicos. A Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain - IASP*) define nociceção como processos neurais de codificação e processamento de estímulos nocivos enquanto que a dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial (BARROT, 2012). Sendo assim, a nociceção necessita do componente emocional ou subjetivo que está ligado à dor. Dessa maneira, a ativação de mecanismos nociceptivos engloba as respostas comportamentais e neurofisiológicas da dor, podendo ter como outros eventos relacionados que não seja a dor, os reflexos de retirada e a vocalização (SANDKÜHLE, 2009 apud BASTOS, 2009).

A dor constitui a principal causa de perda da capacidade de trabalho, como também gera nocivas consequências psicossociais e econômicas. Como resultado de tal processo, 50 a 60% ficam parcialmente ou totalmente incapacitados para exercer suas atividades, de maneira transitória ou permanente, comprometendo a qualidade de vida do indivíduo (SBED, 2005). Na artrite reumatóide, por exemplo, a dor é um dos principais sintomas levando o paciente a procurar tratamento. Durante a inflamação articular, numerosos neurônios aferentes primários periarticulares são sensibilizados. Além disso, causa sensibilização periférica e central (SCHAIBLE et al., 2002).

A dor de origem inflamatória resulta essencialmente da sensibilização dos neurônios sensoriais primários (FERREIRA, 1972). Nos seres humanos, esta sensibilização do nociceptor, geralmente, leva a condições clínicas conhecidas como hiperalgesia (é o aumento da sensibilidade à dor ou diminuição do limiar nociceptivo) ou alodinia (dor associada a estímulos geralmente inócuos, ou não-nóxicos, ou seja, não provoca dor) (VERRI et al., 2006). Essas condições são sintomas comuns associados a várias doenças que, do ponto de vista fisiológico, podem ser úteis para a preservação de tecidos vulneráveis (SANDKÜHLE, 2009 apud BASTOS, 2009). No entanto, em relação ao âmbito da pesquisa em animais, a dor não pode ser medida diretamente e, dessa forma, os efeitos da administração de drogas também não podem. Assim, os parâmetros comportamentais utilizados para quantificar respostas a estímulos dolorosos em animais são apenas indicativos e na realidade medem a resposta nociceptiva a um dado estímulo (BASTOS, 2009). Logo, a investigação da hiperalgesia (nomeada de hipernocicepção em modelos animais) é um dos principais sintomas de incapacidade gerada pela AR a qual limita os movimentos (PINTO et al., 2010; SILVA JUNIOR; ROCHA, 2006).

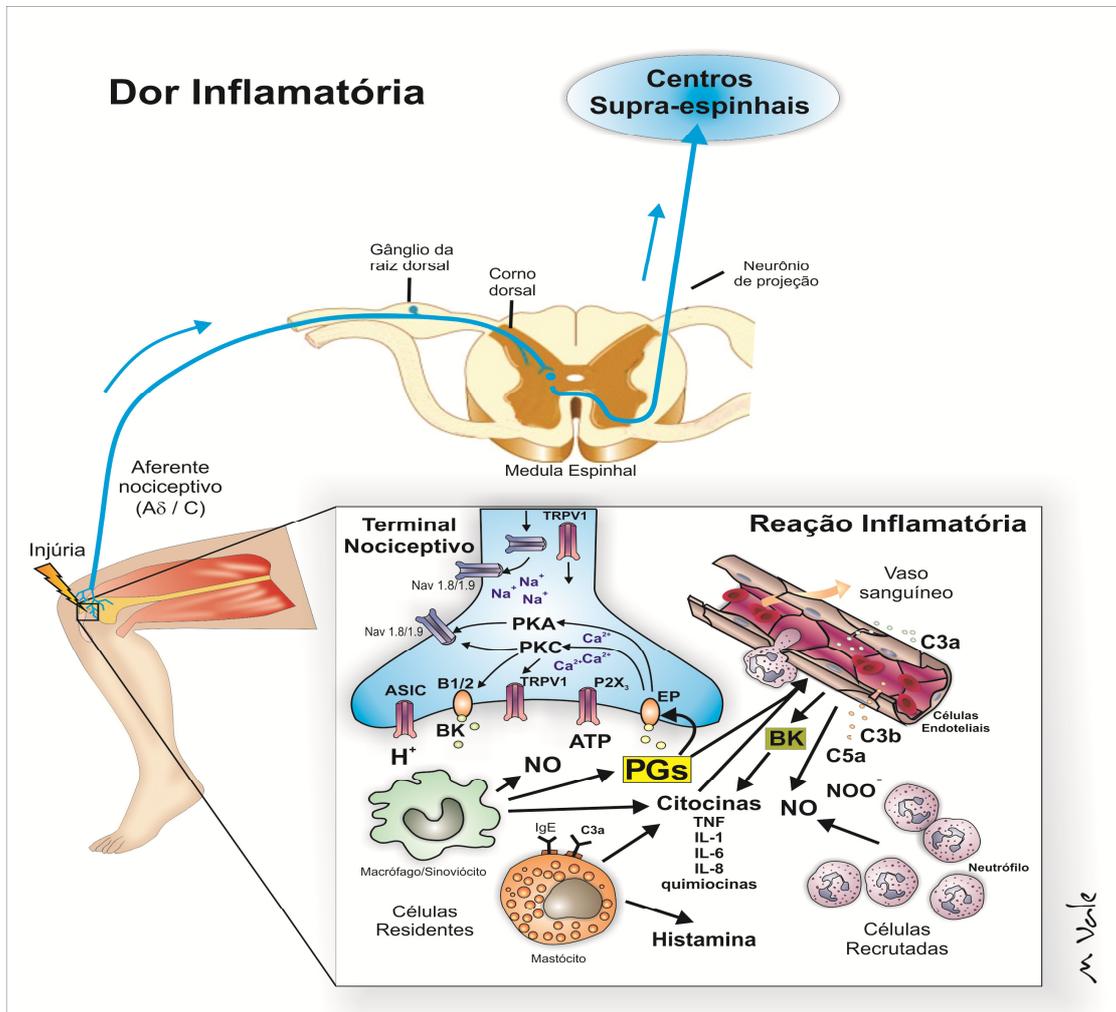
Recentemente estudos demonstraram que a dor inflamatória induzida pelos estímulos como: ácido acético ou zymosan, no modelo de contorções abdominais, é dependente da presença de células residentes tipo macrófagos e mastócitos (RIBEIRO *et al.*, 2000). Isto quer dizer que a dor mediada por estes estímulos necessita da presença dos macrófagos e mastócitos residentes na cavidade peritoneal (Figura 2). Estas células residentes são altamente secretórias e são capazes de produzir uma infinidade de mediadores inflamatórios e antiinflamatórios. Algumas são capazes de produzir e estocá-los em seus grânulos no interior do citoplasma como é o caso dos mastócitos. Estas células estocam histamina e TNF- α pré-formados e os liberam de forma imediata frente a um estímulo inflamatório.

Nos ensaios pré-clínicos, esta sensibilização é um processo que parece estar relacionado a presença de neutrófilos (CUNHA et al., 2008). Fala-se em hipernocicepção inflamatória que ocorre, pelo menos em parte, como uma consequência da sensibilização (aumento da excitabilidade) dos nociceptores aferentes primários. Este fenômeno tem sido atribuído à ação direta e indireta de mediadores inflamatórios hipernociceptivos (principalmente prostaglandinas e aminas simpáticas) nos receptores presentes nas membranas das extremidades periféricas dos neurônios nociceptores (CUNHA et al., 2008). Além disso, outros mediadores, tais como a endotelina-1 (ET-1), atua direta ou indiretamente, também sensibilizando o neurônio nociceptivo primário (FERREIRA; ROMITELLI; NUCCI, 1989).

Existe crescente evidência de que, além da sensibilização periférica, a dor inflamatória pode ser dependente de um processo que ocorre na medula espinal, assim como no gânglio da raiz dorsal e gânglio trigeminal. Na medula espinal, a plasticidade neuronal é modulada dinamicamente pela ativação da microglia e mediadores derivados de astrócitos, o que pode aumentar a capacidade de resposta à dor (SOUZA et al., 2013). Os mecanismos envolvidos na sensibilização dos neurônios sensoriais primários podem ser divididos em dois processos. O primeiro inclui eventos não neuronais residentes que recrutam células imunes, as quais produzem uma sequência de mediadores da hipernocicepção inflamatória iniciados pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Figura 2). Isso provoca a liberação de interleucina-1 beta (IL-1 β) e quimiocinas que por sua vez estimulam a liberação direta de mediadores finais que atuam no nociceptor (VALÉRIO et al., 2009; CUNHA et al., 1992; WATKINS et al., 1994). Vale lembrar que um dos leucócitos cruciais para a gênese da hipernocicepção inflamatória são os neutrófilos, pois os mesmos estão envolvidos na produção de mediadores hipernociceptivos de ação direta, como a PGE2 (VERRI et al., 2006; CUNHA et al., 2008). O segundo inclui eventos neuronais envolvendo a ativação dos receptores nos neurônios nociceptivos primários que acionam vias de sinalização intracelular, tais como o monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), proteína quinase A (PKA) e proteína quinase C (PKC) (FERREIRA; NAKMURA., 1978; ALEY; LEVINE, 1999; KHASAR et al., 1999) (Figura 2). Estas vias de sinalização resultam em fosforilação subsequente dos canais de sódio dependentes de voltagem (GOLD; LEVINE; CORREA, 1998) e inibição dos canais de potássio dependentes da voltagem (EVANS; VASKO; NICOL, 1999). Conseqüentemente, o limiar nociceptivo é reduzido, o que finalmente leva a um aumento da excitabilidade neuronal (CUNHA et al., 2008b; ZARPELON et al., 2013).

A sensibilização local e fisiológica, principalmente relacionada com a presença de mediadores inflamatórios e neuromoduladores são qualificadas como hiperalgesia primária. A hiperalgesia secundária acontece quando outras regiões distantes da lesão sofrem a expansão desta hiperalgesia, de modo que o limiar nestes novos locais se torna mais baixo, estabelecendo-se uma dor generalizada (MARQUES, 2004). Pode haver casos em que a atividade dos nervos periféricos pode se tornar totalmente dissociada da estimulação sensorial, e neste caso, nociceptores periféricos começam a disparar potenciais de ação em qualquer estímulo externo, causando resposta nociceptiva “espontânea”. Tanto hipernocicepção/alodinia e resposta nociceptiva “espontânea” podem se desenvolver sob certas condições fisiopatológicas, tais como a inflamação, que pode persistir por meses ou anos como, por exemplo, na artrite (LINLEY et al., 2010).

Figura 2 - Bases celulares e moleculares da dor inflamatória



Fonte: Ribeiro., et al., (2012).

Reação inflamatória causando sensibilização e ativação de um terminal nervoso periférico nociceptivo. PGs (prostaglandinas), NO (óxido nítrico), NOO⁻ (peroxinitrito), C3a / C3b / C5a (componentes do sistema complemento), BK (bradicinina), PKA (proteína quinase dependente de AMPc), PKC (proteína quinase dependente de cálcio), B1/2 (receptores B1 e B2 da bradicinina), TRPV1 (receptor de potencial receptor transiente, vanilóide 1), P2X (receptor purinérgico do ATP), NaV1.8/1.9 (canais de sódio voltagem dependentes).

Existem quatro mecanismos interligados que elucidam a ocorrência da sensação de dor:

a) Transdução - É o primeiro que ocorre e consiste na ativação dos nociceptores por ocorrência de um estímulo nocivo (podendo ser mecânico, térmico ou químico), gerando um potencial de ação (OLIVEIRA, 2010) convertendo esse estímulo em impulsos elétricos.

Ocorre, verdadeiramente, a transformação do dano tissular e da resposta bioquímica em um processo neural. Os neurônios conduzem o impulso elétrico até a medula espinhal ou a células que conduzem aos nervos cranianos. Quando o nociceptor recebe o estímulo nociceptivo os canais de sódio da membrana celular se abrem e ocorre influxo de sódio do meio extracelular para dentro da célula. O sódio dentro da célula induz a perda de carga elétrica, ou seja: a célula sofre despolarização, criando o potencial de ação que se traduz pela energia elétrica que vai seguir até a medula espinhal (OLIVEIRA, 2010).

b) Transmissão - efetuada pelo conjunto de vias aferentes que conduzem o impulso nervoso gerado pelo neurônio nociceptor, o qual leva a informação dolorosa para o SNC (cérebro) (PORTO, 2004) para o processamento e interpretação do estímulo (WEBER, 2012). Os neurônios nociceptivos têm seus corpos celulares nos gânglios da raiz dorsal ou trigeminal e terminam nas camadas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, onde são retransmitidas, via nervos do trato espinotalâmico e trigeminal, mensagens por meio da liberação de mediadores como: glutamato, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (LAWSON et al., 2002).

c) Modulação - pode ativar vias responsáveis pela supressão da dor gerada pelos próprios nociceptores e suas vias (OLIVEIRA, 2010). Esse processo ocorre porque a substância gelatinosa que banha os interneurônios pode ser regulada para excitar ou inibir os sinais de dor. No processo natural de modulação predominam os processos de inibição da dor. Eles envolvem substâncias químicas endógenas e circuitos nervosos. A resposta dos nociceptores consiste na liberação de mediadores químicos, como as conhecidas substâncias algícas como a bradicinina, a serotonina, a histamina, os íons de potássio, os ácidos, a acetilcolina e as enzimas proteolíticas, além das prostaglandinas e substância P (GUYTON; HALL, 2002 apud OLIVEIRA, 2010).

d) Percepção - onde o impulso nociceptivo é integrado e percebido como dor, recebendo influências de suas dimensões sensorial-discriminativa, afetivo-emocional e cognitivo-avaliativa (BASBAUM et al., 2009).

Os mecanismos moleculares, celulares e sistêmicos ligados aos processos dolorosos, sua amplificação e depressão são chamados de nociceptivos, pró-nociceptivo e anti-nociceptivo, respectivamente (SANDKÜHLE, 2009 apud BASTOS, 2009).

1.5 Artrite e Fármacos Empregados

A Artrite abrange mais de 100 diferentes variações de doenças reumáticas e compartilham como sintomas típicos a dor, que pode se tornar crônica, causando edema e rigidez nas articulações. Os adultos, a partir, de 65 anos são mais acometidos (SWEENEY et al., 2004). Postula-se que as mulheres (24,3%) possuem mais susceptibilidade do que homens (18,7%) em todas as faixas etárias (BUCKWALTER et al., 2000; ALAMANOS et al., 2006). Sendo mais comum entre os adultos obesos (*CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION*, 2012). Estima-se que 50 milhões de adultos norte-americanos possuem artrite. Com o envelhecimento da população, espera-se que a artrite aumente drasticamente para 67 milhões em 2030 (*CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION*, 2012).

As principais artropatias inflamatórias mais encontradas na prática clínica são: artrite reativa, artrite psoriática, artrite reumatóide e espondilite anquilosante, além da artrite gotosa, que é uma doença bem descrita na literatura desde os tempos antigos. Os sinais clínicos clássicos são: o início súbito de sintomas como dor intensa, vermelhidão e inchaço sobre o hálux de pacientes de meia-idade. As três primeiras afecções citadas são mais comumente apresentadas como doença periférica afetando múltiplas articulações. A espondilite anquilosante, no entanto, geralmente afeta o esqueleto axial. Radiograficamente, todas essas doenças compartilham características como sinovite, erosão e perda uniforme da cartilagem articular, mas a distribuição e os achados radiológicos específicos ajudam a diferenciá-las (FLEMMING; BERNARD, 2013).

Artrite reativa (ARe), refere-se a uma infecção sistêmica, caracterizada por um envolvimento articular inflamatório ocorrendo em pacientes geneticamente predispostos com uma infecção bacteriana (FLORES et al., 2003; CARTER; HUDSON, 2009; KIM; KLAUSMEIER; ORR, 2009 apud OLIVEIRA 2013). Já a artrite psoriática (AP) é frequentemente associada com o reparo ósseo, incluindo má formação óssea adjacente à interrupção cortical e reação periosteal (YAMAMOTO, 2013) (BHUTANI et al., 2013; FLEMMING; BERNARD, 2013). Por outro lado, a espondilite anquilosante (EA) é uma doença reumática e suas manifestações clínicas incluem inflamação lombar, bem como o aumento da rigidez e perda de mobilidade da coluna vertebral (MACHADO, 2013; HAROON et al., 2013). Por fim, a artrite gotosa é uma doença inflamatória dolorosa caracterizada pela deposição de cristais de urato monossódico nas articulações (CURIEL; GUZMAN, 2012; KLOOSTER; VONKEMAN; LAAR, 2012).

A AR é uma doença inflamatória de origem imunológica das articulações sinoviais e, para qual, ainda não existe cura. É considerada uma das doenças autoimunes mais comuns,

que afeta uma grande parcela da população mundial (KVIEN et al., 2006). A incidência da artrite reumatoide é de, aproximadamente, 1% da população mundial (WILES et al., 1999 apud KVIEN et al., 2006; CAMARGO, 2007). No Brasil, dados epidemiológicos semelhantes foram encontrados (SENNA et al., 2004).

Em 90% dos pacientes que apresentam AR crônica, a articulação do joelho desses indivíduos encontra-se comprometida. A doença tende a envolver ambos os joelhos simetricamente e, em sua forma progressiva, pode produzir dor intensa, capaz de causar deficiência na capacidade de deambulação como consequência da rigidez articular e deformidades. Nos casos mais avançados, pode ocorrer não apenas destruição da cartilagem, mas também destruição dos tecidos moles (SCULCO, 1998; KHURANA; BERNEY, 2005).

Sua etiologia ainda é desconhecida apresentando manifestações locais e sistêmicas (FIRESTEIN, 2003). Apresentam-se sintomas como: inchaço das articulações, vermelhidão e dor com deformidade articular progressiva em alguns casos, além da destruição do tecido sinovial e remodelação. As manifestações extra-articulares (SWEENEY et al., 2004), tais como nódulos subcutâneos, vasculite, amiloidose, pleurite, doença pulmonar e complicações cardíacas. Pacientes com AR têm uma expectativa de vida reduzida, principalmente devido ao aumento da morbidade cardiovascular em comparação com a população em geral (VANDENBROUCKE et al., 1884; SEYMOUR et al., 2001; MAVROGENI et al., 2013; ATHANASAKIS; PETRAKIS; KYRIOPOULOS, 2013). Dentre as artropatias crônicas inflamatórias, a AR é a mais prevalente e a maior responsável por invalidez, seja temporária ou permanente (FELTS; YELIN, 1989; HARRIS, 1990).

Embora ainda não se tenha estabelecido uma terapia efetiva para a cura da AR, o tratamento farmacológico consiste, principalmente, em aliviar a dor, controlar a inflamação, preservar a função e prevenir as deformidades com o uso de agentes disponíveis na clínica. Incluindo os agentes anti-inflamatórios esteróides (AIES) como os corticosteróides e não esteróides (AINES); drogas antirreumáticas modificadoras de doença (DMARDs) como: metotrexato, sulfasalazina e cloroquinas (DOAN; MASSAROTTI, 2005). Mais recentemente, foi proposto o uso de agentes bloqueadores especificamente do TNF como forma de terapia biológica com os agentes anti-TNF (exemplo: Infliximab e etanercepte) e fatores recombinantes da IL-1, tem sido empregada (GAFFO et al., 2006; FAN; LEONG, 2007). Apesar desses fármacos reduzirem a inflamação e retardarem o dano articular, eles não foram capazes de deter a progressão da destruição articular e reverter a deficiência, duas das principais marcas da AR que a distinguem de todas outras artrites crônicas (SALGADO et al., 2013; SMOLEN, 2009; ATHANASAKIS; PETRAKIS; KYRIOPOULOS, 2013).

Os fármacos de primeira escolha são os AINES e seus principais efeitos são: Anti-inflamatório, Analgésico e Antipirético. A grande maioria dos AINES desempenha a função de prevenir a síntese de prostaglandinas pela inibição da enzima COX (1 e 2). Sendo necessária essa produção para a sensibilização dos nociceptores. Quando a produção de mediadores inflamatórios persiste, a continuidade da sensibilização periférica causa o fenômeno da sensibilização central (FERREIRA et al., 2009).

No presente trabalho foram utilizados alguns fármacos como Controle Positivo que merecem destaque, como: Dipirona, Dexametasona e Indometacina. A Dipirona e a Indometacina fazem parte do grupo dos AINES. A Dipirona além de ter uma ação inibitória sobre a COX, esse fármaco tem grande efeito analgésico inibindo a dor inflamatória. Logo, quando administrada perifericamente, a Dipirona é capaz de bloquear diretamente a hiperalgesia induzida por PGE₂, da mesma forma que os opióides periféricos. Já a Dexametasona é um tipo de Glicocorticóide. A Dexametasona quando administrados terapêuticamente inibe tanto as manifestações precoces quanto as manifestações tardias da inflamação, ou seja, não apenas o rubor, calor, a dor e o edema iniciais, mas também estágios posteriores de cicatrização e reparação da lesão. Quando usados profilaticamente, eles conseguem inibir o início e a geração da resposta imune montada contra esse novo “invasor” mais eficientemente (RANG, et al., 2011). Além disso, de acordo com os mecanismos propostos de ação glicocorticosteróides, Dexametasona, não só inibe a expressão de mediadores inflamatórios, mas também a expressão de receptores, tais como o B1 (receptor de bradicinina) (VERRI et al., 2006).

Conseqüentemente, a associação do modelo experimental in vivo é fundamental para a melhor compreensão dos processos fisiopatológicos e o desenvolvimento de alvos terapêuticos (VALENTIM, 2010).

1.6 Modelos Experimentais de Artrite que mimetizam a AR

Como a AR pode ser considerada uma das doenças mais responsáveis por invalidez e com bastante incidência, ela torna-se um campo de investigação amplo para elucidação de sua fisiopatologia, que se encontra ainda obscura, bem como a investigação de mecanismos que possam prevenir ou reverter-la. Para isso, foram desenvolvidos modelos animais que se assemelham a AR em humanos, no entanto a ausência de AR em outras espécies semelhante na espécie humana, representa uma dificuldade técnica no estudo da mesma. Os modelos animais foram desenvolvidos e empregados como ferramentas úteis na compreensão dos

mecanismos de lesão em artrites. Logo, alguns modelos experimentais foram padronizados e representam uma ferramenta importante na investigação de agentes biológicos na terapêutica da AR (SILVA JUNIOR; ROCHA, 2006).

A rigor, para que um modelo seja considerado ideal, deverá preencher os seguintes requisitos, como: ter achados clínicos, radiológicos e histopatológicos semelhantes aos observados na AR, sem sistemização; apresentar mínimas alterações de artrite não-reumatóide; ser de fácil indução, baixo custo, boa reprodutibilidade, utilizando animal de fácil acesso; ter confiabilidade quanto ao início, incidência e avaliação das alterações; responder a agentes terapêuticos de forma semelhante ao observado na AR; ter parâmetros de alterações imunológicas e de atividades mensuráveis (OLIVER, 1996 apud SILVA JUNIOR; ROCHA, 2006). Porém nenhum dos modelos atualmente disponíveis satisfaz plenamente todas essas condições, embora todos se aproximem razoavelmente do objetivo pretendido.

Existem os seguintes modelos experimentais que induzem a AR: a Artrite Induzida por Adjuvante que consiste na injeção intradérmica de Adjuvante completo de Freund, em ratos susceptíveis; induzida por colágeno tipo II admitindo-se ser essa proteína um auto-antígeno importante no desencadeamento do processo inflamatório crônico; induzida por proteoglicanos, pristano (óleo mineral); por antígeno que consiste em uma reação intra-articular à injeção de um antígeno ao qual o animal é previamente sensibilizado; por agentes infecciosos e, por fim, a Artrite induzida por zymosan. Em comum, os modelos apresentam a similaridade histológica com a sinovite da AR humana, mecanismos imunológicos na sua fisiopatologia, além de resposta terapêutica similar à observada na AR (SILVA JUNIOR; ROCHA, 2006).

Por último, vale destacar que manipulações genéticas, gerando animais transgênicos ou *knock-out*, vieram agregar uma nova ferramenta aos modelos animais, permitindo avaliar o papel de genes individuais na fisiopatologia da AR, na homeostasia normal, e no desenvolvimento de autoimunidade, bem como de citocinas envolvidas na fisiopatologia dessa doença (SILVA JUNIOR; ROCHA, 2006).

Um modelo utilizado é o de artrite experimental induzida por zymosan em ratos, método utilizado para estudo do processo inflamatório. Os ratos utilizados foram os da linhagem *Wistar*, mamífero de baixo custo de aquisição e manutenção, fácil manuseio, elevada resistência à infecção e ao trauma cirúrgico e com admirável sistema de homeostasia, além de ser semelhante à espécie humana.

1.6.1 Artrite induzida por zymosan

Com o passar dos anos, inúmeros modelos experimentais foram empregados para investigar os mecanismos envolvidos na hipernocicepção inflamatória observada em doenças de origem autoimune, como a AR. Contudo, muitos deles utilizam como ferramenta respostas inflamatórias contra estímulos inespecíficos, CFA, zymozan, antígenos, colágeno, entre outros (ROCHA et al., 2004; SILVA JUNIOR; ROCHA, 2006). Modelos animais tais como o teste das contorções abdominais induzidos pelo ácido acético e o teste de nocicepção induzida pela formalina, também são bastante utilizados para avaliação de atividade nociceptiva (COLLIER et al., 1968; HUNSKA; FASMER; HOLE, 1985; CUNHA et al., 2004).

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

O Zy é reconhecido a partir do receptor selectina-1, tais receptores são expressos predominantemente em monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e uma menor população de células T do baço (WILLMENT, 2003). Após o reconhecimento, por macrófagos, este polissacarídeo interage com o receptor toll-like (TLR2), presente na superfície das células. Em seguida ocorre ativação do fator NF- κ B, produção de citocinas inflamatórias, bem como a expressão de moléculas co-estimulatórias (TAYLON et al., 2002).

Estudos demonstraram que o Zy administrado por via intra-articular em ratos, induz periartrite com um pico de hipernocicepção entre a 3ª e 4ª horas, com aumento significativo na permeabilidade vascular a partir da 3ª hora levando ao edema local. Já na 3ª hora, há um influxo celular significativo que é máximo na 6ª hora. Após a injeção do zymosan, ocorre alteração da marcha dos animais, que foi designada de incapacitação articular (IA). Como resultado, os animais desenvolvem progressiva IA que se inicia na segunda hora e é máxima entre a 3ª e 4ª horas de inflamação (ROCHA et al., 1999; ROCHA et al., 2004).

A fase aguda da artrite induzida por zymosan é caracterizada por aumento da permeabilidade vascular, edema e influxo celular inflamatório para a cavidade articular. Na fase crônica da artrite induzida por zymosan, ocorre degradação da cartilagem articular e do

osso subcondral (GEGOUT et al., 1995). Além de produzir reação inflamatória intensa, caracterizada por extensa sinovite, com migração de células inflamatórias de fase aguda e cronificação com proliferação linfomonocitária (GEGOUT et al., 1995; ROCHA et al., 1999). A artrite induzida por zymosan também produz hipernocicepção (ROCHA et al., 1999).

1.7 Ácidos Graxos

Os óleos e as gorduras têm um papel importante, usados com fins farmacológicos, industriais e nutricionais. Parecem ser interessantes fontes de componentes bioativos e nutrientes funcionais, tais como vitaminas e ácidos graxos insaturados essenciais com benefícios para a saúde. Os relatórios têm descrito diversas atividades farmacológicas importantes dos ácidos graxos, incluindo ação antimutagênica, anti-inflamatória, anti-viral, antioxidantes e antimicrobiana, obtidos a partir de plantas, ervas e sementes usadas na medicina popular (ROSA et al., 2012).

Os lipídeos desempenham uma variedade de funções celulares e são as principais formas de armazenamento de energia na maioria dos organismos. Atuam no transporte de vitaminas lipossolúveis, como precursores de hormônios e determinados grupos são considerados funcionais (PERINI et al., 2010).

Componentes lipídicos, principalmente os Ácidos Graxos (AG), se encontram distribuídos em todos os tecidos, principalmente nas membranas celulares e células de gordura (PERINI et al., 2010). O nome ácido graxo designa qualquer um dos ácidos monocarboxílicos alifáticos que podem ser liberados por hidrólise de gorduras e óleos naturais. Os principais ácidos graxos podem ser saturados ou insaturados, com uma cadeia de carbono não ramificada de número par. Os ácidos graxos saturados (láurico, mirístico, palmítico e esteárico) e os insaturados (oléico, linoléico e linolênico), juntos, perfazem quase toda a quantidade de óleos fixos e gorduras existentes no comércio (MORETTO; FETT, 1998; SIMÕES et al., 2007; MOYNA; HEINZEN, 2007).

Durante as duas últimas décadas foi comprovado que a quantidade e o tipo de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) podem influenciar profundamente as respostas imunológicas (ALEXANDER, 1998).

As principais fontes alimentares do ácido linoléico (ω -6) são: os óleos de soja, girassol e milho, e do ácido α -linolênico (ω -3) são: os óleos de linhaça, canola e peixes (MESQUITA et al., 2011; PERINI et al., 2010). O ácido α -linolênico ou ALA (ω -3) é encontrado em plantas, animais e espécies marinhas e em concentrações elevadas na semente de linhaça

(*Linum usitatissimum*), onde a quantidade de ALA varia de 44,6 a 51,5 % do total de ácidos graxos (PERINI et al., 2010). DHA e EPA são ácidos graxos (ω -3) encontrados em peixes e em óleos de peixe (IWASAKI et al., 2010). O ácido oléico (ω -9) é encontrado em castanhas de caju, azeitonas, abacate e óleo de canola. Em quantidades menores, eles também são encontrados em nozes, sementes de gergelim e girassol, amendoim, óleo de milho, trigo e aveia (SANTUCCI, 2012).

A quantidade de ácido graxo e a devida proporção entre os ácidos graxos das famílias ω -9, ω -6 e ω -3, ingeridas atualmente pelo homem, são difíceis de serem analisadas, pois depende da fisiologia, disponibilidade de alimento e dieta de cada indivíduo. Ainda não foram estabelecidas as taxas mínimas do consumo de ácidos graxos das séries ω -3 e ω -6 para atender às exigências humanas destes nutrientes, porém, há necessidade de um equilíbrio entre as disponibilidades destes ácidos graxos na alimentação. De acordo com o *Institute of Medicine*, a relação satisfatória entre ω -6/ ω -3 é de 10:1 a 5:1 e de acordo com base em experimentação animal esta proporção seria de 1-1,5:1 enquanto hoje, em dietas ocidentais, a relação atinge 10 a 25:1, causando uma desproporção de ácidos graxos no organismo humano (PERINI et al., 2010). Recomenda-se, também, que a ingestão de ácido linoléico (ω -6) não deve exceder 10% do total de calorias (MARTINS; GRUEZO, 2009).

1.7.1 Classificação e Nomenclatura dos Ácidos Graxos

Os ácidos graxos (AG) são inicialmente isolados de fontes naturais, principalmente de lipídeos e são moléculas orgânicas constituídas por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio e podem ser classificados de acordo com:

a) o número de átomos na cadeia carbônica: os ácidos graxos podem ser de cadeia curta (até 4 átomos de carbono), média (6 a 12 átomos de carbono) ou longa (a partir de 14 átomos de carbono);

b) o número de duplas ligações na molécula: saturados (ausência de duplas ligações), monoinsaturadas (uma dupla ligação) ou poli-insaturadas (mais de uma dupla ligação);

c) a posição da primeira dupla ligação contada a partir de seu radical metila (CH_3): ômega-3 (ω -3 ou n-3) quando a primeira insaturação ocorre entre o terceiro e o quarto átomos de carbono, ômega-6 (ω -6 ou n-6) quando a primeira insaturação ocorre entre o sexto e o sétimo átomos de carbono e ômega-9 quando a primeira insaturação ocorre entre o nono e o décimo átomos de carbono (BABAYAN, 1987).

A posição da dupla ligação na cadeia carbônica dos ácidos graxos é indicada entre parênteses, pela identificação do átomo de carbono implicado em cada insaturação, em relação ao radical metila (CH^3) (Figura 3). O Quadro 1 mostra a representação numérica de ácidos graxos insaturados e sua classificação em famílias, dependendo da localização da primeira dupla ligação contada a partir de seu radical metila (CH^3).

Quadro 1 - Representação e abreviação de ácidos graxos insaturados

Nome descritivo	Representação numérica	N	Família ω
Ácido oléico	18:1 (9)	18:1 n-9	ω -9
Ácido linoléico	18:2 (6, 9)	18:2 n-6	ω -6
Ácido Linolênico	18:3 (3, 6, 9)	18:3 n-3	ω -3

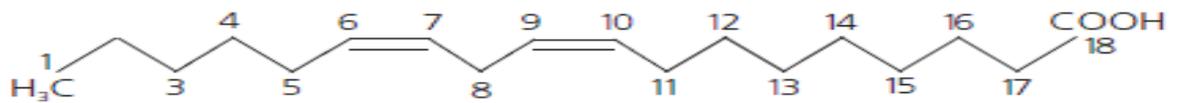
Fonte: Pinheiro (2011, p.27)

Os ácidos graxos são geralmente representados por símbolos numéricos, tais como o ácido oléico, C18:1 (9), e o ácido linoléico, C18:2 (6,9), onde o número justaposto ao símbolo C indica o número de átomos de carbono e o segundo número indica a quantidade de duplas ligações (Quadro 1).

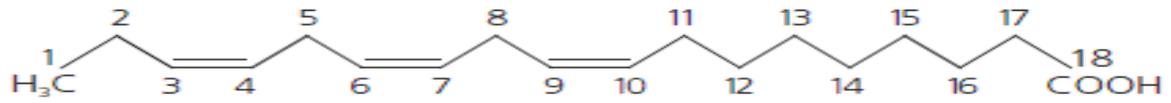
O posicionamento e a quantidade das duplas ligações ao longo da cadeia carbônica designam a qual família determinado ácido graxo pertence, bem como suas diferentes propriedades bioquímicas, nutricionais e funcionais (FAROOQUI, 2009).

Os mamíferos são capazes de sintetizar os ácidos graxos insaturados da série ω -9, porém não conseguem sintetizar os ácidos linoléico (ω -6) e α -linolênico (ω -3). Por isso, são nomeados como ácidos graxos essenciais (ALEXANDER, 1998; CALDER, 2003) porque as duplas ligações, situadas no terceiro e sexto átomos de carbono, não podem ser produzidas pelo organismo humano, de forma que os ácidos graxos essenciais devem ser obtidos a partir da dieta (Figura 3) (MESQUITA et al., 2011; SUAREZ-MAHECHA et al., 2002). O ácido linoléico (18:2 ω -6) é o precursor dos ácidos graxos essenciais (AGEs) ω -6 e o ácido alfa-linolênico (ALA, 18:3 ω -3), o precursor dos AGEs ω -3, os quais são metabolizados em diferentes compostos (NAKAMURA et al., 2005; DAHELE; FEARON, 2006). Os ácidos graxos monoinsaturados ω -9, caracterizado pelo ácido oléico, podem ser produzidos endogenamente, mas quando oferecidos de fontes exógenas, tais como o óleo de oliva, exercem efeitos benéficos, tais como ação antioxidante.

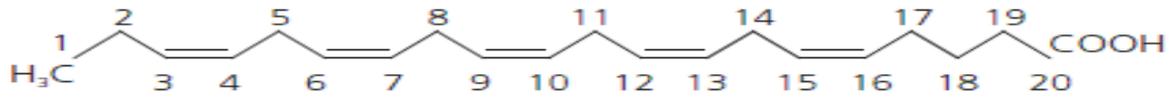
Figura 3 - Estrutura dos ácidos graxos ω -3 e ω -6



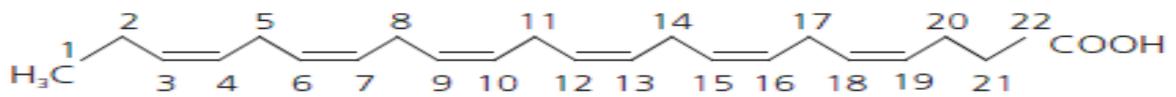
Ácido Linoléico (ômega-6)



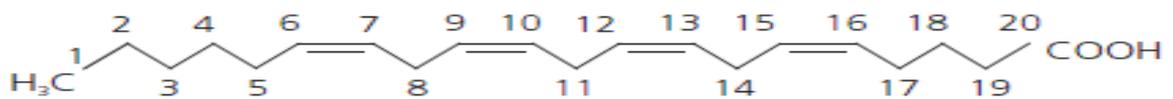
Ácido alfa-linolênico (ômega-3)



Ácido eicosapentaenóico (ômega-3)



Ácido docosahexaenóico (ômega-3)

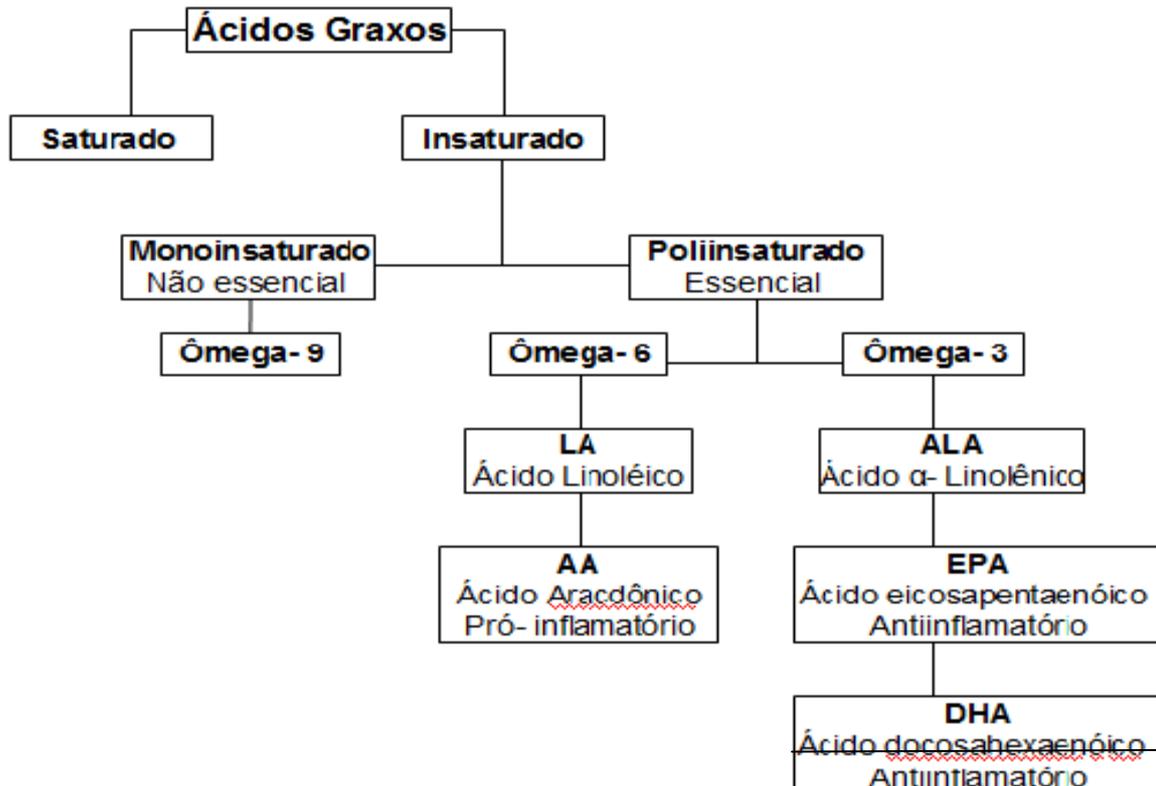


Ácido araquidônico (ômega-6)

Fonte: Adaptado de Perini et al. (2010)

O organismo humano não possui as enzimas dessaturases especificamente responsáveis por adicionar uma dupla ligação antes do nono carbono a partir da extremidade metil (distal). As enzimas necessárias para essa finalidade são as delta-9 e delta-15 dessaturases. Essas enzimas transformam o ácido oléico (18: 1 ômega-9) em ácido linoléico (18:2 ômega-6) e ácido α -linolênico (18:3 ômega- 3), ambos considerados ácidos graxos essenciais (AGE) (WAITZBERG, 2008).

Figura 4 - Classificação dos ácidos graxos, segundo a presença de dupla ligação



Fonte: Adaptado de Santucci (2012)

1.7.2 Ácidos Graxos e Inflamação

Os ácidos graxos mais incorporados às membranas fosfolipídicas são ω -3 EPA e DHA, o ω -6 ácido araquidônico (AA) e o ω -9 ácido oléico (AO) (CHAN; McCOWEN; BISTRAN, 1998). O EPA e o DHA têm efeitos benéficos diretos sobre a fluidez, a estrutura e a função das membranas celulares (CALDER, 2002).

O AA e o EPA (ver Figura 4) presentes nas membranas celulares podem ser metabolizados via lipoxigenases e ciclooxigenases para formar os eicosanóides (MOREIRA; CURI; MANCINI FILHO, 2002). O ácido araquidônico (AA), também chamado de eicosanóides, é um ácido graxo poli-insaturado derivado da dieta ou da conversão do ácido graxo essencial ácido linoléico, é clivado dos fosfolídeos de membrana pela ação da fosfolipase A₂ (PLA₂) (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

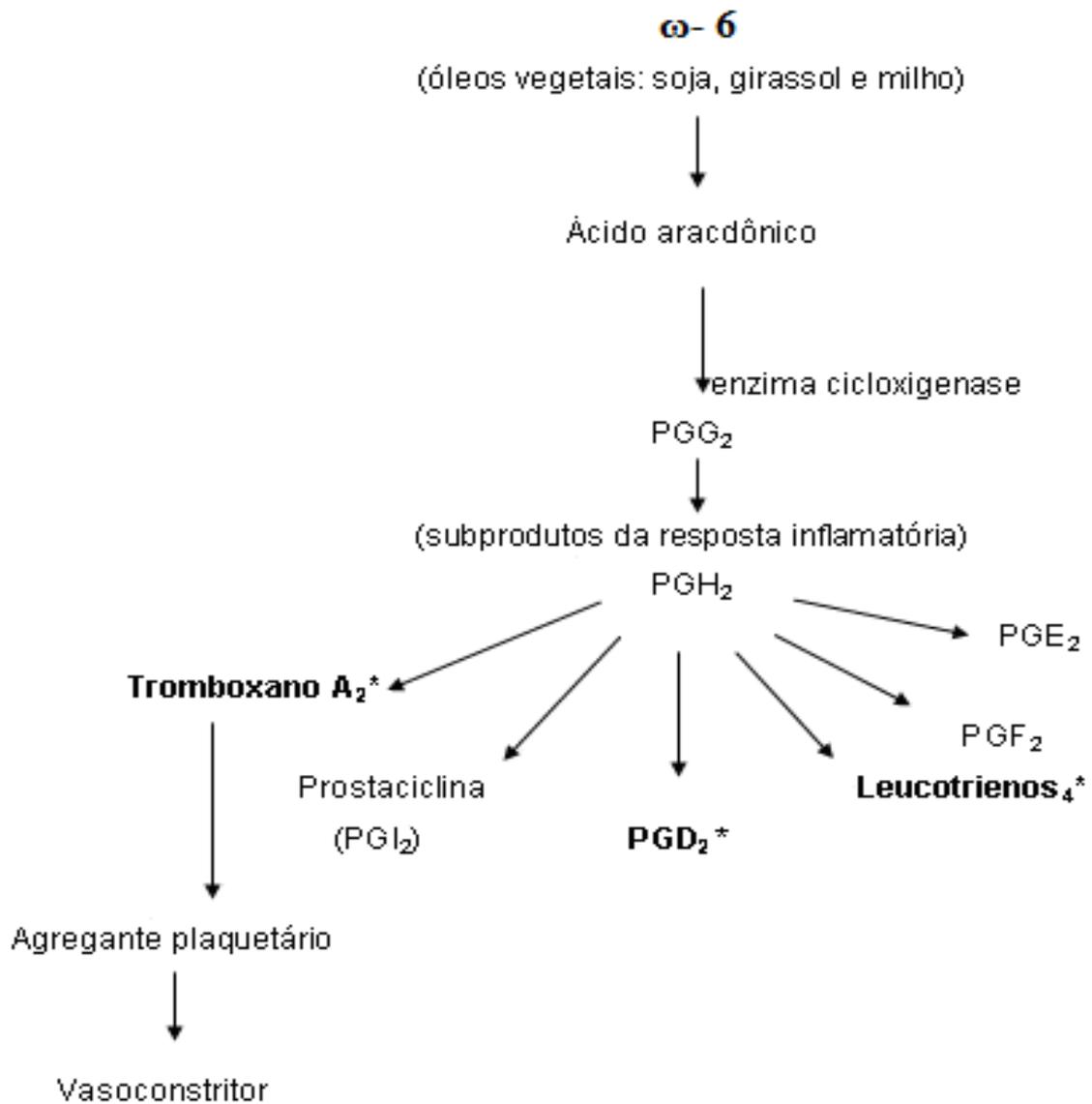
Denominam-se eicosanóides um grupo de substâncias sinalizadoras que influenciam, como mediadores biologicamente ativos, um grande número de processos fisiológicos. Como substâncias de vida curta, essas agem apenas nas proximidades do seu local de produção

(MARTINS; GRUEZO, 2009). O ácido linoléico (AL) (18:2 ω -6) forma o γ -linolênico (18:3 ω -6), que é convertido em ácido araquidônico (AA), sendo este o precursor da síntese de eicosanóides. Os eicosanóides são produzidos nos tecidos, sendo responsáveis pela formação especificamente das prostaglandinas da série 2, tromboxano A (TXA) e leucotrienos da série 4, potentes mediadores bioquímicos envolvidos na inflamação, infecção, lesão tecidual, modulação do sistema imune e agregação plaquetária (Figura 5) (HIRAYAMA et al., 2006).

Em outra via, o α -linolênico (ALA) (18:3 ω -3) é convertido, de forma lenta em ácido eicosapentanoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), precursores de mediadores químicos menos potentes, as prostaglandinas da série 3, tromboxano A e leucotrienos da série 5, que atuam no processo anti-inflamatório e não inibem o sistema imune (Figura 6). Os ácidos graxos ω -3 favorecem a produção de prostaciclina, que têm os efeitos opostos ao ω -6, isto é prevenir a formação de coágulos e causar vasodilatação (HIRAYAMA et al., 2006).

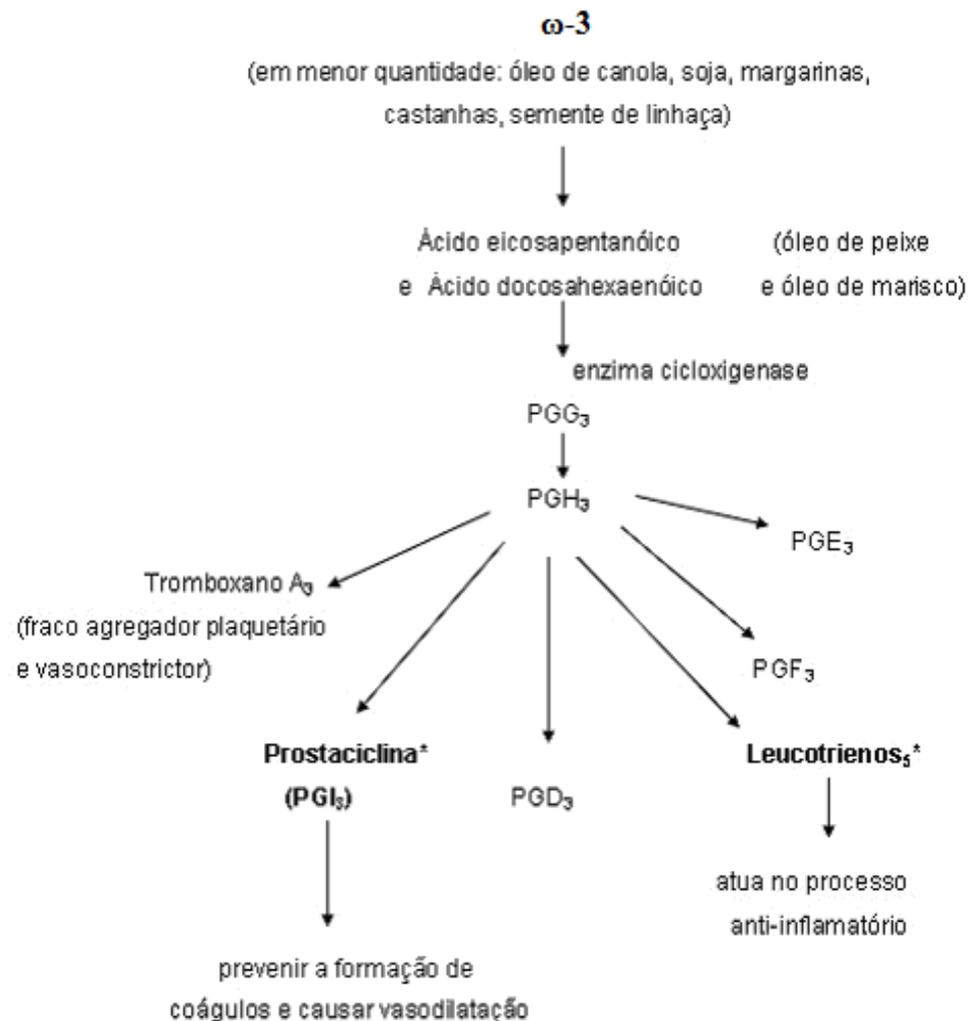
O ácido linoléico (AL) e o ácido α -linolênico (ALA) (ver Figura 3), porém, podem ser alongados e dessaturados pelo sistema enzimático (alongase e dessaturase) para produzir DHA e EPA, a partir de óleos vegetais provenientes da alimentação, porém isso ocorre em baixa porcentagem. As alongases atuam adicionando dois átomos de carbono à parte inicial da cadeia, e as dessaturases agem oxidando dois carbonos da cadeia, originando uma dupla ligação com a configuração *cis* (SUAREZ-MAHECHA et al., 2002; MARTIN et al., 2006).

Figura 5 - Mediadores bioquímicos potentes envolvidos na inflamação, infecção, lesão tecidual, modulação do sistema imune e agregação plaquetária



Fonte: Hirayama et al. (2006)

Figura 6 - Mediadores bioquímicos menos potentes que a cascata do ω -6, que atuam no processo anti-inflamatório e não inibem o sistema imune



Fonte: Hirayama et al. (2006)

Existe uma competição entre os ácidos graxos essenciais ω -3 (ácido α -linolênico) e ω -6 (ácido linoléico) pela enzima de dessaturação Δ 6-dessaturase (BARBOSA et al., 2007), que é uma chave metabólica clássica e comum para ambas as vias metabólicas (HIRAYAMA et al., 2006), sendo que estas têm maior afinidade pelo ácido α -linolênico em detrimento do linoleico (Figura 4). Assim, os ácidos graxos EPA e DHA, produtos da conversão do ácido graxo α -linolênico (ω -3), bloqueiam a ação da Δ 6 dessaturase, inibindo a conversão do ácido linoléico (ω -6) a ácido araquidônico e, conseqüentemente, a produção de eicosanóides da série par, como prostaglandinas 2 e leucotrienos 4 (Figura 5). Dessa forma, os ácidos graxos ω -3 exercem um efeito protetor, impedindo os eicosanóides da série par de exercerem seus efeitos nocivos (Figura 6) (BARBOSA et al., 2007).

Por esse motivo, considera-se que o ω -3 tem papel maior no mecanismo de defesa do sistema imune, enquanto que o ω -6 participa de forma mais efetiva do processo inflamatório (HIRAYAMA et al., 2006). O tipo e a quantidade de eicosanóides produzidos dependem do tipo de lipídio ingerido na dieta e da presença ou ausência de injúria ou inflamação (MOREIRA; CURI; MANCINI FILHO, 2002).

Os ácidos graxos ω -3 exercem efeito anti-inflamatório por pelo menos três mecanismos. Primeiro, influenciam a composição fosfolipídica da membrana celular, resultando na síntese de mediadores lipídicos com menor potencial inflamatório que mediadores derivados dos ácidos graxos ω -6. Segundo, agem como agonistas de PPAR (receptor de ativação de proliferação de peroxissomas), cuja ativação exerce efeitos anti-inflamatórios. Terceiro, os AG ω -3 estabilizam o complexo NF- κ B/I κ B por estarem associados na participação da ativação de receptores nucleares que antagonizam vias de sinalização do fator de transcrição nuclear kapa B (NF-Kb) (MULLER-LADNER; GAY; GAY, 2005). Suprimindo dessa maneira a ativação de genes envolvidos no processo inflamatório (WAITZBERG, 2008). Além disso, evidências indicam que AG ω -3 podem influenciar diretamente a produção de citocinas, inibindo a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF-A) e interleucinas IL-1beta e IL-6 por células imunocompetentes, em modelos de cultura celular (SIMOPOULOS, 2002).

Pesquisas mais recente evidenciaram que o ω -9 (AO) também exibe ação anti-inflamatória através da inibição de prostaglandina E2 e bloqueio de NF- κ B (OH et al., 2009).

Estudos prévios têm mostrado que dietas ricas em ω -6 podem aumentar o risco de doenças crônicas associadas à um estado inflamatório. Por outro lado, um consumo elevado de ω -3 parece reduzir o aparecimento de várias doenças, incluindo doenças coronarianas, diabetes tipo 2, artrite reumatoides, asma, depressão e câncer. Tem-se sugerido que a proporção balanceada desses dois tipos de ácidos graxos pode ser necessária para prevenção e tratamento de doenças agudas (IWASAKI et al., 2011).

Este estudo busca compreender, portanto, o impacto do uso de misturas de lipídios ofertadas antes do estabelecimento do processo inflamatório (pré-condicionamento) analisando o desenvolvimento da inflamação e suas manifestações secundárias.

1.8 Justificativa

Tendo em vista a importância do pré-condicionamento em inúmeros relatos, estudos que utilizem o pré-condicionamento nutracêutico podem vir a ser realizados com o intuito de elucidar formas alternativas ao tratamento convencional da artrite. Sabendo-se que a dor e incapacidade de deambulação são os principais sintomas pelo qual o paciente procura tratamento e que, até o momento, não existe a cura para a mesma, dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), especialmente EPA e DHA, podem prevenir o desenvolvimento de doenças inflamatórias (PINHEIRO et al., 2011) ou atenuar processos inflamatórios já em curso (CAMPELO, 2012).

No presente estudo foram utilizadas misturas de óleos em concentrações nutracêuticas, com alta razão de ω -9/ ω -6 com ação antioxidante e baixa razão de ω -6/ ω -3 que favorece uma ação anti-inflamatória, conforme estudos apresentados em outras situações biológicas (ALLAYEE; ROTH; RODIS, 2009; SIMOPOULOS 2002, 2008). O uso destas misturas, por via orogástrica, já foi implementado após a instalação da lesão (CAMPELO, 2012) ou como pré-condicionante, ou seja, antes da geração do evento, seja ele trauma (NAKAMURA et al., 2005), isquemia/reperfusão (PINHEIRO et al., 2011) ou indução de inflamação crônica (VASCONCELOS, 2013).

Não há relato, na literatura consultada, de estudos de pré-condicionamento com ácidos graxos em inflamação aguda, justificando a realização deste trabalho usando o modelo experimental de artrite aguda em ratos.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo do pré-condicionamento com mistura (MIX) de óleos (ω -3, ω -6 e ω -9), com elevada proporção de ω -9/ ω -6 e com baixa proporção de ω -6/ ω -3, no modelo de artrite induzida por zymosan em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar a atividade antinociceptiva dos mix na artrite por zymosan (incapacitação articular em joelho de rato);
- Investigar o efeito dos mix sobre a migração celular na artrite induzida por zymosan;
- Avaliar o efeito dos mix sobre o edema na artrite induzida por zymosan;
- Analisar o efeito dos mix sobre o exame histopatológico do tecido sinovial na artrite induzida por zymosan;
- Averiguar o efeito dos mix sobre a imunomarcagem para iNOS e NF-kB no tecido sinovial na artrite induzida por zymosan;
- Estudar o efeito antinociceptivo dos mix no modelo de hipernocicepção plantar induzida por carragenina ou PGE₂;
- Investigar se o perfil da atividade antinociceptiva é direta ou indireta.

3.1 Aspectos Éticos

Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal adotados pelo Código Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, sob o protocolo número 50/11.

3.2 Animais

Foram utilizados 90 ratos machos da linhagem Wistar, com peso médio corporal de 180 a 200 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Foram

utilizados seis animais por grupo experimental, os quais foram mantidos em gaiolas, em uma sala especial sob condições de temperatura (24°C) e controlados os ciclos de claro/escuro até o dia do experimento. Esses animais receberam ração padrão e água *ad libitum* como parte da alimentação diária até a execução dos experimentos.

3.3 Delineamento Experimental

3.3.1 Divisão dos Grupos de Estudo

Os óleos de mix ômega 3, 6 e 9 foram administrados durante 7 dias consecutivos, antes da artrite induzida por zymosan (AIZy), sempre no mesmo horário, por via orogástrica. Essas doses diárias foram de 1,2g mistura /kg/dia de óleo com a proporção 1,4:1 de ω -6/ ω -3 (efeito anti-inflamatório) e de 3,7:1 de ω -9/ ω -6 (efeito antioxidante). O que diferencia os grupos tratados são as diferentes fontes de ω -3: ALA, EPA e DHA, provenientes de linhaça, óleo de peixe e algas, resultando nos grupos denominados MIX-1, MIX-2 e MIX-3, respectivamente (Quadro 2). As soluções foram administradas de 24/24 horas, sempre no mesmo horário (período da manhã).

Quadro 2 - Soluções e composição com respectiva fonte de ω -3

Solução	Composição	Fonte de ω -3	Proporções
MIX- 1	ω -9 + ω -6 + ω -3 Óleo de canola Óleo de girassol rico em oléico Óleo de linhaça	ALA	ω -6: ω -3 = 1,4:1 ω -9: ω -6 = 3,7:1
MIX-2	ω -9 + ω -6 + ω -3 Óleo de canola Óleo de girassol rico em oléico Óleo de peixe	ALA (35%) EPA (39%) DHA (26%)	ω -6: ω -3 = 1,4:1 ω -9: ω -6 = 3,7:1
MIX-3	ω -9 + ω -6 + ω -3 Óleo de canola Óleo de girassol rico em oléico DHA puro de algas	ALA (84%) DHA (16%)	ω -6: ω -3 = 1,4:1 ω -9: ω -6 = 3,7:1

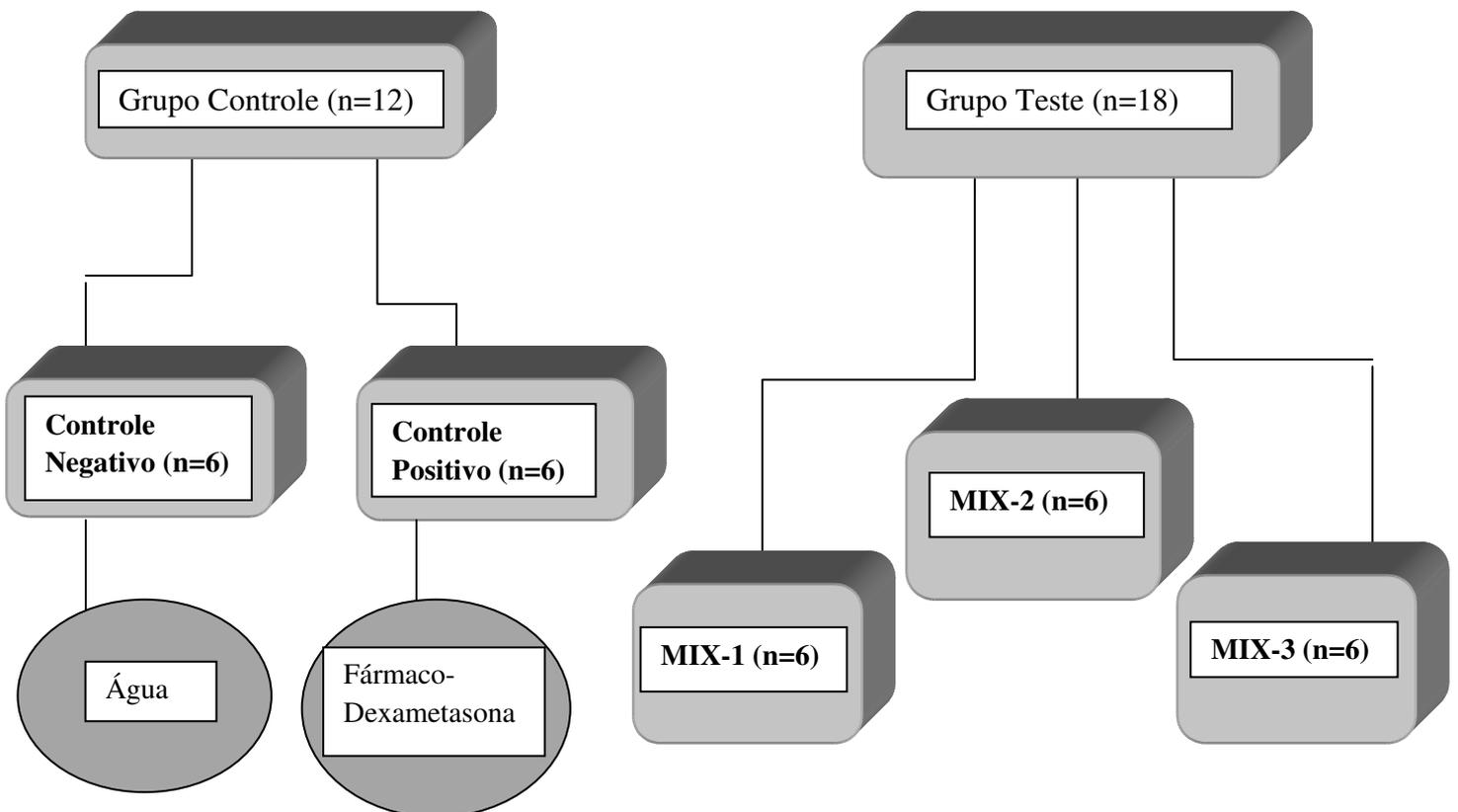
Fonte: Vasconcelos (2013, p.36)

ALA = ácido α -linolênico; EPA = ácido eicosapentaenoico; DHA = ácido docosaheptaenóico.

O delineamento experimental foi dividido em 3 partes de acordo com o modelo: Parte 1- artrite aguda induzida por Zymosan (Zy) (Figura 7), Parte 2- hipernocicepção mecânica plantar induzida por Carragenina (Cg) (Figura 8) e Parte 3- hipernocicepção mecânica plantar induzida por PGE2 (Figura 9), sendo cada experimento composto de 30 animais. Em cada parte do protocolo (1, 2 e 3), os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em dois grupos: o Controle (n=12) e o Teste (n=18). O grupo Controle foi subdividido em dois grupos de 6 animais, cada: Controle Negativo (n=6) cujos animais receberam 1 mL de água, diariamente,

por via orogástrica, durante sete dias. O grupo Controle Negativo foi relatado durante todo o experimento como, apenas, Controle. O Controle Positivo (n=6), cujos animais não receberam nenhum dos MIX, durante esses sete dias, porém esse grupo foi tratado com o fármaco padrão (Parte 1- Dexametasona ou Parte 2- Indometacina ou Parte 3- Dipirona) no 8º dia (dia do experimento) em cada modelo experimental respectivo. O grupo Controle Positivo foi caracterizado com o nome da droga de tratamento utilizada (Dexa ou Indometacina ou Dipirona). O grupo Teste foi subdividido em três grupos de 6 animais submetidos, diariamente, à administração orogástrica de MIX-1 (n=6), MIX-2 (n=6) e MIX-3(n=6), respectivamente.

Figura 7 - Parte 1- Artrite aguda induzida por Zymosan (Zy)

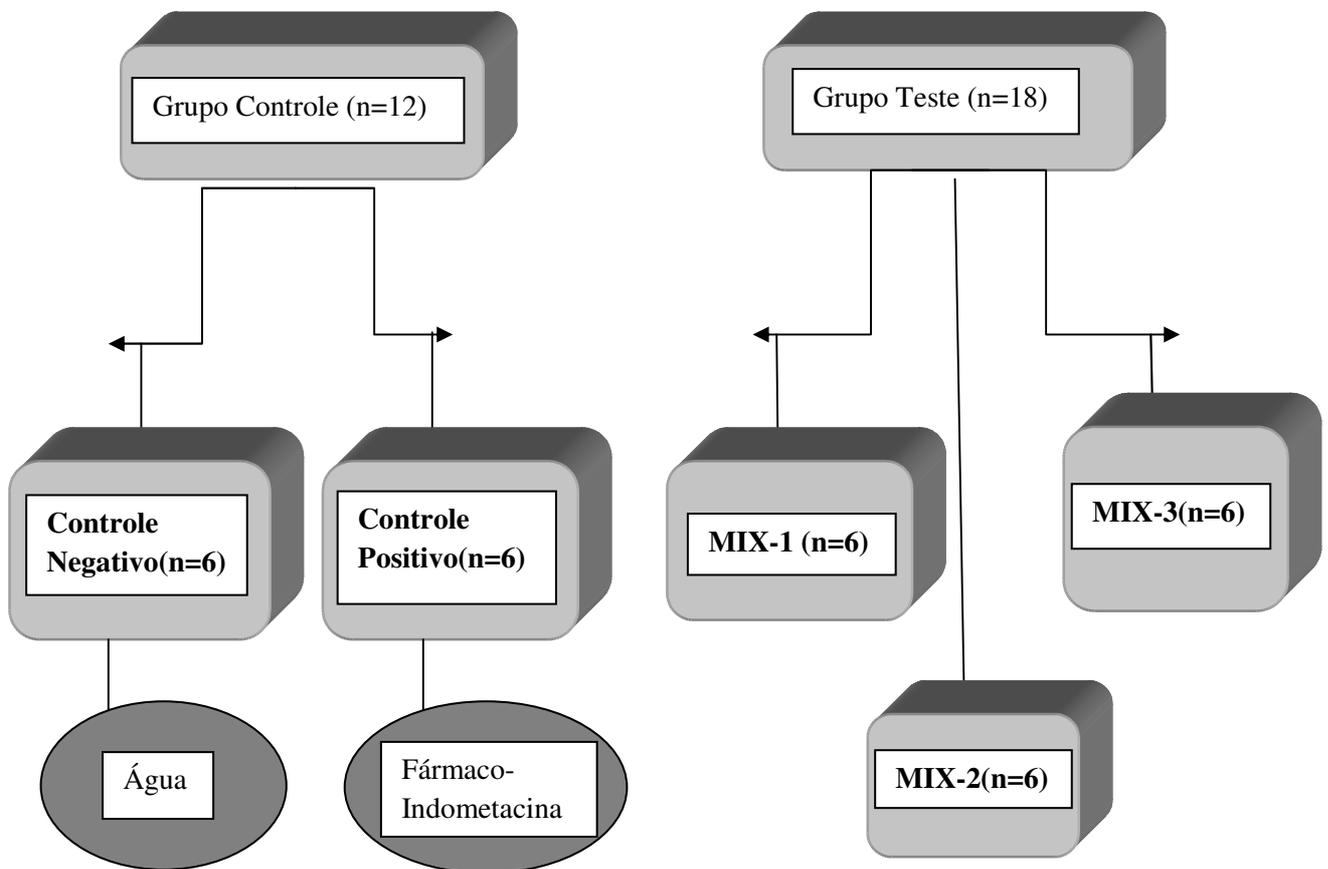


Fonte: A autora.

Na Parte 1 (Figura 7) foi induzida, no oitavo dia, em todos os grupos (Controle e Teste) a artrite por meio de uma injeção intra-articular (i.a.) de zymosan (1mg/50µL) no joelho direito. Para cada avaliação de parâmetros (variáveis) foram utilizados os cinco grupos (Controle positivo, Controle negativo, MIX-1, MIX-2 e MIX-3). Foram divididos subgrupos experimentais para cada variável a ser analisada, como: incapacitação articular, infiltrado leucocitário e neutrofílico, edema, permeabilidade vascular, atividade de mieloperoxidase

(MPO), imunomarcção para NF- κ B e iNOS e histopatológico do tecido sinovial. Além dos grupos (Controle e Teste), foi utilizado em alguns experimentos o grupo *Naïve* o qual é composto de joelhos normais (joelho esquerdo- contra-lateral do controle negativo), sem alteração fisiológica e sem artrite. Esse grupo específico *Naïve* foi utilizado apenas nos seguintes parâmetros: infiltrado leucocitário, atividade de mieloperoxidase, extravasamento de azul de Evans, imunomarcção de iNOS e NF- κ B e histopatológico com objetivo de ser mais uma forma de comparação.

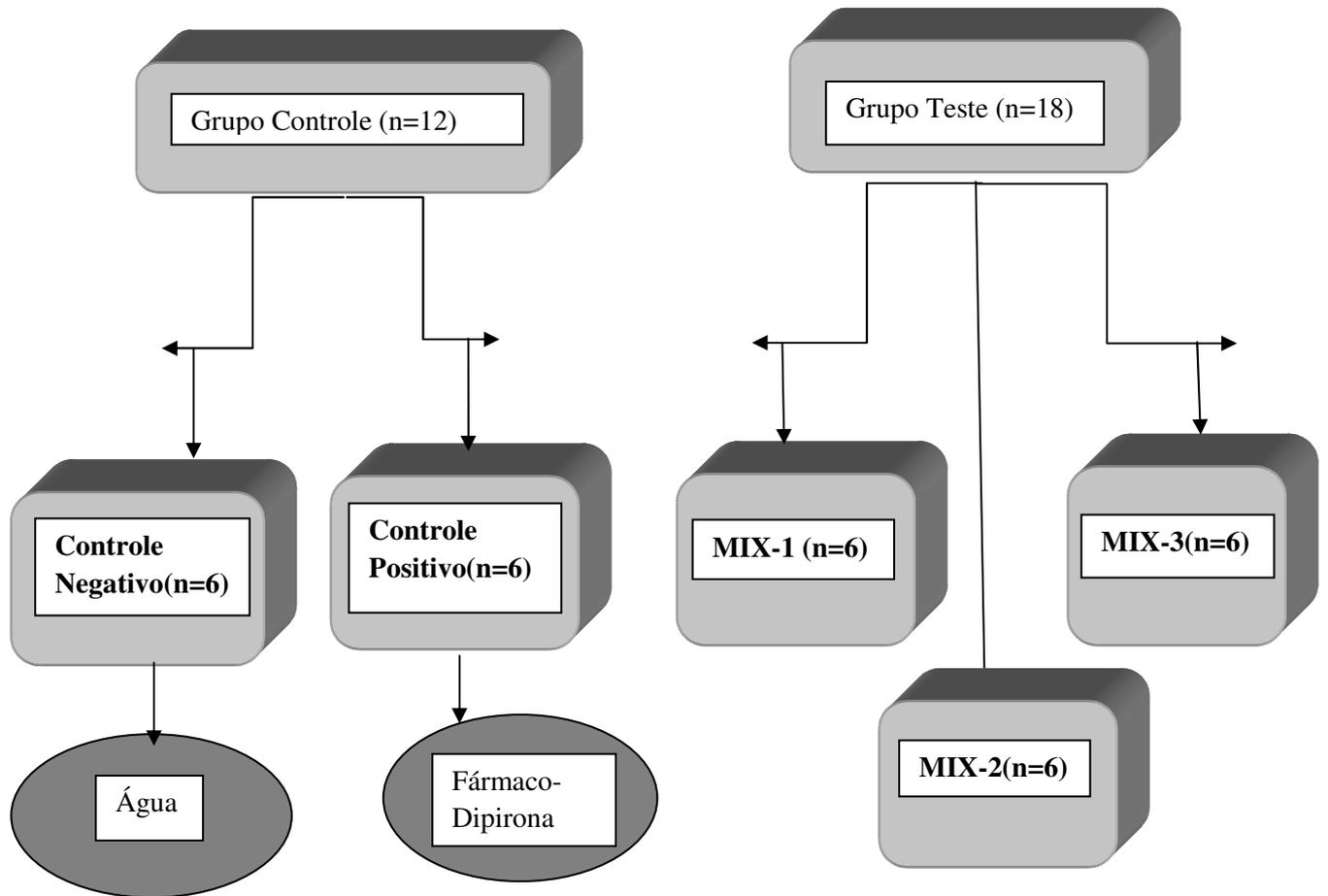
Figura 8 - Parte 2- Hipernociceção mecânica plantar induzida por Carragenina (Cg).



Fonte: A autora.

Na Parte 2 (Figura 8) foi induzida, no oitavo dia, em todos os grupos (Controle e Teste) a hipernociceção mecânica plantar por meio de uma injeção intraplantar (i.pl.) de carragenina (Cg: 300 μ g/pata) na pata direita.

Figura 9 - Parte 3- Hipernociceção mecânica plantar induzida por PGE2.



Fonte: A autora.

Na Parte 3 (Figura 9) foi induzida, no oitavo dia, em todos os grupos (Controle e Teste) a hipernociceção mecânica plantar por meio de uma injeção intraplantar (i.pl.) de PGE2 (PGE2: 400ng/pata) na pata direita.

3.4 Protocolos Experimentais

3.4.1 Indução da Artrite por Zymosan em Joelho de Rato

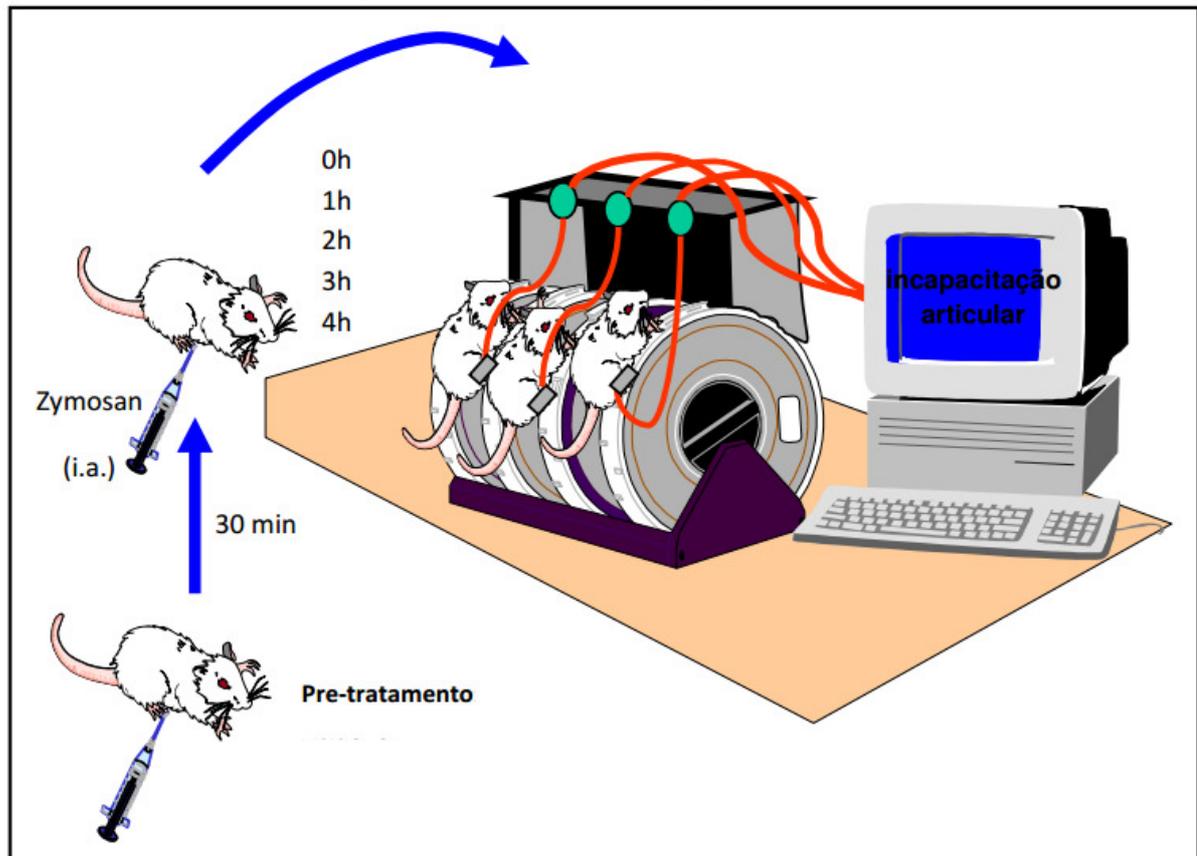
Os ratos machos, da linhagem Wistar, foram submetidos à uma leve anestesia com éter etílico e, em seguida, induzida artrite por meio da injeção intra-articular (i.a), no joelho posterior direito, de zymosan dissolvido em solução salina estéril (1mg/animal; 50µl). Após 4

horas da artrite induzida por zymosan, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% (0,1ml/30g, i.p) e, em seguida, eutanasiados.

3.4.2 Análise da Incapacitação Articular (Hipernocicepção)

Uma das formas de avaliação da hipernocicepção foi realizada por meio do Teste de Incapacitação Articular em ratos. Tonussi e Ferreira (1992) descreveram este modelo antes e, posteriormente, modificado e ajustado para nosso laboratório (MAGALHÃES et al., 1997, VIANA et al., 1998; ROCHA et al., 1999). Ratos machos da linhagem Wistar, receberam uma injeção intrarticular, no joelho posterior direito, de zymosan (1mg/animal; 50 μ l). Foram postos para deambular, forçadamente, em um carrossel de piso metálico (cilindro de alumínio, 30cm de diâmetro x 50cm de largura, coberto por uma tela de alumínio nas mesmas proporções), giratório, com capacidade para três ratos com velocidade utilizada de 3 rotações por minuto (rpm) (Figura 10). As patas traseiras foram calçadas com sapatilhas metálicas desenhadas, especialmente, com a finalidade da sapatilha calçada na pata direita correspondesse ao joelho injetado com zymosan. Essas sapatilhas foram conectadas à porta de dados de um microcomputador, no qual estava instalado um programa de aquisição de dados (IA– incapacímetro articular V1.0). Ao tocar com a sapatilha no piso metálico concluía-se um circuito. Ao final de 1 minuto, o computador registra o tempo de suspensão da pata (TSP), ou seja, o tempo que o animal permaneceu com a pata levantada sem encostar-se ao piso. O TSP foi medido antes da injeção do estímulo (tempo zero) e de hora em hora até a 4ª hora. Assim, um aumento do TSP indica nocicepção (incapacitação articular), ou seja, a incapacidade do animal deambular normalmente sobre o carrossel (Figura 10). Vale ressaltar, que 24 horas antes da realização do ensaio os animais foram treinados, permitindo-se um período de deambulação e adaptação ao ambiente.

Figura 10 - Artrite induzida por zymosan (teste de incapacitação articular em joelho de rato)



Fonte: Araújo (2012, p.43)

3.4.3 Coleta do Lavado Articular

Após o teste de incapacitação articular, os animais foram eutanasiados e a pele e os ligamentos articulares do joelho injetado foram removidos. Procedeu-se a lavagem da cavidade articular do joelho com duas injeções de 200 μ l de EDTA10mM em PBS através da membrana sinovial. Em seguida, recolheu-se o exsudato articular por aspiração. As amostras foram colocadas em tubos *ependorff* e mantidas em banho de gelo. Por fim, as alíquotas coletadas foram para análise da migração celular (contagem total e diferencial de leucócitos); dosagem de mieloperoxidase (MPO).

3.4.4 Contagem Total de Leucócitos

A contagem do número total de células foi feita na câmara de Neubauer utilizando 20 μ l do lavado articular diluído em 380 μ l da solução de Turk. Em seguida, 20 μ l dessa amostra (solução de Turk + lavado articular) foi colocado na câmara de Neubauer e foi realizada a contagem do número total de leucócitos nos quatros quadrantes da câmara com

auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x). Empregou-se o contador manual e, o resultado final é expresso como número de leucócitos totais x 10^6 /ml.

3.4.5 Contagem Diferencial de Leucócitos

Após a retirada de alíquotas para contagem total do número de leucócitos, o lavado articular foi centrifugado (1.500 rpm, 10 min, 4° C). O sobrenadante foi estocado à -70° C, e o *pellet* celular foi ressuspenso em 200µl de solução de PBS e EDTA. Em seguida, as lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação (1.500 rpm, 10 min) de uma alíquota do lavado articular (50µl). As lâminas 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. No final, procedeu-se a contagem diferencial das células do exudato articular. As células foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 100x). Foram então contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se os tipos celulares em: neutrófilos, linfócitos, macrófagos e monócitos. O número de neutrófilos presentes no lavado articular foi obtido através da porcentagem de neutrófilos (contagem diferencial) e da quantidade de células total presentes no lavado articular. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos x 10^6 /ml.

3.4.6 Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares e tem sido usado como índice quantitativo para avaliar a inflamação em vários tecidos. Para tanto, as amostras colhidas do líquido sinovial previamente foram descongeladas e 50µL do líquido foram colocados em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, adicionaram-se 25µL de TMB (3,3', 3, 3- tetramethylbenzidine; 1,6Mm) e 100µL de H₂O₂ (0,5Mm) e, posteriormente, placa foi incubada por 5 min a 37°C. A seguir, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4 M. Realizou-se a quantificação dos neutrófilos a partir de uma curva padrão de neutrófilos (1 x 10⁵ neutrófilos/ poço / 50µL). Determinou-se a absorvância em leitor de ELISA no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos como neutrófilos / µL de líquido sinovial.

3.4.7 Coleta do Tecido Sinovial de Joelho de Rato

Os animais receberam injeção intrarticular de zymosan (1mg/animal, 50 μ L) no joelho posterior direito, após quatro horas de experimento foram anestesiados por via i.p. com hidrato de cloral 10% (0,1 ml/30g, i.p.) e eutanasiados. Para coleta do tecido sinovial, a pele e os ligamentos articulares do joelho injetado foram removidos e procedeu-se a remoção cirúrgica do tecido sinovial. O tecido foi fixado em formol 10% e 24h depois em álcool 70%. As peças foram desidratadas e parafinizadas para corte e confecção de lâminas para imunohistoquímica.

3.4.8 Análise de Edema nas Articulações do Joelho

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

3.4.9 Permeabilidade Vascular por Extravasamento de Azul de Evans na Articulação

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

O Azul de Evans (25mg/kg) foi administrado por injeção endovenosa 1 hora antes da eutanásia. Após seis horas da injeção de zymosan, os animais foram eutanasiados e a sinóvia e tecidos periarticulados foram dissecados de cada joelho de forma conjunta. Em seguida, foram coletadas as articulações de cada grupo especificado. Cada articulação foi colocado em um tubo de ensaio contendo 2ml de formamida. Retirando-se o tecido, o líquido foi utilizado para análise por espectrofotometria. Os tecidos obtidos a partir de cada articulação do joelho foram pesados, e a quantidade de azul de Evans nas amostras foi estimada utilizando uma técnica de extração, onde o tecido extraído foi colocado em uma solução de formamida (2 ml) em tubos de vidro e incubou-se a 40° C *overnight* para a extração do corante. Cada tubo foi centrifugado durante 10 min a 2.000 rpm, e 200µl do sobrenadante foi separado para a medição da absorvância a 620 nm usando um leitor de microplacas (Biotek Instruments, Winooski, VT). A quantidade de corante reabsorvido foi calculada por comparação da absorvância do fluido com a de uma curva padrão preparado com concentrações conhecidas de uma solução de azul de Evans.

3.4.10 Análise Imunohistoquímica para NF-Kb e iNOS

Os marcadores NF-κB e iNOS no tecido sinovial são indicativos de respostas inflamatórias que ocorreram. Logo, esses marcadores são muito importantes para analisar a inibição ou presença de processo inflamatório na região a ser considerada. A sinóvia foi removida como já descrito, e fixada em formol a 10% durante 24 horas. Posteriormente, foram desidratadas e, então, incluídas em parafina. A imunohistoquímica para NF-Kb e iNOS foi realizada no tecido sinovial da articulação do joelho de ratos usando o método estreptavidina-biotina-peroxidase. Os tecidos foram cortados no plano transversal com 4µm de espessura com o auxílio de um micrótomo. As secções de tecidos foram montadas em lâminas especiais para imunohistoquímica. O ensaio de imunohistoquímica foi realizado na seguinte sequência: desparafinização e hidratação dos cortes. Na desparafinização as lâminas foram deixadas em estufa a 66-88°C durante três horas. Em seguida, foram colocadas em xilol (três banhos com duração de cinco minutos cada). A reidratação foi realizada em concentrações de alcoóis decrescentes 100%, 90% e 70% (banhos com duração de cinco minutos cada) e água destilada (banho com duração de cinco minutos), seguida da ativação antigênica em tampão citrato pH 6,0 (98°C por 15min, em forno microondas), após esfriamento (20 min), foi realizada inibição da peroxidase tecidual com peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) a 3% (dois banhos, 10min cada) e lavadas em PBS. Em seguida, as secções foram incubadas com os anticorpos primários (anti-NF-Kb ou anti- iNOS produzidos em coelho), *overnight* a 4°C, os anticorpos foram diluídos a 1:200 em albumina bovina 5% (BSA 5%). O controle negativo não recebeu anticorpo primário.

No dia seguinte, o anticorpo primário foi removido por lavagem em tampão PBS e as secções foram incubadas durante 30 minutos com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho, diluído em BSA 5%, diluição 1:400). Após lavagem em PBS ocorreu à incubação com o complexo estrepto-avidina-peroxidase (complexo ABC) durante 30 minutos. A coloração foi realizada através da adição do diaminobenzidina-peróxido de hidrogênio (DAB-peróxido). Este corante produz uma marcação de cor marrom. Foi realizada a contra-coloração com hematoxilina de Mayer durante cinco minutos. Então, foi realizada a desidratação em gradações de etanol, seguidas de xilol e depois foram montadas com entelan. Após a secagem as lâminas foram examinadas no microscópio Leica® e registradas as fotografias dos cortes obtidos do tecido sinovial. A quantificação da área marcada nas fotos foi feita diferenciando as áreas marcadas em pixels pela maior saturação de cor associada a marcação (marrom). Para isso foi utilizado o programa Image J – NIH (Fiji). O procedimento foi baseado na saturação da cor associada a marcação positiva para um determinado marcador. Os limites necessários para definição de pixels marcados e não marcados foram definidos previamente através da ferramenta “color threshold” do software.

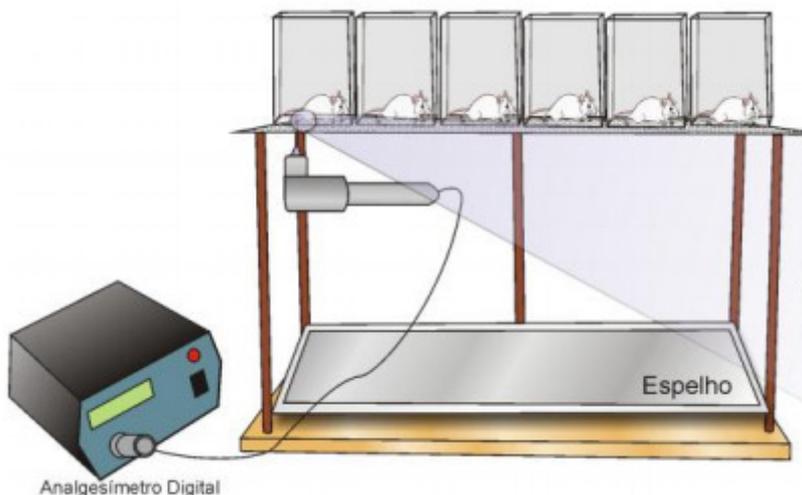
3.4.11 Análise Histopatológica Articular

A sinóvia foi removida como já descrito, e fixada em formol a 10% durante 24 horas. Posteriormente, foram desidratadas e, então, incluídas em parafina. A seguir, os tecidos sinoviais foram suspensos em sulfato de sódio a 5%, sendo, então, incluídas em parafina. Após este procedimento, foram feitos cortes seriados de 4 µm em micrótomo apropriado e as lâminas obtidas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). Os cortes histológicos foram examinados ao microscópio ótico objetivando analisar a proliferação ou inibição de tecido fibroso, do tecido adiposo, do infiltrado celular, da integridade da cápsula articular e de células gigantes (PAIVA et al., 2011).

3.4.12 Teste de Hipernociceção Mecânica Plantar

Os animais receberam uma injeção intraplantar (i. pl.) de carragenina (Cg; 300 μ g/pata) ou prostaglandina E₂ (PGE₂; 400ng/pata) nas patas traseiras direitas. A intensidade de hipernociceção foi avaliada pelo limiar de sensibilidade de cada animal a um estímulo mecânico produzido pela pressão gradual exercida por um filamento rígido acoplado a um aparelho que registra a pressão em gramas exercida na ponta desse filamento. A estimulação mecânica foi exercida na região plantar das patas traseiras direitas, como é demonstrado na figura 11. O aparelho (eletronic Von-Frey anesthesiometer) registra a pressão em gramas suficiente para provocar uma reação descrita como uma flexão da pata seguida por um “*flinch*” após a retirada da pata em contato com o aparelho (CUNHA et al., 2004).

Figura 11 - Teste de hipernociceção mecânica plantar



Fonte: Adaptado por Lino et al. (2011).

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

3.5 Análise estatística

Os dados paramétricos 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-

Kels. A significância estatística foi observada quando obtinha o valor de $p < 0,05$. Para realização dos testes estatísticos foi utilizado o *software* Prisma versão 5.0 da *GraphPad Software*.

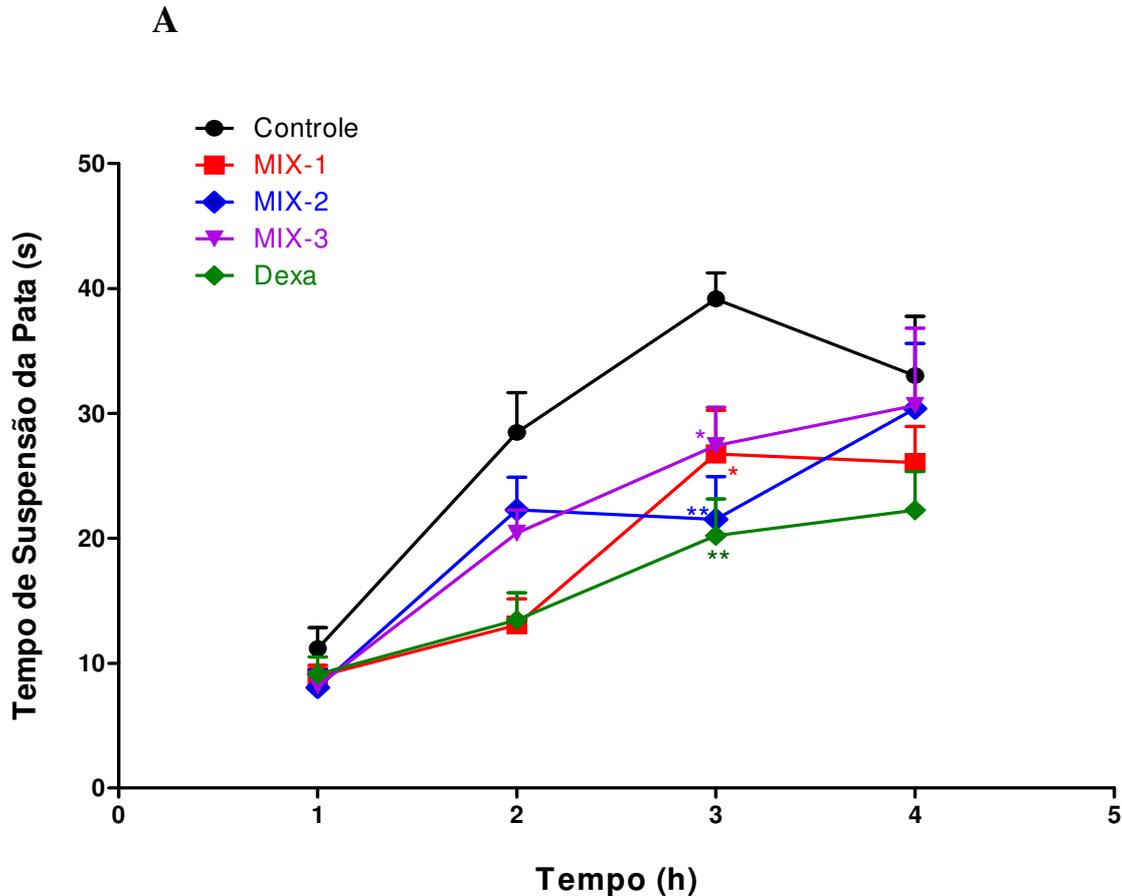
Dados não-paramétricos (escores histopatológicos) foram expressos como mediana, valores mínimos e máximos. Posteriormente, foi executada a análise estatística por meio do teste de KRUSKAL-WALLIS seguido do teste de Dunns.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito antinociceptivo do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato

Os animais desenvolveram incapacitação articular quando o valor do tempo de suspensão da pata (TSP) aumentava, o qual era medido pelo Teste de Incapacitação Articular (hipernocicepção) para ratos. O pico da incapacitação é considerado o ponto que corresponde ao maior valor de TSP, entre a 3ª e 4ª hora, após a administração com Zy. No gráfico a seguir podemos visualizar que o pico se encontra na 3ª hora onde ocorreu o pico do aumento do TSP para o grupo controle em relação aos grupos tratados. Nos grupos que foram condicionados com MIX-1, MIX-2 e MIX-3 (na dose de 1,2 g/Kg de peso/dia, durante 7 dias consecutivos antes da artrite) foram observados que os valores do TSP tiveram diferenças significantes ($p < 0,05$) na reversão da incapacitação articular comparando-se com o grupo controle. A administração da dexametasona (na dose de 4mg/kg, via s.c., 2 horas antes de induzir a reação inflamatória) inibiu de forma significativa ($p < 0,01$) a incapacitação articular medida na 3ª hora sendo semelhante ao grupo tratado com MIX-2. (Figura 12).

Figura 12 - Efeito antinociceptivo do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato



Fonte: A autora

Todos os grupos foram submetidos à artrite induzida por zymosan (1 mg/animal; 50 µl, i.a). Água (Controle, 1ml/animal, v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes do zymosan). MIX-1, MIX-2 e MIX-3 (na dose de 1,2 g/Kg de peso/dia ; v.o, 1 vez ao dia durante 7 dias consecutivos antes do zymosan). Dexametasona (Dexa, 4mg/kg, s.c.; 2h antes do zymosan). A incapacitação articular foi avaliada de hora em hora pelo Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos, até a 4ª hora após a administração do zymosan. Os dados representam média do TSP ± EPM de 6 animais por grupo. (A) cinética da incapacitação articular; maior valor obtido entre a 3ª e 4ª horas após a injeção de zymosan. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 relação ao grupo controle (ANOVA, seguida de Newman-Keuls).

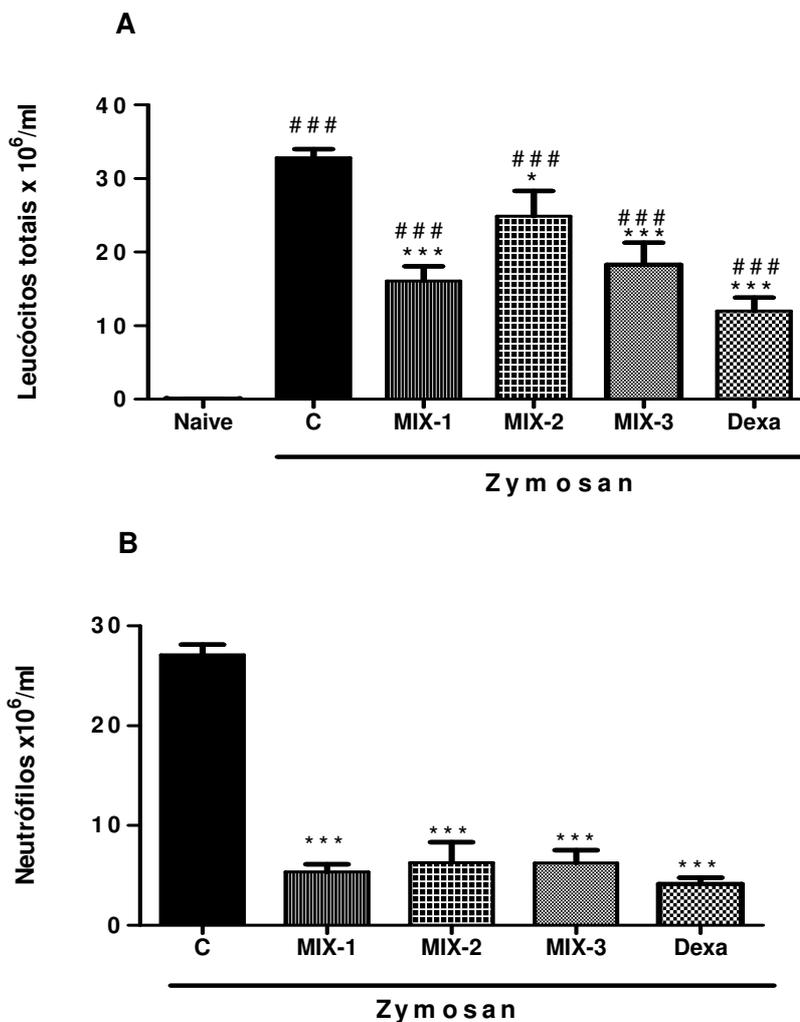
4.2 Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega-3, 6 e 9 sobre o infiltrado de leucócitos na artrite induzida por zymosan em joelhos de rato

O pré-condicionamento com o MIX-1, MIX-2 e MIX-3 (na dose de 1,2 g/Kg de peso/dia, durante 7 dias consecutivos, antes da indução da AIZy) inibiu de forma significativa (p< 0,05) o influxo de leucócitos medido na 4ª hora de artrite, em relação ao grupo controle (Figura 10). Os MIX-1 e MIX-3 demonstraram uma diferença mais significativa com p<0,001

a semelhança com a dexametasona. A administração da dexametasona (na dose de 4mg/kg, via s.c., 2 horas antes de induzir a reação inflamatória) inibiu de forma significativa ($p < 0,001$) o influxo de leucócitos, medido na 4ª hora de artrite (Figura 13A).

Quanto à contagem diferencial de leucócitos observou-se uma diminuição significativa ($p < 0,001$) de células polimorfonucleares com os pré-condicionantes MIX-1, MIX-2 e MIX-3 (na dose de 1,2 g/Kg de peso/dia, durante 7 dias consecutivos, antes da indução da AIZy) comparado ao grupo controle (Figura 13B) semelhante a dexametasona. A administração da dexametasona (na dose de 4mg/kg, via s.c., 2 horas antes de induzir a reação inflamatória) inibiu de forma significativa ($p < 0,001$), o influxo de neutrófilos em relação ao grupo controle.

Figura 13 - Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega-3, 6 e 9 sobre a migração celular para cavidade articular de ratos submetidos à artrite induzida por zymosan em joelhos de rato



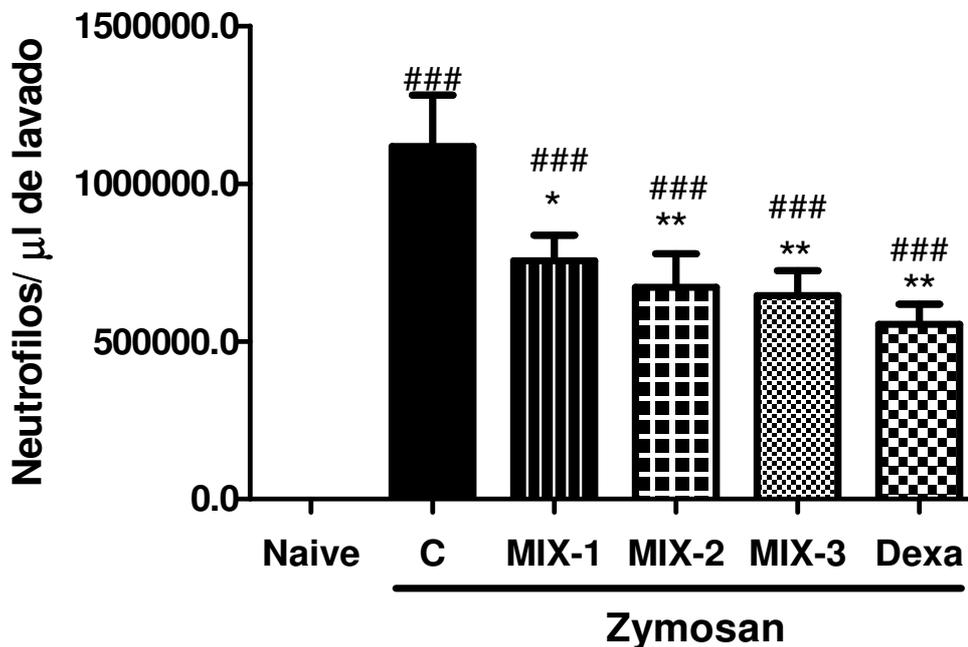
Fonte: A autora

Todos os grupos foram submetidos à artrite induzida por zymosan (1 mg/animal; 50 µl, i.a). Água (Controle, C, 1ml/animal, v.o.; 45 min antes do zymosan, dose única). MIX-1, MIX-2 e MIX-3, na dose de 1,2 g/Kg de peso/dia, durante 7 dias consecutivos ; v.o, 1 vez ao dia). Dexametasona (Dexa, 4mg/kg, s.c.; 2h antes do zymosan). O grupo *Naïve* representa os animais que não receberam nenhum estímulo intra-articular e nem tratamento (joelho esquerdo). O número total de leucócitos foi quantificado no lavado articular após 4 horas. Os dados representam média do número de células ± EPM de 6 animais por grupo. (A) leucócitos totais; (B) Neutrófilos polimorfonucleares. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 relação ao grupo controle (ANOVA, seguida de Newman-Keuls). ### representa diferenças significantes (p<0,001) entre os grupos Controle e Grupos tratados (MIX1, MIX-2 e MIX-3) em relação ao grupo *Naïve*.

4.3 Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a atividade de mieloperoxidase na artrite induzida por zymosan em joelho de rato

Na Figura 14, observa-se que o condicionamento com os MIX-1, MIX-2 e MIX-3 (na dose de 1,2 g/Kg de peso/dia, durante 7 dias consecutivos, antes da indução da AIZy) inibiu de forma significativa (p< 0,05) a atividade de MPO em relação ao grupo controle. Parece ser relacionado à diminuição de migração de neutrófilos para o líquido sinovial. Quando se compara os grupos Controle e Pré- condicionados (MIX-1, MIX-2 e MIX-3) em relação ao grupo *Naïve*, todos tiveram diferenças significantes (p<0,001). A dexametasona (na dose de 4mg/kg, via s.c., 2 horas antes de induzir a reação inflamatória) bloqueou de forma significativa a atividade de MPO em relação ao grupo controle (p<0,01) e em relação ao grupo *Naïve* (p<0,001).

Figura 14 - Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) na artrite induzida por zymosan em joelho de rato.



Fonte: A autora

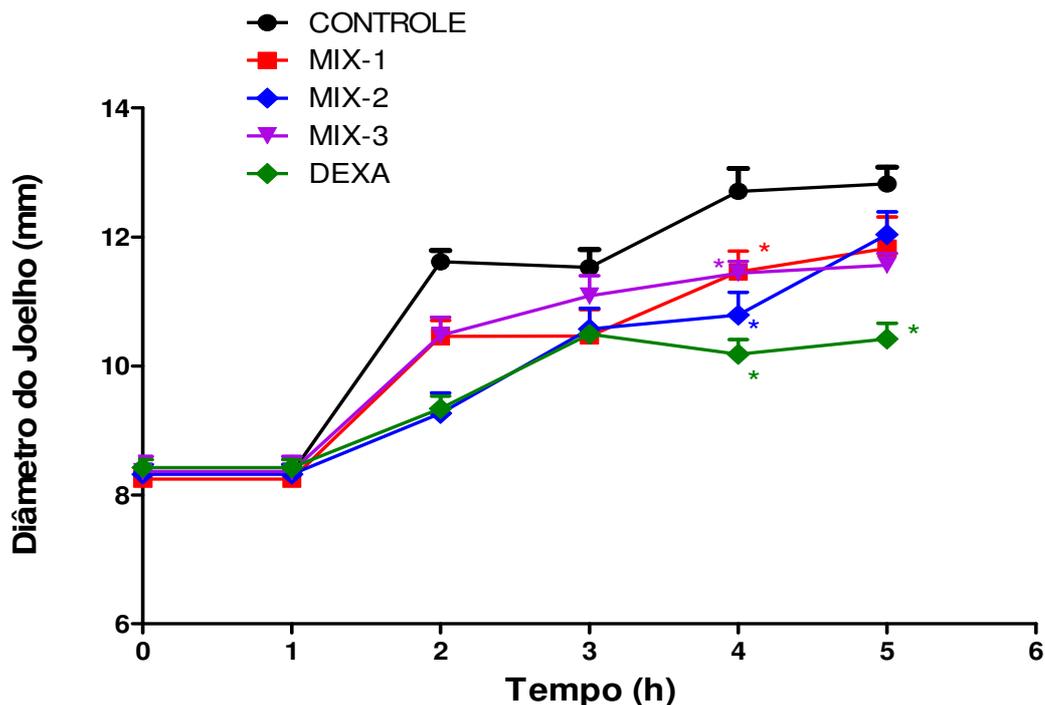
Todos os grupos foram submetidos à artrite induzida por zymosan (1 mg/animal; 50 μl , i.a). Água (Controle, C, 1ml/animal). MIX-1, MIX-2 e MIX-3 (na dose de 1,2 g/Kg de peso/dia, durante 7 dias consecutivos antes da artrite; v.o.; 1 vez ao dia). Dexametasona (Dexa, 4mg/kg, s.c.; 2h antes do zymosan). O grupo *Naive* representa os animais que não receberam nenhum estímulo intra-articular e nem tratamento. Avaliação da atividade de mieloperoxidase foi realizada no líquido sinovial coletado. Os resultados são expressos como uma quantificação dos neutrófilos a partir de uma curva padrão de neutrófilos (1×10^5 neutrófilos/ poço / 50 μL). Determinou-se a absorvância em leitor de ELISA no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos como neutrófilos/ μL de líquido sinovial lavado \pm EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $P < 0,001$ relação ao grupo controle. (ANOVA, seguida de Newman-Keuls). ### ($p < 0,001$) representa diferença significante entre os grupos Controle e Tratados (MIX-1, MIX-2e MIX-3) em relação ao grupo *Naive*.

4.4 Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre o edema articular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato

A migração celular no líquido sinovial é acompanhada de aumento da permeabilidade vascular no joelho dos animais e apresenta o pico de extravasamento plasmático na 5^a h após indução da AIZy. O pré-condicionamento com MIX-1, MIX-2 e MIX-3 (na dose de 1,2 g/Kg de peso/dia, durante 7 dias consecutivos, antes da indução da AIZy no joelho dos ratos)

impediu significativamente ($p < 0,05$) o aumento da permeabilidade vascular em relação ao grupo controle na 4ª h. Já a administração da dexametasona (na dose de 4mg/kg, via s.c., 2 horas antes de induzir a reação inflamatória) inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) o aumento da permeabilidade vascular na 4ª e 5ª hora após a indução da artrite (Figura 15).

Figura 15 - Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre o edema articular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato



Fonte: A autora

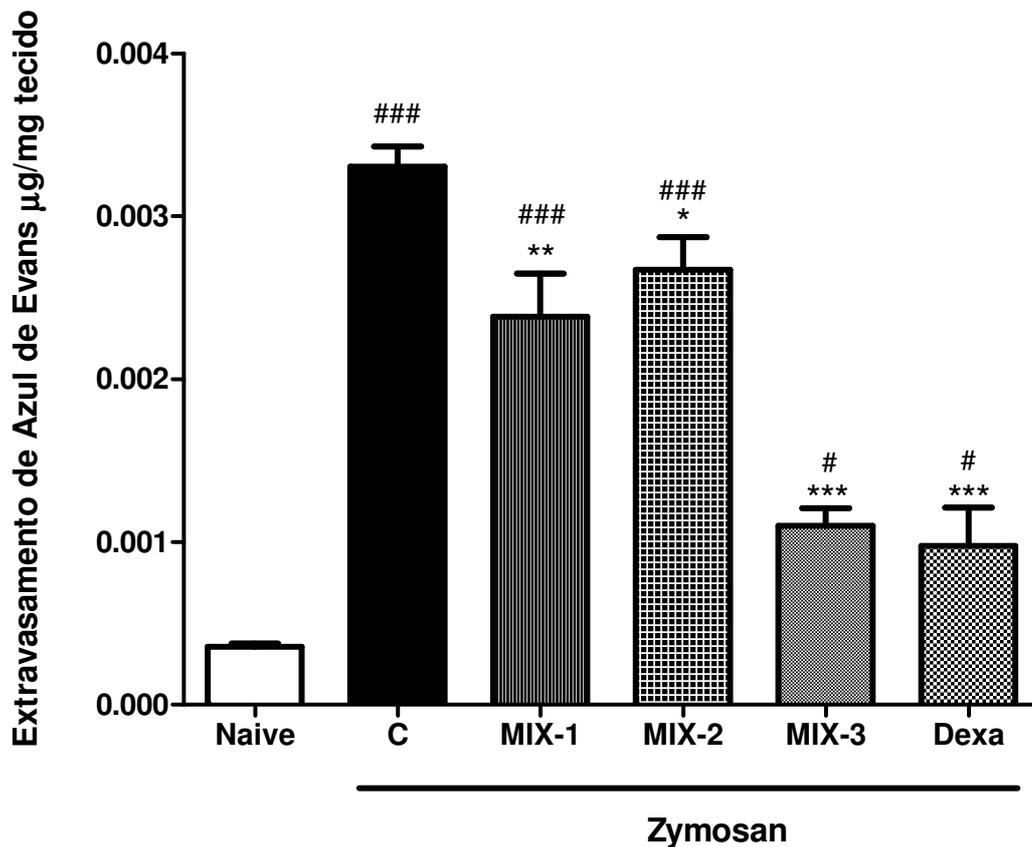
Todos os grupos foram submetidos à artrite induzida por zymosan (1 mg/animal; 50 µl, i.a). Água (Controle, C, 1ml/animal, v.o.). MIX-1, MIX-2 e MIX-3 (na dose de 1,2 g/Kg de peso/dia, durante 7 dias consecutivos antes do zymosan, v.o.; 1 vez ao dia). Dexametasona (Dexa, 4mg/kg, s.c.; 2h antes do zymosan). O gráfico representa a diferença do edema das articulações desde a 0h até a 5h (tratamento 1 vez ao dia, durante 7 dias). Os dados representam a média da diferença do edema ± EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $P < 0,001$ relação ao grupo controle (ANOVA, seguida de Newman-Keuls).

4.5 Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a permeabilidade vascular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato

Observa-se no gráfico a medida µg Azul de Evans/mg de Tecido por cada grupo especificado no experimento. Foram observadas diferenças estatisticamente ($p < 0,05$) nos grupos MIX-1, MIX-2, MIX-3 e Dexametasona em relação ao grupo Controle. Porém, os

grupos MIX-3 e Dexametasona foram os grupos que apresentaram os melhores resultados ($p < 0,001$) em relação ao grupo Controle. Quando comparamos os grupos Controle e MIX-1, MIX-2 e MIX-3 (que foram submetidos à artrite induzida por zymosan -1 mg/animal; 50 μ l, i.a) ao grupo *Naïve*, todos eles tiveram diferenças significantes ($p < 0,05$). Além disso, comparou-se o efeito da diminuição do extravasamento de azul de Evans entre os grupos pré-condicionados (MIX-1, MIX-2 e MIX-3) e chegou-se a conclusão que o MIX-3 obteve o melhor resultado entre eles com diferenças significantes ($p < 0,001$). (Figura 16)

Figura 16 - Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a permeabilidade vascular na artrite induzida por zymosan em joelho de rato.



Fonte: A autora

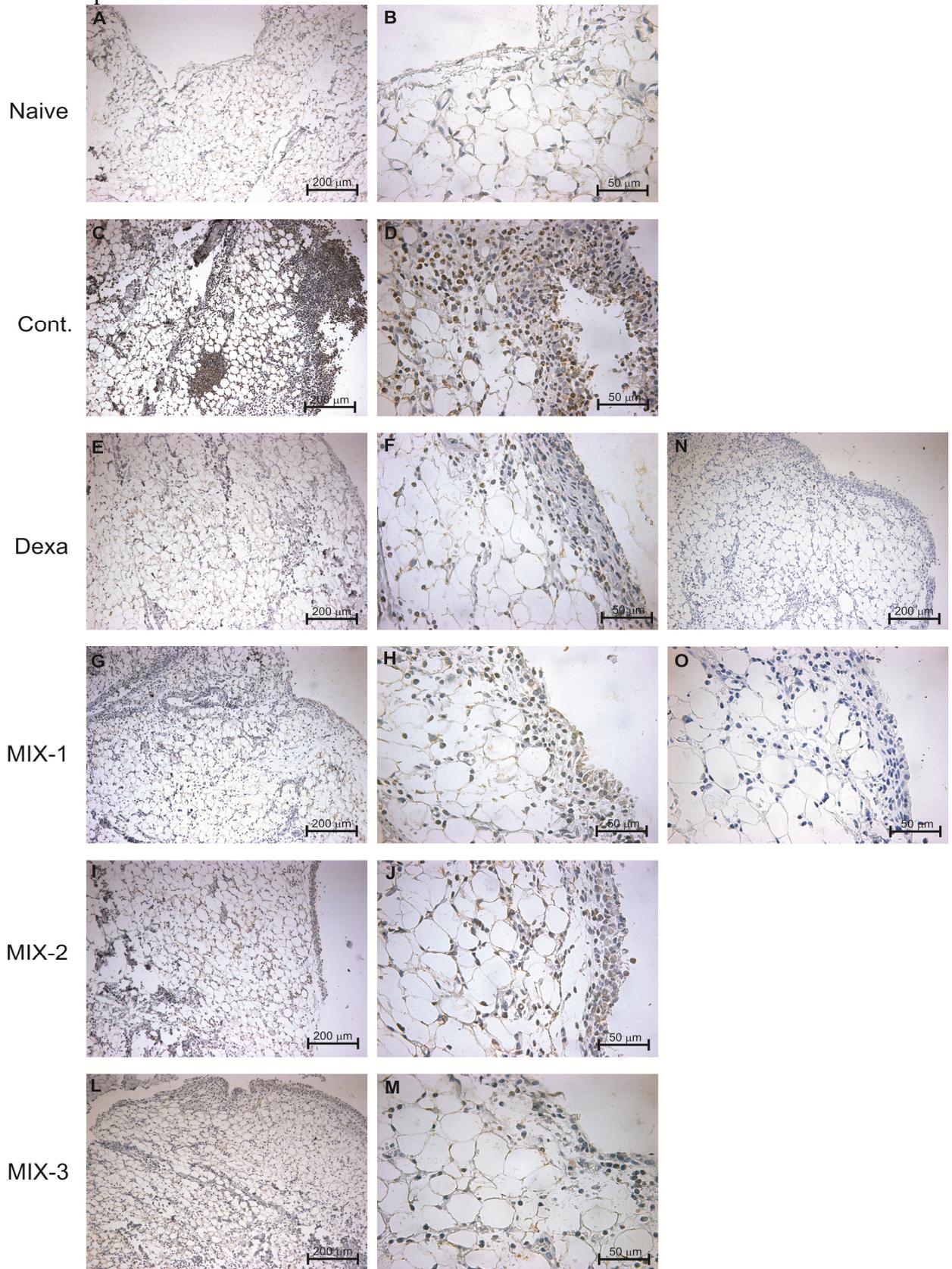
Todos os grupos foram submetidos à artrite induzida por zymosan (1 mg/animal; 50 μ l, i.a). Água (Controle, C, 1ml/animal, v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes do zymosan). MIX-1, MIX-2 e MIX-3 (na dose de 1,2 g/Kg de peso/dia, durante 7 dias consecutivos antes da artrite ; v.o.; 1 vez ao dia). Dexametasona (Dexa, 4mg/kg, s.c.; 2h antes do zymosan). O grupo *Naïve* representa os animais que não receberam nenhum estímulo intra-articular e nem tratamento. Os resultados estão expressos em μ g/ml. Os dados representam a média da quantidade do extravasamento de azul de Evans \pm EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ relação ao

grupo controle (ANOVA, seguida de Newman-Keuls). # representa diferença estatística entre o grupo controle e o *Naïve*.

4.6 Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a imunexpressão do NF-κB e iNOS no tecido sinovial

A análise imunohistoquímica das sinóvias dos grupos testados demonstrou perfis imunológicos distintos entre os grupos. Membranas sinoviais de animais do grupo *Naïve* apresentaram estrutura normal, com pouca presença de infiltrado celular com uma leve imunexpressão de NF-κB (Figura 17, A e B) iNOS (Figura 19, A e B). Membranas do grupo Controle (AIZy) apresentaram intenso infiltrado celular com considerável marcação da expressão inflamatória de NF-κB (Figura 17, C e D) e da iNOS isoforma induzida do NOS (Figura 19, C e D). As figuras 17 (G e H) e 19 (G e H) representam corte imunohistopatológico da membrana sinovial de animal submetido a AIZy e pré-condicionado, durante 7 dias consecutivos, com MIX-1, onde foi observado uma redução do infiltrado celular com, conseqüente, limitação da expressão de NF-κB e iNOS. Nas figuras 17 (I e J) e a figura 19 (I e J) representam o corte imunohistopatológico da membrana sinovial de animal submetido a AIZy e condicionado, durante 7 dias consecutivos, com MIX-2, onde foi observado uma diminuição do infiltrado celular com conseqüente redução da expressão de NF-κB e iNOS semelhante as figuras 17 (L e M) e a figura 19 (L e M), as quais se referem ao grupo MIX-3, pré-condicionados durante 7 dias consecutivos. A análise por imunohistoquímica das membranas sinoviais de animais tratada com dexametasona (na dose de 4mg/kg, via s.c., 2 horas antes de induzir a reação inflamatória) demonstrou diminuição da expressão de NF-κB e iNOS (figuras 17 e 19, E e F, respectivamente). Os grupos que receberam o pré-condicionamento com MIX-1, MIX-2 e MIX-3 obtiveram achados semelhantes com o da dexametasona, os quais inibiram a migração de infiltrado para o tecido e, conseqüentemente, a marcação de NF-κB e iNOS. As figuras (17 e 19, N e O) correspondem ao Controle Negativo, o qual não recebeu o anticorpo primário no experimento. Todas essas características específicas de cada figura mencionada acima podem ser comprovadas de acordo com os gráficos a seguir (FIGURA 18 e 20). Na figura 18 que representa a imunexpressão de NF-Kb, notou-se que os grupos (MIX-1, MIX-2 e MIX-3) e a Dexametasona inibiram consideravelmente a imunexpressão de NF-κB alcançando diferenças significantes ($p < 0,001$) semelhantes aos resultados encontrados no gráfico da figura 20 que representa a imunexpressão de iNOS obtendo diferenças significantes ($p < 0,001$) para os grupos Dexametasona e Pré-condicionados (MIX-1, MIX-2 e MIX-3).

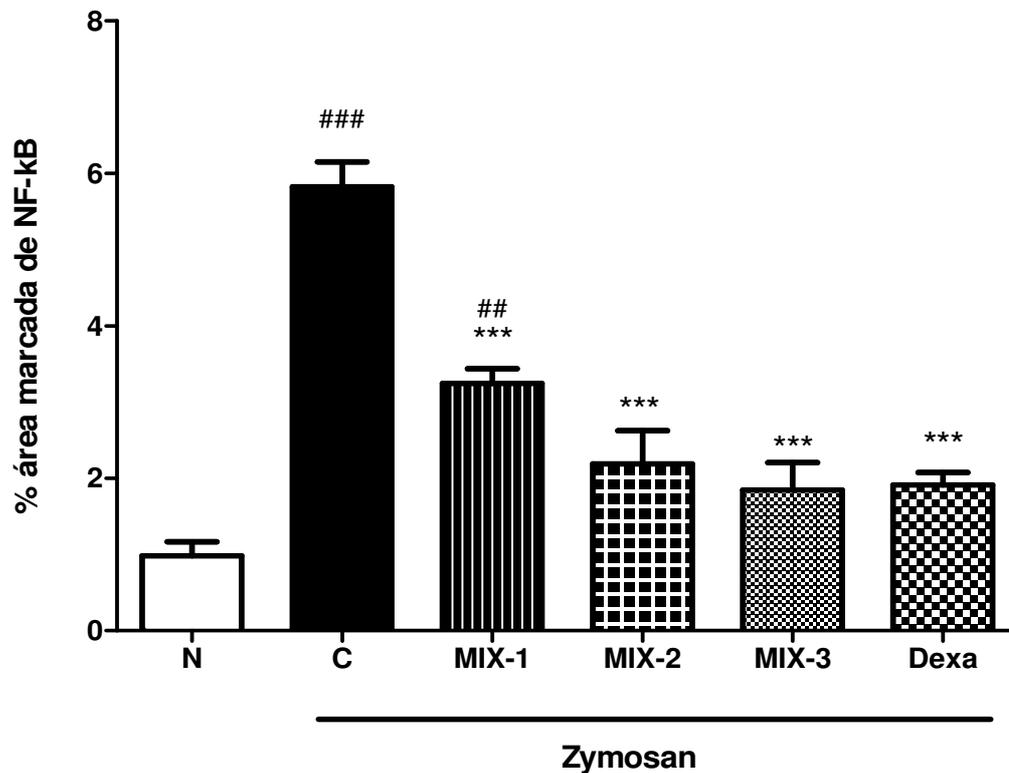
Figura 17 - Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a imunopressão do NF- κ B no tecido sinovial



Fonte: A autora

No gráfico acima as figuras (A e B) representam grupo *Naïve*; (C e D) representam grupo Controle. (E e F) representam grupo tratado com dexametasona, 4mg/kg; (G e H) representam o grupo MIX-1; (I e J) representam grupo MIX-2 ; (L e M) as figuras representativas do grupo MIX-3 ; (N e O) correspondente ao grupo controle negativo o qual não recebeu o anticorpo primário durante o experimento.

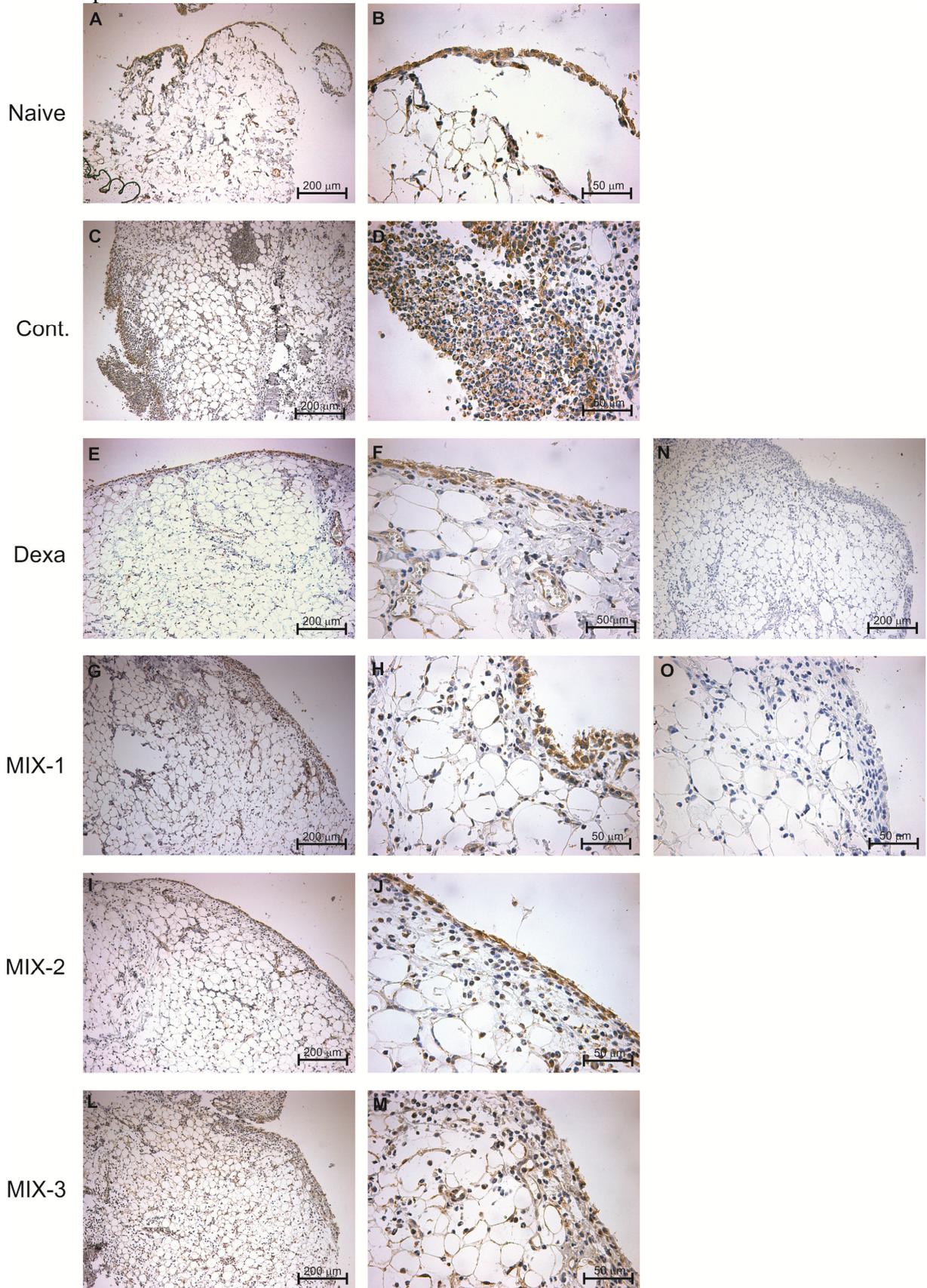
Figura 18 - Quantificação da imunoexpressão para NF-kB em tecido sinovial, de ratos submetidos a artrite por zymosan



Fonte: A autora

Quantificação da área marcada por imunohistoquímica para NF-kB em tecido sinovial. A área positiva que aparece em marrom foi quantificada. Os resultados foram apresentados como percentual de área demarcada (pixels), em relação a área da total da micrografia. Todos os grupos foram submetidos à artrite induzida por zymosan (1 mg/animal; 50 µl, i.a). Água (Controle, C, 1ml/animal, v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes do zymosan). MIX-1, MIX-2 e MIX-3 (na dose de 1,2 g/Kg de peso/dia, durante 7 dias consecutivos antes da artrite; v.o.; 1 vez ao dia). Dexametasona (Dexa, 4mg/kg, s.c.; 2h antes do zymosan). O grupo N- *Naïve* representa os animais que não receberam nenhum estímulo intra-articular e nem tratamento. Os resultados estão expressos como média ± EPM de 6 animais por grupo. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 relação ao grupo controle (ANOVA, seguida de Newman-Keuls).

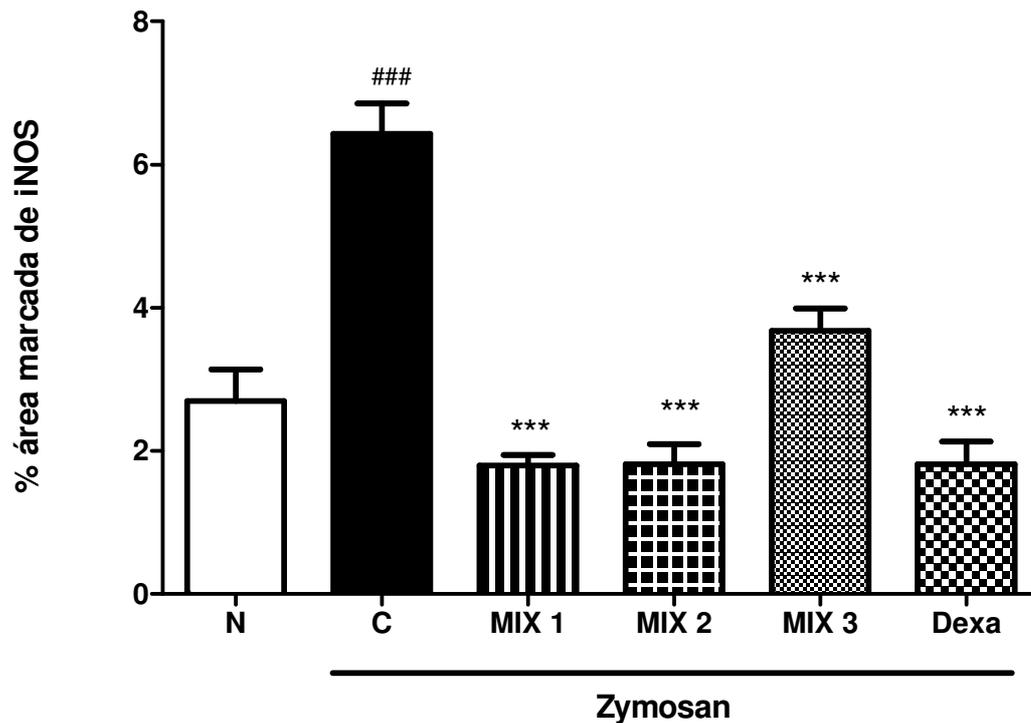
Figura 19 - Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a imunoe expressão do iNOS no tecido sinovial



Fonte: A autora

No gráfico acima as figuras (A e B) representam grupo *Naïve*; (C e D) representam grupo Controle. (E e F) representam grupo tratado com dexametasona, 4mg/kg; (G e H) representam o grupo MIX-1; (I e J) representam grupo MIX-2 ; (L e M) as figuras representativas do grupo MIX-3 ; (N e O) correspondente ao grupo controle negativo o qual não recebeu o anticorpo primário durante o experimento.

Figura 20 - Quantificação da imunoexpressão para iNOS em tecido sinovial, de ratos submetidos a artrite por zymosan



Fonte: A autora

Quantificação da área marcada por imunohistoquímica para NFkB em tecido sinovial. A área positiva que aparece em marrom foi quantificada. Os resultados foram apresentados como percentual de área demarcada (pixels), em relação a área da total da micrografia. Todos os grupos foram submetidos à artrite induzida por zymosan (1 mg/animal; 50 µl, i.a). Água (Controle, C, 1ml/animal, v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes do zymosan). MIX-1, MIX-2 e MIX-3 (na dose de 1,2 g/Kg de peso/dia, durante 7 dias consecutivos antes da artrite ; v.o.; 1 vez ao dia). Dexametasona (Dexa, 4mg/kg, s.c.; 2h antes do zymosan). O grupo N-*Naïve* representa os animais que não receberam nenhum estímulo intra-articular e nem tratamento. Os resultados estão expressos como média ± EPM de 6 animais por grupo. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 relação ao grupo controle (ANOVA, seguida de Newman-Keuls).

4.7 Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre as alterações histopatológicas na artrite induzida por zymosan em joelho de rato

O Quadro 3 representa os escores atribuídos às análises histopatológicas dos tecidos sinoviais. A partir dos cortes seriados dos tecidos, as lâminas obtidas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). Os cortes histológicos foram examinados ao microscópio óptico objetivando analisar a proliferação ou inibição do infiltrado celular, do tecido adiposo, de tecido fibroso, da integridade da cápsula articular e de células gigantes (PAIVA et al., 2011). De acordo com o Quadro 3, observou-se que a administração diária consecutiva do MIX- 1 e MIX-2 preservaram a integridade da cápsula obtendo diferenças significantes ($p < 0,05$) em relação ao grupo Controle. De acordo com o parâmetro Infiltrado Celular, apenas a Dexametasona conseguiu inibir o infiltrado celular adquirindo diferenças significantes ($p < 0,05$). Em relação aos outros parâmetros, permaneceram inalterados. Quando comparamos o grupo Controle em relação o grupo *Naïve*, tiveram diferenças significantes nos seguintes parâmetros: Infiltrado Celular ($p < 0,05$) e Integridade da Cápsula ($p < 0,01$). (Figura 21)

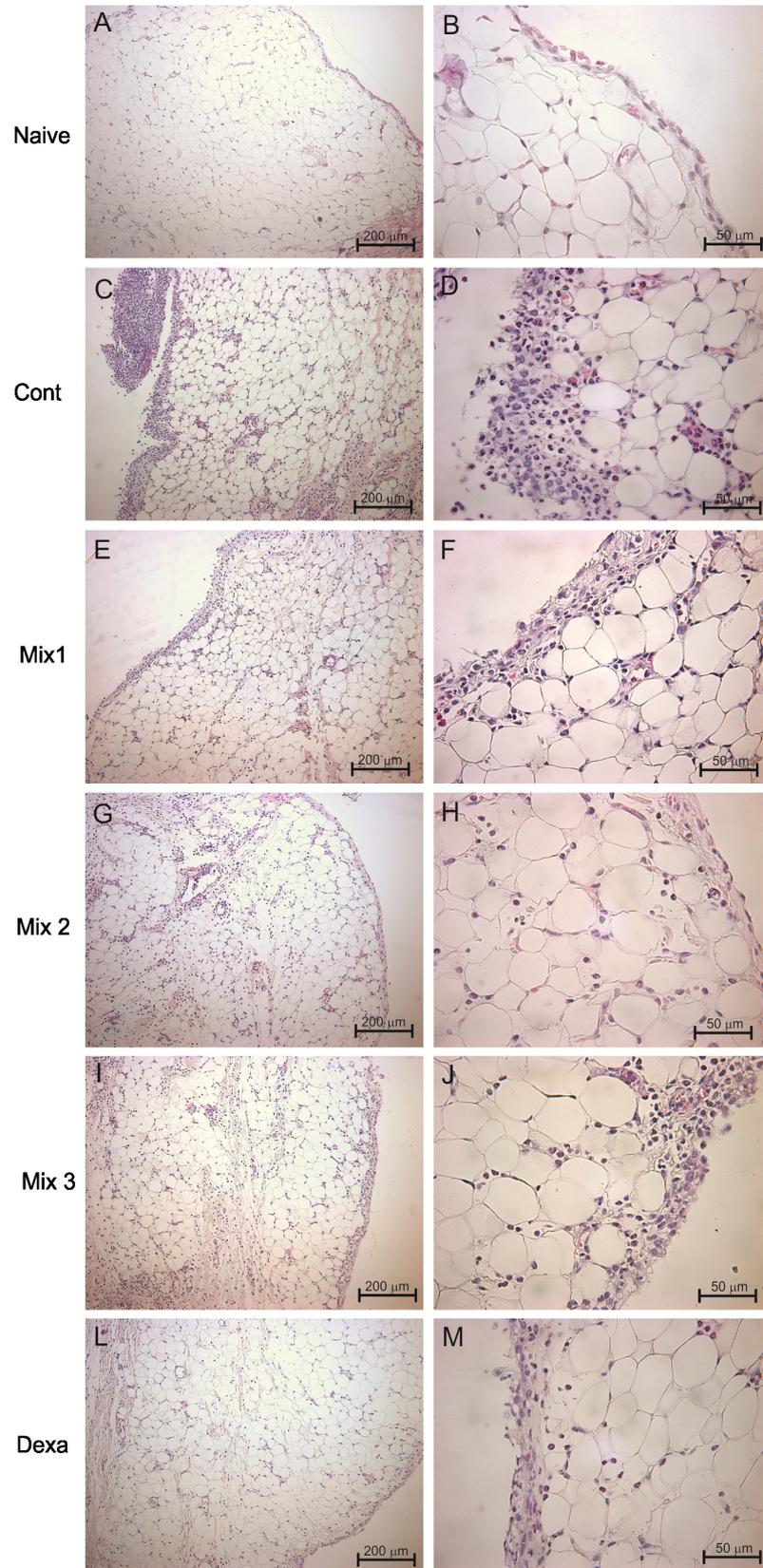
Quadro 3 - Efeito das misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre as alterações histopatológicas na artrite induzida por zymosan em joelho de ratos

Grupos/parâmetros	Infiltrado Celular	Adipócitos	Tecido Fibroso	Integridade da Cápsula	Células Gigantes
<i>Naïve</i>	0 (0 – 0)	3 (3 -3)	1 (0 – 1)	3 (2-3)	0 (0 – 0)
Controle	3 (2 – 3) #	2 (3 -3)	1,5 (1 – 2)	1 (1 – 1) ##	0 (0 – 1)
Dexa	1 (0 – 2)*	2 (3 -3)	1 (0 - 2)	2 (1 - 3)	0 (0 – 0)
MIX-1	1 (1 – 3)	2 (3 -3)	1 (1 - 2)	3 (2 – 3)*	0 (0 – 0)
MIX-2	2 (1 – 3)	2 (3 -3)	1,5 (1 – 3)	2,5 (2 – 3)*	0 (0 – 0)
MIX-3	2 (1 – 3)	3 (3 -3)	1 (0 – 1)	2 (2 – 3)	0 (0 – 0)

Fonte: A autora

Os dados representam a mediana e variação mínima e máxima de cada parâmetro \pm EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ representa diferenças significantes em relação ao grupo Controle (KRUSKAL-WALLIS test, seguido de Dunns). #($p < 0,05$) e ## ($p < 0,01$) representam diferenças significantes do grupo Controle em relação ao Grupo *Naïve*.

Figura 21 - Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre as alterações histopatológicas na artrite induzida por zymosan em joelho de rato.



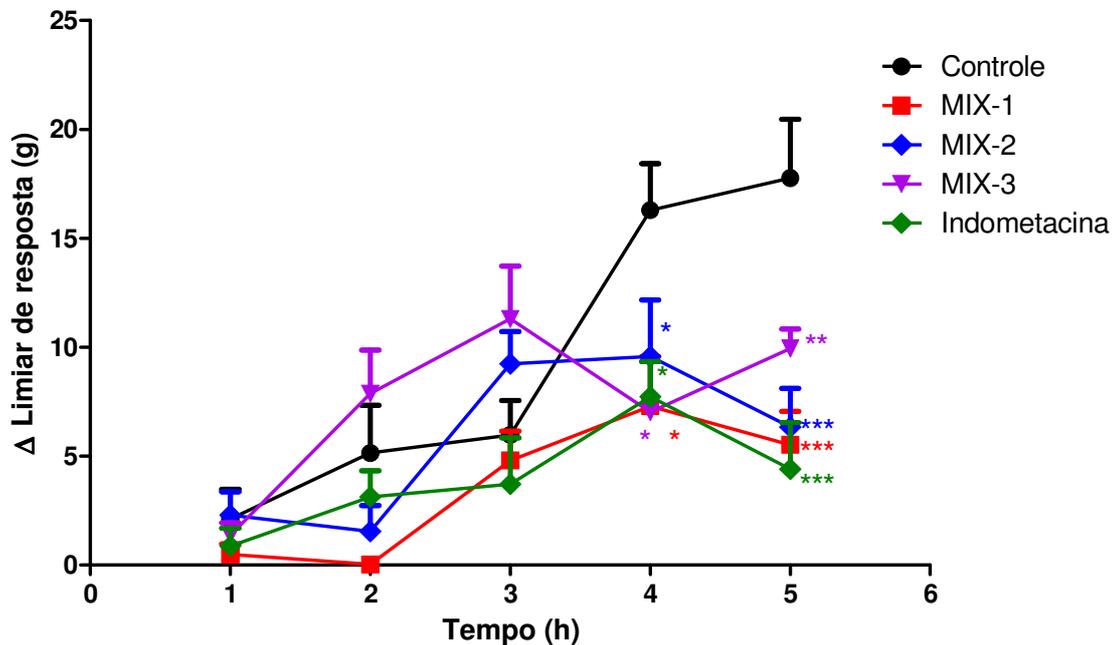
Fonte: A autora

No gráfico acima as figuras (A e B) representam grupo Naïve; (C e D) representam grupo Controle. (E e F) representam grupo tratado com dexametasona, 4mg/kg; (G e H) representam o grupo MIX-1; (I e J) representam grupo MIX-2 ; (L e M) as figuras representativas do grupo MIX-3 ; (N e O) correspondente ao grupo controle negativo o qual não recebeu o anticorpo primário durante o experimento.

4.8 Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a hipernocicepção mecânica plantar induzida por carragenina

Todos os grupos pré-condicionados com MIX-1, MIX-2 e MIX-3 (na dose de 1,2 g/Kg de peso/dia; v.o, 1 vez ao dia, durante 7 dias consecutivos antes da indução do estímulo inflamatório- pela carragenina (300µg/pata, via i.pl.) foram capazes de prevenir de forma significativa ($p<0,05$), a partir da 4ª hora, a hipernocicepção mecânica plantar, que foi mensurada através do aumento do limiar nociceptivo do animal, quando comparadas ao grupo controle. A indometacina (na dose de 10mg/kg, v.o., 45 minutos antes de induzir a reação inflamatória) inibiu de forma significativa ($p< 0,05$) a partir da 4ª hora, a hipernocicepção. Na 5ª hora, observou-se a inibição máxima da hipernocicepção dos grupos (MIX-1, MIX-2 e MIX-3) e o grupo onde foi administrada a Indometacina em relação ao controle, sendo os grupos com MIX-1 e MIX-2 semelhantes com o grupo da Indometacina ($p<0,001$). (Figura 22).

Figura 22 - Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a hipernocicepção mecânica plantar induzida por carragenina



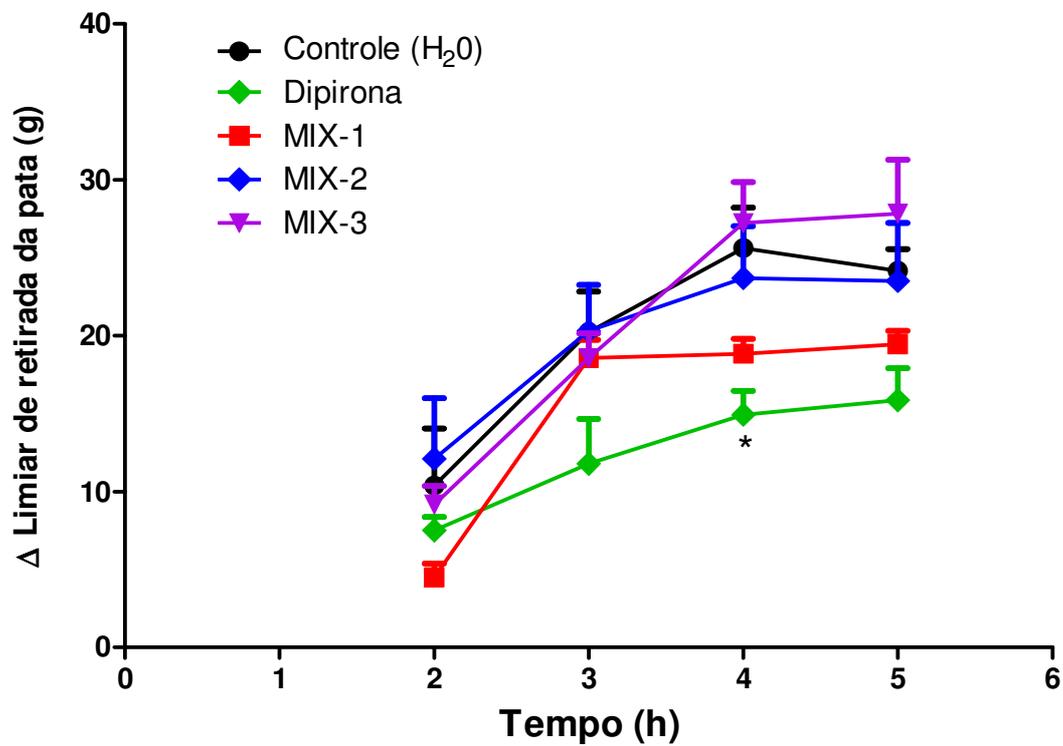
Fonte: A autora

Todos os grupos receberam injeção intraplantar de carragenina (300µg/pata). Água (Controle, 1ml/animal, v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes da carragenina). MIX-1, MIX-2 e MIX-3 (na dose de 1,2 g/Kg de peso/dia; v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes da carragenina). Indometacina (10mg/kg, v.o.; 45 min antes da carragenina). O teste nociceptivo (hipernocicepção mecânica plantar - Von-Frey Eletrônico) foi realizado a cada 1 hora até a 5ª hora. Os dados representam a média do limiar de retirada da pata em gramas (intensidade da hipernocicepção) ± EPM de 6 animais por grupo. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 relação ao grupo controle (ANOVA, seguida de Newman-Keuls).

4.9 Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a hipernocicepção mecânica plantar induzida por PGE2

Os grupos condicionados MIX-1, MIX-2 e MIX-3 (na dose de 1,2 g/Kg de peso/dia; v.o, 1 vez ao dia, durante 7 dias consecutivos antes da indução do estímulo nociceptivo - PGE2, 400ng/pata, via i.pl.) não foram capazes de prevenir a hipernocicepção mecânica plantar induzida por PGE2, ou seja, aumentar o limiar nociceptivo do animal, quando comparadas ao grupo controle em nenhum tempo (h). Apenas na 4ª hora, observou-se que o grupo tratado com dipirona (na dose de 80mg/kg, v.o., 45 minutos antes de induzir a o estímulo nociceptivo) foi capaz de inibir de forma significativa (p< 0,05) a hipernocicepção mecânica plantar quando comparadas ao grupo controle. (Figura 23).

Figura 23 - Efeito do pré-condicionamento com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre a hipernocicepção mecânica plantar induzida por PGE2



Fonte: A autora

Todos os grupos receberam a injeção intraplantar de PGE2 (400ng/ pata; via i. pl.). Água (Controle, 1ml/animal, v.o.; 1 vez ao dia, durante 7 dias antes da PGE2). MIX-1, MIX-2 e MIX-3, (na dose de 1,2 g/Kg de peso/dia; v.o., 1 vez ao dia, durante 7 dias consecutivos antes da PGE2). Dipirona (80mg/kg; v.o.; 45 min antes da PGE2). O teste nociceptivo (hipernocicepção mecânica plantar- Von- Frey Eletrônico) foi realizado a cada 1^a hora até a 5^a hora. Os dados representam a média do limiar de retirada da pata em gramas (intensidade da hipernocicepção) ± EPM de 6 animais por grupo. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 relação ao grupo controle (ANOVA, seguida de Newman-Keuls).

5 DISCUSSÃO

Os nutrientes têm sido tradicionalmente vistos como um meio de se fornecer as calorias básicas para a homeostase celular e os aminoácidos para a síntese de proteínas. Porém, pacientes vítimas de trauma, pacientes submetidos a atos cirúrgicos ou em estado grave possuem a homeostasia do organismo alterada havendo a busca constante de um estado dinâmico entre a resposta inflamatória sistêmica e a resposta anti-inflamatória compensatória, que tem por objetivo primário manutenção da homeostase e cicatrização de lesões. Exemplo deste tipo de trauma, no qual ocorre resposta sistêmica, é a AR. Segundo a OMS, as condições reumáticas são frequentemente progressivas e associadas com dor (PINTO, 2010).

Nos dias atuais, evidências sólidas apoiam o conceito de que o aporte de nutrientes com um foco específico pode melhorar os resultados finais por modular a resposta imune e/ou metabólica (BRAGA et al., 1998; BRAGA et al., 1999). Dessa maneira, uma possível opção de tratamento adjuvante da artrite pode vir a ser a utilização dos nutracêuticos ou fármacôn timerentes. Estes estão sendo aproveitados como modificadores da resposta biológica exercendo ações antioxidantes (AG ω -9), ações anti-inflamatórias (AG ω -3) e ações pró-inflamatórias (AG ω -6). Para que haja uma função anti-oxidante, a relação entre ω -9 e ω -6 deve ser maior que 1 (ω -9/ ω -6 > 1) e para haver uma função anti-inflamatória a relação entre ω -6 e ω -3 deve ser menor que 4 (ω -6 / ω -3 < 4) (VASCONCELOS, 2013).

Por esse motivo, o estudo em torno desses nutrientes é crescente, tendo em vista os inúmeros relatos dos seus benefícios quando incluídos na dieta para proporcionar um pré-condicionamento (NAKAMURA et al., 2005). Desse modo, para que haja o pré-condicionamento é necessário que um organismo seja exposto propositalmente a um estímulo, seja este nocivo ou não, com o objetivo de alcançar o estabelecimento de maior tolerância ou proteção contra uma situação adversa subsequente (PINHEIRO, 2011).

Relatos na literatura vêm sugerindo dois tipos de pré-condicionamento: o pré-condicionamento isquêmico (nocivo) e o nutracêutico (não nocivo). Exemplos comuns de pré-condicionamento são: a vacinação e a prática de atividade física (PINHEIRO, 2011). A importância do pré-condicionamento nutracêutico foi descrito em alguns trabalhos, como no estudo de Abdukeyum, Owen e McLennan (2008) com o uso de ácidos graxos ômega-3, no qual os autores demonstraram limitação da lesão cardíaca isquêmica e infarto do miocárdio em coração de rato, de forma semelhante ao pré-condicionamento isquêmico (estímulo nocivo). Já no estudo de Coelho et al. (2011), o pré-condicionamento com ácidos graxos ômega-3 minimizou a isquemia e reperfusão hepática em modelo experimental em rato.

McGuinness et al. (2006) demonstraram que os ácidos graxos ômega-3 utilizados protegeram o miocárdio diminuindo o tamanho do infarto por dois possíveis mecanismos: elevação da regulação de HSP-72 e aumento da presença de ômega 3 nas membranas miocárdicas.

Devido aos benefícios do pré-condicionamento nutracêutico, um atual tipo de pré-condicionamento, que vem ganhando destaque, utiliza uma mistura de óleos ômega 3, 6 e 9. Este tipo de suplementação vem evidenciando a importância desses nutrientes a partir de alguns estudos reportados, como no trabalho de Pinheiro et al., em 2011, no qual os autores verificaram que tais misturas de óleos protegeram os neurônios cerebrais da lesão de isquemia e reperfusão em ratos e no estudo de Vasconcelos, em 2013, que demonstrou redução das características da inflamação crônica na periodontite experimental.

O presente estudo mostra pela primeira vez, à luz da literatura consultada, o efeito, por via oral, do uso de misturas de ácidos graxos ω -3, 6 e 9, ofertadas durante sete dias consecutivos antes do estabelecimento do processo inflamatório (pré-condicionamento) em modelo de artrite aguda experimental induzida por zymosan em ratos. Neste trabalho foram executados inúmeros experimentos para verificar os efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos das misturas de óleos (MIX-1, MIX-2 e MIX-3) no modelo de artrite induzida por zymosan em ratos. Os testes empregados para examinar os efeitos antinociceptivos das misturas foram: Incapacitação Articular pela indução de artrite pelo zymosan e os testes de hipernocicepção mecânica plantar induzida pela carragenina e PGE2.

Esse protocolo de doses diárias consecutivas (pré-condicionamento) foi sugerido por Saraiva (2009) tendo em vista que as doses orais únicas não inibiram o edema de pata induzido por carragenina. O primeiro teste realizado neste atual trabalho foi o teste da incapacitação articular no joelho de ratos para avaliar o efeito antinociceptivo dos MIX-1, MIX-2 e MIX-3. Este teste foi executado com objetivo de estudar a incapacidade do animal de deambular normalmente, quando induzimos a artrite experimentalmente. Pode ser mensurada através do tempo de suspensão de pata (TPS) e considera-se o pico da incapacitação o período equivalente entre a 3^a e 4^a hora (TONUSSI; FERREIRA, 1992). Quando foi realizado o pré-condicionamento com os MIX-1, MIX-2 e MIX-3 se verificou que o tempo de suspensão da pata foi inibido por todos os MIX (1, 2 e 3) e pela Dexametasona, durante a 3^a hora, quando comparado ao grupo Controle. Logo, podemos concluir que, durante o pico da incapacitação articular (3^a hora), os grupos condicionados com as misturas de óleos e o grupo da Dexametasona tiveram diferenças significantes na reversão da incapacitação articular comprovando seus efeitos antinociceptivos. Neste teste, o MIX-2 proveniente de óleo de peixe obteve o melhor resultado sendo análogo ao da Dexametasona,

que é um potente glicocorticóide com ação anti-inflamatória e imunossupressora. Os resultados deste experimento estão de acordo com o do trabalho de Oliveira (2013), que realizou esse mesmo teste utilizando o pré-condicionamento com OPCC alcançando inibição da incapacitação articular em todos os grupos tratados com diferentes doses do OPCC.

O modelo de artrite induzida por zymosan em joelho de ratos é um modelo que induz a sinovite grave local, envolvendo uma cascata de eventos celulares organizadas e cronológicas. Caracteriza-se pelo aumento da permeabilidade, formação de edema, infiltração de células mononucleares e produção de eicosanóides (ROCHA et al.,1999). Durante o processo inflamatório, estudos revelaram que os neutrófilos têm função crucial na hiperalgesia inflamatória como demonstrado no trabalho de Cunha et al. (2008). Pode-se insinuar, então, que a utilização de drogas que bloqueiam a migração de neutrófilos para o foco inflamatório provavelmente seria uma alternativa para o controle da dor, visto que tais células, também, são potencialmente capazes de modificar o processo fundamental de certas doenças inflamatórias induzindo à lesão dos tecidos (FERREIRA et al., 2009). Em 2003, Cunha et al. comprovaram durante seus estudos que drogas que conseguem inibir a síntese ou que antagonizam os receptores de leucotrieno B4 (LTB4) previnem o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória com características de imunidade adaptativa (modelos de artrite), além de inibirem efetivamente a migração de neutrófilos. Sabe-se que o LTB4 é um dos mediadores responsáveis pela migração de neutrófilos para o foco inflamatório. A importância da presença dos neutrófilos na resposta inflamatória inata intensa ou na que acompanha as respostas adaptativas (por exemplo, artrite) mostra a necessidade do desenvolvimento de drogas de ação imediata de curta duração (para não bloquear totalmente a defesa imunológica inata) para o controle dos sintomas e das lesões de várias doenças crônicas de origem imune (FERREIRA et al., 2009).

No presente estudo, o pré-condicionamento com misturas ômega 3, 6 e 9 foi alcançado, com êxito, a inibição da migração total de leucócitos e diferencial, em especial os neutrófilos, como também foi capaz de reduzir a atividade de mieloperoxidase no sítio da lesão. Presume-se que, em condições inflamatórias, o aumento do influxo de leucócitos (neutrófilos) pode determinar o aumento da atividade de mieloperoxidase podendo ser considerado um marcador indireto da infiltração neutrofílica local (BRADLEY et al., 1982). E, dessa maneira, isso pôde ser evidenciado no atual estudo pela inibição da MPO nos grupos condicionados (MIX-1, MIX-2 e MIX-3). Logo, como ocorreu uma inibição da migração de neutrófilos, acredita-se que, posteriormente, sucedeu o bloqueio da atividade de MPO. Os resultados da migração e da atividade de MPO do pré-condicionamento com MIX-1, MIX-2 e

MIX-3 tiveram diferenças estatísticas em relação ao grupo Controle e resultados semelhantes à Dexametasona. Os glicocorticóides (Dexametasona) agem por diferentes mecanismos de ação e, dentre eles, a inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-1 β e, também, através da inibição da degranulação mastocitária. Esta proteção é de grande importância no tratamento de diversos processos inflamatórios, incluindo os artríticos (BAUGHMAN et al., 2003).

Com isso, foram comprovados com esses experimentos os efeitos anti-inflamatórios dos MIX. Esses dados estão a favor dos encontrados por Oliveira (2013), no qual realizou a administração com diferentes doses diárias do OPCC antes de induzir a artrite por zymosan e conseguiu perceber a inibição de infiltração de leucócitos, bem como a redução da atividade de MPO. Desde 1992, Magaro et al. mostraram a importância da dieta rica em óleo de peixe na redução progressiva da quimiluminescência dos neutrófilos em modelo de artrite induzida por zymosan. O exposto acima também pode ser confirmado pelo trabalho de Nakamura et al., no qual relata que a suplementação pré-operatória com ácidos graxos ômega 3, em pacientes submetidos a cirurgia para câncer, conseguiu minimizar a inflamação e diminuir a migração de neutrófilos. Porém, no estudo de Vasconcelos (2013) que utilizou o mesmo pré-condicionamento deste presente trabalho, com mistura de óleos (MIX-1, MIX-2 e MIX-3) em modelo de inflamação crônica na doença periodontal em ratos, os óleos não foram capazes de inibir a migração de leucócitos e, conseqüentemente, de prevenir o aumento da atividade da enzima mieloperoxidase. Yang et al (2010) comprovaram que uma dieta alimentar com óleo de peixe em um modelo de choque hemorrágico em roedores foi capaz de diminuir o edema de pulmão.

Outro atributo negativo da inflamação originada pela administração de zymosan na articulação é a formação de edema (ROCHA et al.,1999). A gênese do edema começa com o aumento de permeabilidade local que acontece nos microvasos durante a inflamação. Estes eventos são iniciados e mantidos através da liberação sequencial de mediadores inflamatórios, originados no plasma ou em células (MORAIS, 2008). Os elementos do presente estudo demonstraram que a injeção intra-articular de zymosan (1mg), induziu uma inflamação característica, com hipernocicepção, edema e aumento da permeabilidade vascular, corroborando com os dados da literatura (ROCHA et al., 2003; KANASHIRO et al., 2009).

Constatou-se que o pré-condicionamento com a mistura de óleos (MIX-1, MIX-2 e MIX-3), assim como a dexametasona foram capazes de prevenir o edema articular, não alterando o diâmetro do joelho direito onde tinha sido induzida a artrite por zymosan quando comparados com o grupo controle no qual o diâmetro do joelho direito aumentou,

consideravelmente, ao ser induzida a artrite. Esse resultado foi verificado, com diferenças significantes, durante a 4ª hora, porém na 5ª hora, apenas a dexametasona alcançou o efeito desejado. Sugerindo, que os óleos podem indicar uma ação antiedematogênica, tendo em vista que a 4ª hora após a lesão é considerada a hora onde ocorre o maior extravasamento de fluido rico em proteínas para o líquido sinovial. O pré-condicionamento diário com o MIX-1, MIX-2 e MIX-3 também foi capaz de reduzir a permeabilidade vascular, obtendo similaridade com a dexametasona. Os resultados do atual estudo sugerem que a ação dos óleos se explica, primeiramente, na inibição da permeabilidade vascular e, por conseguinte, dificultando a formação de edema evitando os efeitos deletérios da artrite. Os dados encontrados neste estudo estão de acordo com os resultados encontrados por Oliveira (2013), onde o pesquisador, usando várias doses diárias de óleos OPCC, demonstrou relevante efeito antiedematogênico dos óleos, capazes de prevenir o edema e permeabilidade vascular na artrite induzida por zymosan.

Outros marcadores que merecem destaque na inflamação são o NF- κ B e o iNOS. A presença destes no tecido sinovial é indicativa de resposta inflamatória que ocorreram ou estão em curso. O NF- κ B é considerado o fator de transcrição gênica pró-inflamatório mais potente, já que este se liga a genes específicos no núcleo controlando a produção de citocinas pró-inflamatórias, COX-2, a enzima iNOS, quimiocinas e outros genes importantes (GLEZER et al., 2000). Logo, substâncias ou drogas que conseguem inibir ou prevenir a translocação do NF- κ B para o núcleo são consideradas anti-inflamatórias. Nos estudos imunohistoquímicos do presente trabalho foram feitas a marcação NF- κ B, no tecido sinovial, tanto nos grupos (controle e teste) onde foi induzida a artrite por zymosan, como também no grupo *Naïve* (joelho contraposto ao do grupo controle, saudável e sem artrite). Os resultados deste presente trabalho mostraram que as membranas sinoviais de animais do grupo *Naïve* apresentaram estrutura normal, com pouca presença de infiltrado celular com uma leve imunoposição de NF- κ B. Enquanto no grupo Controle, percebeu-se um exuberante aspecto de infiltrado inflamatório acompanhado de superexpressão de NF- κ B. O oposto ao grupo Controle foi encontrado nos grupos (MIX-1, MIX-2 MIX-3) e no grupo da dexametasona, uma vez que, esses grupos tiveram resultados similares, evidenciando diminuição do infiltrado inflamatório como a redução da imunomarcação de NF- κ B. No experimento exposto, foi demonstrada a inibição da expressão de NF- κ B evidenciando seu efeito anti-inflamatório. Vasconcelos (2013) utilizou os mesmo óleos e realizou a imunomarcação para o NF- κ B e conseguiu observar que, apenas, o MIX-1, proveniente da linhaça, foi capaz de reduzir a marcação desse imunomarcador na gengiva dos ratos submetidos à DPE.

Além disso, foi realizada novamente nesse presente trabalho outra imunomarcacão com a isoforma induzida (iNOS), no tecido sinovial, tanto nos grupos (controle e teste) onde foi induzida a artrite por zymosan, como também no grupo *Naïve* (joelho contraposto ao do grupo controle, saudável e sem artrite). A enzima iNOS é responsável pela produçã de NO, logo o bloqueio desta enzima iNOS resulta em proteçã dos tecidos sinoviais evidenciando a participaçã do NO na fisiopatologia dessa doençã (MONCADA et al.,1991). No presente estudo, os resultados imunohistoquímicos para a marcaçã de iNOS revelaram dados idênticos aos apresentados na marcaçã de NF-κB. Corroborando, mais uma vez, para o efeito anti-inflamatório dos MIX-1, MIX-2 e MIX-3 similares ao da dexametasona, um potente corticosteróide. Porém, Vaconcelos (2013) utilizou também a imunomarcacão para iNOS e observou que, apenas, o MIX-1, proveniente da linhaça, foi capaz de restringir a marcaçã desse imunomarcador na gengiva dos ratos submetidos à DPE. Fouad et al.(1998) já haviam mostrado que o NF-κB é apontado como o fator transcricional mais relevante na regulaçã da expressã de de iNOS em determinadas situações. Logo, a menor expressã de iNOS, observada nos tecidos sinoviais, pode estar relacionada à menor ativaçã de NF-κB onde foi comprovado no atual estudo. Já no trabalho de Ren e Chung (2007), o ácido α-linolênico conseguiu ter um efeito anti-inflamatório, uma vez que diminui a produçã das expressões inflamatórias de iNOS, COX-2 e TNF-α através do bloqueio de NF-κB. Yang et al (2010) comprovaram que uma dieta pré-alimentar com óleo de peixe, em um modelo de choque hemorrágico em roedores, conseguiu reduzir a expressã do mRNA de iNOS no fígado e diminuiu edema de pulmão. Além disso, Baek e Park (2013), fizeram um estudo comprovando que a suplementaçã com ácido graxos ômega 3 conseguem atenuar a concentraçã de Inos em pacientes com ou sem depressã.

Os achados histopatológicos do presente trabalho reforçam os achados macroscópicos, uma vez que os MIX-1 e MIX-2 impediram a degradaçã da cápsula articular, permitindo a integridade e anatomia sadia preservada, obtendo diferenças significantes ($p < 0,05$) em relaçã ao grupo Controle. No parâmetro Infiltrado celular (Quadro 3), nos escores obtidos, chegou-se à conclusã que apenas a dexametasona alcançou o resultado desejado ao comparar com o grupo controle. Porém, na análise das lâminas histopatológicas verificou-se que não há muita diferença entre os grupos pré-condicionados e a dexametasona. Em relaçã aos outros escores histológicos, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos Controle (com artrite) e *Naïve* (sem artrite), permanecendo inalterados. Nesse experimento, foi detectado o significativo efeito protetor dos MIX-1 e MIX-2, provenientes da linhaça e do peixe, ao evitar a perda da integridade da cápsula. Vasconcelos (2013) fez estudos histopatológicos com os

mesmos óleos (MIX-1, MIX-2 e MIX-3) na doença periodontal experimental e percebeu que apenas o MIX-1, proveniente da linhaça, reduziu de forma estatisticamente significativa as alterações histopatológicas preservando o processo alveolar e cemento das maxilas submetidas à DPE.

Logo, a suplementação com linhaça (MIX-1) e peixes (MIX-2), em adultos, parece ser benéfica à estrutura da cápsula articular que está bastante comprometida nas artropatias, em especial a artrites. Zhao et al. (2007) descreveram que o efeito protetor do MIX-1 pode estar associado à diminuição na liberação de TNF- α , como consequência da suplementação diária com ALA (MIX-1). Reduzindo os efeitos sistêmicos do TNF- α tanto em humanos quanto em animais (CAUGHEY et al., 1996). Outra importante qualidade dessa dieta rica em ácidos graxos ômega-3 provenientes da linhaça, se deve ao fato, de diminuírem a liberação de PGE2 (IWASAKI et al., 2011) que são mediadores finais importantes na hipernocicepção inflamatória (VERRI et al., 2006).

Por meio da aplicação do modelo de artrite induzida por zymosan, foi ratificado que a incapacitação articular causada nesse modelo está associado à ativação de nociceptores situados em estruturas periarticulares e não na sinóvia. Foi demonstrado ainda, que o desenvolvimento da incapacitação articular (hipernocicepção) se associou diretamente com a migração de neutrófilos para a cavidade articular (ROCHA et al., 1999). Logo, para que o mecanismo da hipernocicepção fosse, totalmente, esclarecido foi executado os seguintes testes: teste de hipernocicepção mecânica plantar induzida por carragenina e teste de hipernocicepção induzida PGE2 (mediador de ação direta).

Os trabalhos de Cunha et al. (1992) e Zarpelon et al. (2013) mostraram que a inibição da migração de células polimornucleares leva, por conseguinte, a inibição da sequência de liberação de mediadores da hipernocicepção inflamatória iniciados pelo TNF- α , responsáveis pela liberação de IL-1 β e quimiocinas. Por sua vez, essa inibição de células polimorfonucleares leva a diminuição da liberação direta de mediadores, como prostaglandinas (PGE2), que atuam diretamente no nociceptor, ou seja, sendo elementos importantes para a produção de hipernocicepção (CUNHA *et al.*, 1992; ZARPELON *et al.*, 2013). Eicosanóides (prostaglandinas e prostaciclina) e TNF- α estão envolvidos na gênese da hipernocicepção articular do joelho (TONUSSI; FERREIRA, 1992; ROCHA *et al.*, 1999). Os dados do presente trabalho sugerem uma ação antinociceptiva dos MIX-1, MIX-2 e MIX-3 apenas para o teste da hipernocicepção mecânica plantar por meio da carragenina. Isto se explica porque quando induzimos a hipernocicepção com a carragenina intraplantar na pata direita, este é um estímulo semelhante ao zymosan, que irá induzir a cascata do processo inflamatório desde o

início, ou seja, desde o recrutamento de neutrófilos até a liberação de mediadores iniciais e mediadores finais e conduzir a hiperalgesia inflamatória. Em 1992, Cunha e colaboradores demonstraram que a injeção intraplantar de carragenina (estímulo inflamatório exógeno) em ratos induz a liberação dessa cascata de citocinas inicializada pelo TNF- α . A indução da liberação de IL-8 por TNF- α leva à hiperalgesia mediada por simpatomiméticos e a indução de IL-1 β e IL-6 por TNF- α leva à hiperalgesia mediada por produtos da ciclooxigenase. Logo, na atual pesquisa, já tinha sido verificado que o pré-condicionamento com os MIX (1, 2 e 3) inibiu a migração de neutrófilos para o local da lesão no modelo de artrite induzido por zymosan, conseqüentemente, e impediu a produção de mediadores intermediários (IL-1, TNF- α) e finais PGE₂, reduzindo a hipernocicepção inflamatória conseguindo efeitos desejáveis semelhante a dexametasona. Com isso, foi verificado com esse teste da hipernocicepção plantar induzida por carragenina que o pré-condicionamento com óleos MIX-1, MIX-2 e MIX-3 inibiu a hipernocicepção semelhante à Indometacina, fármaco anti-inflamatório, corroborando, mais uma vez, e elucidando o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo dos mixes quando usados antes do processo inflamatório que se inicia desde o início da cascata inflamatória. Os resultados deste presente trabalho estão de acordo dos encontrados por Oliveira (2013), no qual o pré-condicionamento com o OPCC antes da indução do estímulo inflamatório pela carragenina foi capaz de prevenir a hipernocicepção mecânica plantar semelhante à Indometacina, fármaco também usado para este teste.

No segundo teste, no qual foi induzida a hipernocicepção mecânica plantar através da PGE₂. Os mediadores finais (PGE₂) agem diretamente no nociceptor ativando receptores presentes na membrana neuronal (CUNHA et al., 1992). Prostaglandinas e aminas simpatomiméticas são exemplos de mediadores finais que, através de seus receptores, ativam a sinalização intracelular como a via do AMPc e das proteínas quinases PKC e PKA (figura 1), os quais por sua vez promovem os mecanismos de sensibilização periférica. A ativação das PKC e PKA induzem a fosforilação de canais iônicos voltagem-dependentes na membrana neuronal. Isso leva a uma alteração no potencial de repouso uma diminuição do limiar de ativação neuronal (figura 1). Os resultados desse teste no atual estudo não foram satisfatórios, demonstrando, com isso, que o pré-condicionamento com os óleos (MIX-1, MIX-2 e MIX-3) não conseguem bloquear os efeitos da PGE₂ e apenas a Dipirona, na 4^a hora, conseguiu bloquear a hipernocicepção plantar em curso induzida pela PGE₂. Demonstrando que quando administrada periféricamente, a Dipirona é capaz de bloquear diretamente a hiperalgesia induzida por PGE₂, da mesma forma que os opióides periféricos.

Logo, a hipernocicepção induzida por PGE2 é independente da produção de outros mediadores inflamatórios ou o recrutamento de células, tais como neutrófilos (CUNHA et al., 2008b,c). Para que o bloqueio indireto da hipernocicepção induzida em curso por PGE2 possa ser alcançada, faz-se a utilização de analgésicos periféricos, como a dipirona, diclofenaco e outras substâncias (DUARTE et al., 1992).

Perante aos resultados estatisticamente significantes expostos, no presente estudo, a importância do pré-condicionamento nutracêutico, com misturas de óleos (MIX-1, MIX-2 e MIX-3) foi constatada. Todas as três misturas de óleos contendo elevada relação entre ácidos graxos ômega-9/ ômega-6 e baixa relação entre ácidos graxos ômega-6/ ômega-3 exerceram, com êxito, efeitos anti-inflamatórios e, indireto, efeito antinociceptivo. Magaro et al. (1992) justificaram a ação anti-inflamatória dos ácidos derivados de óleo de peixe é , provavelmente, devido a uma alteração que ocorre na composição lipídica da membrana celular dependente da esterificação de ácido eicosapentaenóico e docosaheptaenóico em fosfolípidios da membrana celular. Com isso, essa modificação da composição lipídica da membrana parece ter efeitos benéficos sobre a fluidez, estrutura e a função das mesmas. Sem falar, que os eicosanóides provenientes dos ácidos ômega-3 são menos potentes do que aqueles liberados por ácidos ômega-6, além daqueles atenuarem o processo inflamatório, causando a vasodilatação prevenindo a formação de coágulos ajudando o processo anti-inflamatório.

Essa pesquisa atual, comprovou a eficácia do pré-condicionamento realizado durante 7 dias antes da indução do trauma. Em relação ao tempo de pré-condicionamento, estes resultados vêm ao encontro daqueles reportados por Martindale, Mcclave e Mccarthy em 2013, em que fizeram alguns estudos mostrando efeitos benéficos da suplementação de substâncias como arginina, ácidos graxos essenciais e ácidos nucléicos em período de 5 a 7 dias antes do ato cirúrgico, provocando diminuição de 30 a 50% nas taxas de complicações posteriores.

Relatos de outros autores, somados aos achados no presente estudo, a respeito do uso pré-condicionante de ácidos graxos, revelaram ter estes nutrientes princípios ativos anti-inflamatórios, podendo potencialmente ser utilizados em inúmeras doenças ou condições inflamatórias agudas. O fato destes óleos terem sido efetivos como pré-condicionantes, experimentalmente, abre novas oportunidades futuras de seu uso clínico ante a lesões inflamatórias agudas, tais como no trauma cirúrgico. Mais estudos são necessários a fim de validarem os presentes resultados, incluindo pesquisas para elucidação dos mecanismos anti-inflamatórios envolvidos, e, no uso de misturas de óleos com ácidos graxos ômega-9, seus potenciais efeitos antioxidantes.

6 CONCLUSÃO

1. O pré-condicionamento nutracêutico com misturas de óleos ômega-3, 6 e 9, contendo elevada relação entre ácidos graxos ômega-9/ômega-6 e baixa relação ômega-6/ômega-3, com fontes diversas de ômega-3, tem efeito anti-inflamatório sobre o modelo de artrite induzida por zymosan em ratos.
2. Os óleos pré-condicionantes ômega-3, 6 e 9 conseguem reverter a incapacidade articular na 3^a hora, inibem a migração de leucócitos para o local da lesão, provocam uma significativa diminuição do edema, preservam a integridade da cápsula articular e promovem a redução de NF- κ B e de iNOS em modelo de artrite induzida por zymosan.
3. O pré-condicionamento com a mistura de óleos impede a hipernocicepção mecânica plantar evocada por carragenina, entretanto, não previne a hipernocicepção inflamatória evocada por PGE₂, evidenciando que seus efeitos antinociceptivos são indiretos e decorrentes dos seus efeitos anti-inflamatórios.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imun Celul & Mol.** 5.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2005.
- ABDUKEYUM, G.G.; OWEN, A.J.; MCLENNAN, P.L. Dietary (n-3) long-chain polyunsaturated fatty acids inhibit ischemia and reperfusion arrhythmias and infarction in rat heart not enhanced by ischemic preconditioning. **J Nutr.**, v. 138, n.10, p. 1902-1909, Oct. 2008.
- ALAMANOS, Y; VOULGARI, P.V; DROSOS, A.A. Incidence and prevalence os rheumatoid arthrtis based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. **Semin Arthrit Rheum.**, v. 36, n. 3, p. 182-888, Dec. 2006.
- ALEY, K. O.; LEVINE, J. D. Role of Protein Kinase A in the Maintenance of Inflammatory Pain. **The J of Neurosc.**, v. 19, n. 6, p. 2181-2186, Mar. 1999.
- ALEXANDER, J. W. Immunonutrition: The Role of ω - 3 Fatty Acids. **Nutrit.**, v. 14, p. 627-633, 1998.
- ALLAYEE, H.; ROTH, N.; HODIS, H.N. Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular disease: implications for nutrigenetics. **J Nutrig Nutrigeno.**, v.2, p.140-148, 2009.
- ALVES, W.F.; AGUIAR, E.E.; GUIMARÃES, S.B.; SILVA FILHO, A.R.; PINHEIRO, P.M.; DIAS SOARES, G.S.; VASCONCELOS, P.R.L. L-alanyl-glutamine preoperative infusion in patients wits critical limb ischemia subjected to distal revascularization reduces tissue damage and protects from oxidative stress. **Ann Vasc Surg.**, v.24, n.4, p. 461-467, May. 2010.
- ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. **Food Research Internat.**, v. 35, p. 171-176, 2002.
- ARAÚJO, A.L. **Mecanismos e mediadores envolvidos no efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico.** 2012. Tese (Doutorado em Fisiopatología celular y molecular y susimplicaciones farmacológicas) - Universidad de Salamanca, Salamanca, 2012.
- ARAÚJO JÚNIOR, R.J.C.; SILVA JÚNIOR, R.G.; VASCONCELOS, M.P.O.; GUIMARÃES, S.B.; VASCONCELOS, P.R.L.; GARCIA, J.H.P. Pré-condicionamento com L -alanil-glutamina reduz a lesão de isquemia-reperusão no fígado de ratos. **Acta Cir. Bras.**, v.26, n. 1, p. 8-13, 2011. Suplemento.
- ATHANASAKIS, K.; PETRAKIS, I.; KYRIOPOULOS, J. Investigating the value of abatacept in the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review of cost-effectiveness studies. **ISRN Rheumatol.** 2013.
- AZEVEDO, R. B.; SILVA, L. P; LEMOS, A.P.C; LACAVA, Z. G.M. Controle da Resposta Inflamatória por Ácidos Graxos. In: CURI, Rui et al. (Orgs.). **Entend a gord. Os ác grax.** p. 379-392. São Paulo: Manole, 2002.

BABAYAN, W.K. Medium chain triglycerides and structured lipides. **Lipid.**, v.22, n.6, p.421-423, 1987.

BAEK, D.; PARK, Y. Association between erythrocyte n-3 polyunsaturated fatty acids and biomarkers of inflammation and oxidative stress in patients with and without depression.

Prostag Leukot Essent Fat Acids, v. 89, n. 5, p. 291-296, Oct. 2013.

BARBOSA, K. B.; VOLP, A. C.; RENHE, I. R.; STRINGHETA, P. C. Omega-3 and 6 fatty acids and implications on human health. **Rev Soc Bras Alim Nutr.**, n. 32, p. 129-145, 2007.

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

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell.**, v.139, n.2, p.267-284, 2009.

BASTOS, L.C. **Indução de hiperpatia por injeção intraplantar de PGE2: Estudo farmacológico de um novo parâmetro da hiperalgesia térmica.** 2009. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

BHUIYAN, M.I.H.; KIM, Y.J. Mechanisms and prospects of ischemic tolerance induced by cerebral preconditioning. **Int. Neurolo. J.**, v.14, n.4, p. 203-212, 2010.

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

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

BRAGA, M.; GIANOTTI, L.; VIGNALI, A.; DI CARLO, V. Immunonutrition in gastric cancer surgical patients. **Nutrit.**, v.14, n.11-12, p.831-835,1998.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia.** 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

BRAUN, J.; SIEPER J. Therapy of ankylosing spondylitis and other spondyloarthritides: established medical treatment, anti-TNF-alpha therapy and other novel approaches. **Arthrit Res.**, v. 4, n.5, p. 307-21, 2002.

BRESSAN, E. **Comparação do efeito de fármacos antiartríticos e anticorpos anti-citocinas na artrite reativa ao LPS em ratos.** 2005. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

BUCKWALTER, J.A; MARTIN,J; MANKIN, H.J. Synovial joint degeneration and syndrome of osteoarthritis. **Instr Cour Lect.**, v. 49, p. 481-489, 2000.

CALDER, P.C; GRIMBLE, R. F. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. **Euro J Clin Nutr.**, v.56, n. 3, p. 14-19, 2002.

CALDER, P.C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Braz J Med Biol Res.**, v.36, n.4, p.433-446, 2003.

_____. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **Am J Clin Nutri.**, v.83, p.150S-19S, 2006. Suplemento.

CAMARGO, L.L. **Caracterização farmacológica do papel da hemopressina e das fibras C no modelo de artrite induzida por antígeno em ratos.** 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CAMPELO, A.P.B.S. **Óleos ômega 9, 6 e 3 em pele de ratos submetidos a queimadura térmica.** 2007. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

CARVALHO, P.R.A.; TROTTA, E.A. Avanços no diagnóstico e tratamento de sepse. **J de Pediat.**, v. 79, n. 2, p.195-204, 2003.

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

CAVALCANTE, K.P. **Pré-condicionamento nutracêutico utilizando arginina e com elevada relação ômega 9:** ômega 6 e baixa relação ômega 6:ômega 3, sobre o estresse oxidativo e lipidograma em pacientes submetidos à prostatectomia radical. 2013. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Rheumatoid Arthritis.** Disponível em :<www.cdc.gov/arthritis/basics/rheumatoid.htm> . Acesso em : 28 mar.2014

CHATHAM, W.W.; SWAIM, R.; FROHSIN, H. J.; HECK, L.W.; MILLER, E.J.; ACKBURN, W.D. Degradation of human articular cartilage by neutrophils in synovial fluid. **Arthrit and Rheumat.**, v.36, p. 51-58, 1993.

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

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

CHIKANZA, I.C.; KINGSLEY, G.; PANAYI,G.S. Peripheral blood and synovial fluid monocyte expression of interleukin 1(alpha) and 1 (beta) during active rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, v.22, p. 600-606, 1995.

COELHO, A.M.; MACHADO, M.C.; TAKAHASHI,H.K.; SAMPIETRE, S.N.; STEFANO, J.T.; LEITE, A.Z.; CURI, R.; D'ALBUQUERQUE, L.A. Ischemic preconditioning-like effect of polyunsaturated fatty acid-rich diet on hepatic ischemia/reperfusion injury. **J. Gastrointest Surg.**, v. 15, n. 10, p. 1679-1688, Oct. 2011.

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

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

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

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

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

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

CUNHA FILHO, J.F.; GONÇALVES, I.I.; GUIMARÃES, S.B.; JAMACARU, F.V.F.; GARCIA, J.H.P.; VASCONCELOS, P.R.L. Pré-tratamento com L-alanil-glutamina atenua a resposta inflamatória aguda em crianças submetidas à palatoplastia. **Acta Cir. Bras.** v.26, n. 1, p.72-76, 2011. Suplemento.

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

DAHELE, M.; FEARON, C. H. K. Imunomodulação lipídica e câncer. In: WAITZBERG, Dan L. **Diet, nut e cânc.**, p.679-688. São Paulo: Atheneu, 2006.

DENG, G.M.; NILSSON, I.M.; VERDRENGH, M.; COLLINS, LV.; TARKOWSKI, A.: Intra-articular localized bacterial DNA containing CpG motifs induced arthritis. **Nat. Med.**, v.5, p. 702-705, 1999.

DENG, G.M.; LEONARDO, M. The role of immune cells and cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Drug Discov Tod.**, v. 3, n.2, p.163-168, 2006.

DE VITA, S. et al. Efficacy of selective B cells blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence for a pathogenetic role of B cells. **Arthritis Rheum.**, v.46, p.2029-2033, 2002.

DOAN, T; MASSAROTTI, E. Rheumatoid arthritis: an overview of new and emerging therapies. **J Clin Pharmacol.**, v. 45, n. 7, p. 751-62, 2005.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, v.75, p.125-131, 1995.

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

- EVANS, A. R.; VASKO, M. R.; NICOL, G. D. The cAMP transduction cascade mediates the PGE2-induced inhibition of potassium currents in rat sensory neurones. **J Physiol.**, v. 516, n. 1, p. 163-178, abr. 1999.
- FAN, P.T, LEONG, K.H. The use of biological agents in the treatment of rheumatoid arthritis. **Ann Acad Med Singap.**, v. 36, n. 2, p. 128-137, Feb. 2007.
- FAROOQUI, A.A. Lipid mediators in the neural cell nucleus: their metabolism, signaling and association with neurological disorders. **Neuroscientist.**, v.15, n.4, p.392-407, 2009.
- FELDMANN, M.; BRENNAN, F.M.; MAINI, R.N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. **Annu. Rev. Immunol.**, v.14, p.397-440, 1996.
- FELDMANN, M.; BRENNAN, F.M.; WILLIAMS, R.O.; WOODY, J.N.; MAINI, R.N. The transfer of a laboratory based hypothesis to a clinically useful therapy: the development of anti-TNF therapy of rheumatoid arthritis. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.**, v. 18, n. 1, p. 59-80, 2004.
- FELDMANN, M.; MAINI, R.N. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. **Nat. Med.**, v.9, p.1245-1250, 2003.
- FELTS, W; YELLIN, E.H. The economic impact of the rheumatic diseases in the United States. **J Rheumatol.**, v. 16, p. 867-884, 1989.
- FERREIRA, S. H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nat New Biol.**, v. 102, n. 240, p. 200-2003, dez. 1972.
- FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M.; CASTRO, M.S.A. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. **Prostaglan.**, v. 16, p. 31-37, 1978.
- FERREIRA, S. H.; ROMITELLI, M.; NUCCI, G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **J Cardiovasc Pharmacol.**, s. 5, 1989.
- FERREIRA, S.H.; FERRARI, L. F.; CUNHA, T. M.; NASCIMENTO, P. G. B. D.; CUNHA, F. Q. In: SIQUEIRA *et al.* **Dor: Princípios e Prática.** p. 265-279. São Paulo: Artmed, 2009.
- FLEMMING, D. J.; BERNARD, S. A. Arthritis mimicking sports-related injuries. **Clin Sport Med.**, v. 32, n. 3, p.577-97, maio 2013.
- FLORES, D.; MARQUEZ, J.; GARZA, M.; ESPINOZA, L. R. Reactive arthritis: newer developments. **Rheum Dis Clin North Am.**, v.29, n.1, p. 37-59, fev. 2003.
- FIRESTEIN, G.S; ZVAIFLVE, N.J. How important are cells in chronic rheumatoid synovitis? **Arthrit Rheuma.**, v. 33, n. 6, p. 768-73, Jun. 1990.
- FIRESTEIN, G.S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, p. 356-61, 2003.
- FURST, D.E. *et al.* Update consensus statement on tumor necrosis factor blocking agents for the treatment of rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v.59, p.1-12, 2000.

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

GAFFO, A; SAAG, K.G.; CURTIS, J.R. Treatment rheumatoid arthritis. **Am J Health Syst Pharm.**, v.15; 63, n. 24, p. 2451-2465, Dec. 2006.

GALLIN J.I ; SNYDERMAN, R. Overview, in Inflammation - Basic Principles and Clinical Correlates (Gallin JI and Snyderman R eds), **Lipp Willi & Wilk.** 1999.

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

GLEZER, I. *et al.* O fator de transcrição NF-kapaB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, 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. 24, n. 18, p. 10345-10355, dez. 1998.

GONÇALVES, E.S.G *et al.* Efeitos do pré-tratamento em curto prazo com ornitina alfa-cetogluturato na isquemia-reperfusão intestinal em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v.26, n.1, p.2-7, 2011. Suplemento.

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

HANSSON M, OLSSON I, NAUSEEF WM: Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. **Archs of Biochem Biophys.**, v. 445, p. 214-224, 2006.

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

HARRIS, E.D. Jr. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. **N Engl J Med.**, v. 322, p. 1277-1289, 1990.

HIRAYAMA, K. B.; SPERIDIÃO, P. G. L.; NETO, U. F. Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa. **The Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Live**, v.10, n. 3, p. 1-10, 2006.

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

IWALEWA, E. O.; MCGAW, L. J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phyto medicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African J. Biotech.**, v. 6, n. 25, p. 2868-2885, 2007.

IWASAKI, M.; YOSHIHARA, A.; MOYNIHAN, P.; WATANABE, R.; TAYLOR, G. W.; MIYAZAKI, H. Longitudinal relationship between dietary u-3 fatty acids and periodontal disease. **Nutrit.**, v. 26, p. 1105-1109, 2010.

IWASAKI et al. Dietary ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids and periodontal disease in community-based older Japanese: A 3-year follow-up study. **Prost, Leuko and Essent Fat Acids**, v. 85, p. 107-112, 2011.

JAMES, T.; WU, A; WU, L.L. Acute and Chronic inflammation: effect of the risk factor (s) in the progression of the early inflammatory response to the oxidative and nitrosative stress. **J Biomed Lab Sci.**, v.19, n.32, 2007.

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

KHASAR, S. G. et al. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. **Neuron.**, v. 1, n. 24, p. 253-260, set. 1999.

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

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

KINNE, R.W. et al. Macrophages in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res.**, v.2, p.189-202, 2000.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J Leukoc Biol**, v.77, p. 598-625, 2005.

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

KOMATSU, W. et al. Docosahexaenoic acid suppresses nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in interferongamma plus lipopolysaccharidestimulated murine macrophages by inhibiting the oxidative stress. **Free Radic Biol Med.**, v.15, n. 34(8), p. 1006-1016, Apr. 2003.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia:** bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KVIEN, T.K; UHLIG, T; ODEGARD, S, HEIBERG, MS. Epidemiological Aspects of Rheumatoid Arthritis: The Sex Ratio. **Anm. NY Acad. Sci.**, v. 1069, p. 212-222, 2006.

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

LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. **Pharmacol. Ther.**, v. 111, p. 16-26, 2006.

LAU, D. et al. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/Cd18 integrins. **PNAS.**, v.103, p. 431-436, 2005.

LAWSON, S.N.; CREPPS, B.A.; PERL, E.R. Calcitonin gene related peptide immuno reactivity and afferent receptive properties of dorsal root ganglion neurons in guinea-pigs. **J. Physiol.**, v. 540, p.989-1002, 2002.

LEITÃO, J.P.V. et al. L-Alanyl-Glutamine dipeptide pretreatment attenuates ischemia-reperfusion injury in rat testis. **Acta Cir. Bras.**, v.26, n.1, p. 21-25, 2011. Suplemento.

LIMA, V.; BEZERRA, M. M.; LEITÃO, R. F. C.; BRITO, G. A. C.; ROCHA, F. A. C.; RIBEIRO, R. A. Principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da periodontite – Papel de moduladores farmacológicos. **Rev Period.**, v. 18, n. 3, p. 7-19, 2008.

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

LINO, J.A. et al. Neuroprotective effect of amifostine upon oxaliplatin-induced peripheral sensory neuropathy in mice. **Inflamm. Res.**, v.60, n. 1, p. 206, 2011. Suplemento.

MACHADO, M. A. et al. Treatment of ankylosing spondylitis with TNF blockers: a meta-analysis. **Rheumatol Int.**, maio 2013.

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

MAGARÓ, M. et al. Effect of fish oil on neutrophil chemiluminescence induced by different stimuli in patient with rheumatoidarthritis. **Ann Rheum Dis.**, v. 51, n.7, p. 877-880, jul. 1992.

MAJNO, G. Studies on inflammation II. The site of action of histamine and serotonin. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v.11, p.571, 1961.

MAJNO, G.; PALADE, G.E. Studies on inflammation I. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v.11, p.571-605, 1961.

MARQUES, A. P. **Qualidade de vida de indivíduos com fibromialgia:** poder de discriminação dos instrumentos de avaliação. 2004. 78 f. Tese (Doutorado em Fisioterapia) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MARTIN et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Rev de Nut.**, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.

MARTINDALE, R.G; McCLAVE, S.A; McCARTHY, M.S. Modulação Imunológica e Metabólica com Terapia Nutricional no paciente cirúrgico. In: CAMPOS, Antônio C. **Trat de Nut e Metab em Cirur.** Rio de Janeiro: Rubio, 2013. p. 94-99.

MARTINS, J. M.; GRUEZO, N. D. Ácido Graxo w-6 na Etiologia do Câncer de Cólon e Reto. **Rev Bras de Canc.**, v. 55, n. 1, p. 69-74, 2009.

MATSUOKA, N. et al. Phenotypic characteristics of T cells interacted with synovial cells. **J. Rheumatol.**, v.18, p. 1137-1142, 1991.

MATSUOKA, N. et al. Pharmacokinetics and metabolism of lumiracoxib in healthy male subjects. **Drug Metab Dispos.** v.32, p. 566-571, 2004.

MCGUINNESS, J. et al. Myocardial protection using an omega-3 fatty acid infusion: qualification and mechanism of action. **J Thorac Cardiovasc Surg.**, v.132, n.1, p. 72-79, jul. 2006.

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

MESQUITA, T. R. M.; SOUZA, A. A.; CONSTANTINO, E.; PELÓGIA, N. C. C.; POSSO, I. P.; PIRES, O. C. Anti-inflammatory effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids in rats. **Revista Dor.**, v. 12, n. 4, p. 337-341, 2011.

MONTERA, V. S.P. Benefícios dos nutrientes antioxidantes e seus cofatores no controle do estresse oxidativo e inflamação na insuficiência cardíaca. **Rev.Socerj.**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 20-27, jan/fev. 2007.

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

MORAES, F.P., COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Rev Eletr Farm.**, v. 3, n.2, p. 109-122, 2006.

MORALES-ALPIZAR, C; SALAS-HERRERA, I. Manejo farmacológico Del doloren el paciente oncológico. **Acta méd. Costarric.**, San José, v. 46, n. 3, Sep. 2004.

MOREIRA, N. X.; CURI, R.; MANCINI FILHO, J. Ácidos graxos: uma revisão. **Nutrir.**, v. 24, p. 105-123, 2002.

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

MULLER-LADNER, U; PAP, T; GAY, R.E; NEIDHART, M; GAY, S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. **Nat Clin Pract Rheumatol.**, v. 1, n.2, p. 102-110, Dec. 2005.

MURRY, C.E.; JENNINGS, R.B.; REIMAR, K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circul.**, v.74, n.5, p.1124-1136, 1986.

NAKAMURA, K.; KARIYAZONO, H.; KOMOKATA, T.; HAMADA, N.; SAKATA, R.; YAMADA, K. Influence of preoperative administration of w-3 fatty acid-enriched

supplement on inflammatory and immune responses in patients undergoing major surgery for cancer. **Nutrit.**, v. 21, p. 639-649, 2005.

OLIVEIRA, E.S.G. et al. Efeitos do pré-tratamento em curto prazo com ornitina alfa-cetoglutarato na isquemia-reperfusão intestinal em ratos. **Acta Cir Bras.**, v.26, n.1, p. 2-7, 2011. Suplemento.

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

OLIVEIRA, N.R. **Ações de enfermagem no controle da dor oncológica em hospitais gerais: dificuldades vividas e protocolo sugerido.** Dissertação (Mestrado em Residência em Enfermagem) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO, Rio de Janeiro, 2010.

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

PAIVA, A.A.O. CASTRO, A.J.G; NASCIMENTO, M.S. Antioxidant and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Lobophora variegata* on zymosan-induced arthritis in rats. **J. Intern Immunopharm.**, n.11, p. 1241-1250, 2011.

PAP, T. et al. Fibroblast biology: role of fibroblast in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Arthrt Researc.**, v.2, p. 361-367, 2000.

PEREIRA, F.E.L.; BOGLIOLO, L. **Bogliolo Patologia.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

PÉREZ-PINZÓN, M.A.; MUMFORD, P.L.; ROSENTHAL, M.; SICK, T. Anoxic preconditioning in hippocampal slices: role of adenosine. **Neurosci.**, v.75, n. 3, p.687-694, 1996.

PERINI, J. A. L.; STEVANATO, F. B.; SARGI, S. C.; VISENTAINER, J. E. L.; DALALIO, M. M. O.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 6, p. 1075-1086, 2010.

PILLINGER, M.H.; ABRAMSON, S.B. The neutrophil in rheumatoid arthritis. **Rheum.Dis. Clin. North Am.**, v. 21, p.691-714, 1995.

PINHEIRO, P.M.A. **Pré-condicionamento nutricional com misturas de óleos ômega-3, 6 e 9 na isquemia e reperfusão cerebral em ratos.** Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

PINHEIRO, P.M.A.; CAMPELO, A.P.B.S.; GUIMARÃES, S.B.; PATROCÍNIO, R.M.V.; VALENÇA JÚNIOR, J.T.; VASCONCELOS, P.R.L. Pré-condicionamento com misturas de óleos com ômega-9: ômega-6 (alta relação) e ômega-6: ômega-3 (baixa relação) em ratos

submetidos à isquemia / reperfusão cerebral. **Acta Cir Bras.**, v.26, n.1, p.32-37, 2011. Suplemento.

PINTO, L.G. **Papel da IL-17 na gênese da hipernociceção inflamatória em modelo de artrite induzida por antígeno em camundongos.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade de São Paulo, Ribeiro Preto, 2010.

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

PIRES, V.L. et al. Pré-condicionamento com L-alanil-L-glutamina em modelo de isquemia/reperfusão cerebral aguda em Gerbils da Mongólia. **Acta Cir. Bras.**, v.26, n. 1, p.14-20, 2011. Suplemento.

QUIRINO, Iara E., CORREIA, Maria I. Arginina no Paciente Cirúrgico. In: CAMPOS, Antônio C. **Tratado de Nutrição e Metabolismo em Cirurgia.** Rio de Janeiro: Rubio, 2013. Capítulo 13, p.108-111.

RANG, H. P.; DALE, M.M; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale: farmacologia.** 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

REN, J.; CHUNG, S.H. Anti-inflammatory effect of alpha-linolenic acid and its mode of action through the inhibition of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression via NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. **J Agric Food Chem.**, v. 55, n.13, p. 5073-80, jun. 2007.

REYNOLDS, W. F.; STEGEMAN, C. A.; TERVAERT, J. W. -463 G/A myeloperoxidase promoter polymorphism is associated with clinical manifestations and the course of disease in MPO-ANCA-associated vasculitis. **Clin. Immunol.**, v. 103, p. 154-160, 2002.

REYNOLDS, W. F. et al. Myeloperoxidase promoter polymorphism -463G is associated with more severe clinical expression of cystic fibrosis pulmonary disease. **Mediat Inflamm.** v. 2, p. 1-8, 2006.

RIBEIRO, R.A., et al. Modelos de dor e inflamação aguda In: **PRÁTICAS em fisiologia, farmacologia e bioquímica.** Fortaleza:[s.n.],2012.

RIBEIRO, R.A., et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 387, n. 1, p. 111, 2000.

ROBBINS, S. S.; COTRAN, R. S. **Pathologic basis of diseases.** 7. ed. Philadelphia: Saunders, 2005.

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

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

RODRIGUEZ-VITA, J.; LAWRENCE, T. The resolution of inflammation and cancer. **Cytok Grow Fact Rev.**, v. 21, p. 61-65, 2010.

ROSA. et al. Chemical composition and effect on intestinal Caco-2 cell viability and lipid profile of fixed oil from *Cynomorium coccineum* L. **Food Chem Toxicol.**, v. 10, n. 50, p. 799-807, out. 2012.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N. Animal models of arthritis caused by systemic alteration of immune system. **Curr Opin Immunol.**, v.17, n.6, p. 589-84, 2005.

SALAVEJ, P.; SPALTEHOLZ, H.; ARNHOLD, J. Modification of amino acid residues in human serum albumin by myeloperoxidase. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 40, p. 516-525, 2006.

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

SANTUCCI, M. N. Power of omega-3s. **Dimens of Dent Hyg.**, v. 10, n. 11, p. 60-63, 2012.

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

SCHAIBLE, H.G.; EBERSBERGER, A.; VON BANCHET, G.S. Mechanisms of pain in arthritis. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 966, p. 343-54, 2002.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 8, p. 93-151, 2006.

SCULCO, T.P. The knee joint in rheumatoid arthritis. **Rheuma Dis Clin North Am.**, v. 24, n.1, p.143-56, Feb.1998.

SENKAL, M.; ZUMTOBEL, V.; KARL-HEINZ, B.; MARPE, B.; WOLFRAM, G.; FREI, A.; EICKHOFF, U.; KEMEN, M. Outcome and cost-effectiveness of perioperative enteral immunonutrition in patients undergoing elective upper gastrointestinal tract surgery. **Arch Surg.**, v.134, p.1309-1316. 1999.

SENNA, E.R; DE BARROS,A.L; SILVA E.O, COSTA, I.F; PEREIRA, L.V; CICONELLI, R.M, FERRAZ M.B. Prevalence of rheumatoid diases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **J Rhemato.**, v. 31, n. 3, p. 594-597, Mar. 2004.

SEYMOUR, R.M, HENDERSIN, B. Pro-inflammatory anti-inflammatory cytokine dynamics mediated by cytokine-receptor dynamics in monocytes. **IMA J Math Appl Med Biol.**, v.18, n. 2, p.159-92, Jun. 2001.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Prac and Researc Clin Anaest.**, v. 18, p. 385–405, 2004.

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.

SIMOPOULOS, A.P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. **J of the Amer Col of Nutrit.**, v.21, n.6, p. 495-505, 2002.

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

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

SUAREZ-MAHECHA. et al. Importância de ácidos graxos poliinsaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana. **Bolm Inst. Pesca**, v. 28, p. 48-52, 2002.

STAGLIANO, N.E.; PÉREZ-PINZÓN, M.A.; MOSKOWITZ, M.A.; HUANG, P.L. Focal ischemic preconditioning induces rapid tolerance to middle cerebral artery occlusion in mice. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v.6, n.7, p.757-761, 1999.

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

TARNER, I.H. ET AL. The different stages of synovitis: acute vs chronic, early vs late and non-erosive vs erosive. **Best Pract e Researc Clin Rheum.**, v.19, n.1, p.19-35, 2005.

TAVARES, L.L. **Pré-condicionamento nutracêutico com arginina e mistura de óleos sobre mediadores inflamatórios em pacientes submetidos à prostatectomia radical**. 2013. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

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

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

TORRINHAS, R.S.; RODRIGUES, L.S.; WAITZBERG, D. L. Ácidos Graxos em cirurgia. In: CAMPOS, Antônio C. **Trat de Nutr e Metab em Cirur**. Rio de Janeiro: Rubio, 2013. Capítulo 14, p.114-121.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. **Liga de Reumatologia – UFRGS**. Disponível em :

<www.ufrgs.br/ufrgs/results?q+liga+de+reumatologia&domains=www.ufrgs.br&sitesearch=www.ufrgs.br. Acesso em: 24 mar.2014.

VALENTIM, E.E. **Efeitos diferenciais do sulfeto de hidrogênio exógeno e endógeno na sinovite experimental induzida por carragenina em ratos wistar**. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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

VANDENBROUCKE, J.P; HAZEVOET, H.M, CATS, A. Survival and death in rheumatoid arthritis : a 25 year prospective follow up. **J Rheumatol.**, v.11, p 158-161, 1984.

VASCONCELOS, C.P.P. **Pré-condicionamento e tratamento com misturas de óleos de ômega-3, 6 e 9 sobre a inflamação e a reabsorção óssea na doença periodontal experimental**. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

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

VIANA C. F. G, ARAGÃO, J. R. A. G. M; RIBEIRO, R.A., MAGALHÃES J.F.G; VALE, M. R. Effect of *Ageratum conyzoides* in nociception and inflammatory response induced by zymosan. **Fitote.** v.69, n. 4, 1998.

WAITZBERG, D.L. et al. Postsurgical infections are reduced with specialized nutrition support. **Wor J of Surg.**, v.30, p.1592-1604. 2006.

WAITZBERG, D.L. **Ômega-3: o que existe de concreto?** São Paulo: Nutrilite, 2008.

WALSH, N.C; CROTTI, T.N; GOLDRING, S.R; GRAVALLESE, E.M. Rheumatic diseases: the effects of inflammation on bone. **Immunol Rev.**, v. 208, p. 228-51, 2005.

WATKINS, L.R.; WIERTELAK, E.P.; GOEHLER, L.E.; SMITH, K.P.; MARTIN, D.; MAIER, S.F. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. **Brain Res.**, v. 654, p.15-26, 1994.

WEBER, E. S. Fish analgesia: pain, stress, fear aversion, or nociception? **Vet Clin North Am Exot Anim Pract.** v. 1, n. 14, p.21-32, jan. 2011.

WEISS, SJ. Tissue destruction by neutrophils. **N England J Med.**, v. 320, p. 365-376, 1989.

WEISSMANN, G.; KORCHAK, H. Rheumatoid Arthritis: the role of neutrophil activation. **Inflam.**, v. 8, p. 3-14, 1984. Suplemento.

WILLMENT, J. A.; LIN, H.; REID, D. M.; TAYLOR, P. R.; WILLIAMS, D.; WONG, S. C.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Dectin-1 Expression and Function Are Enhanced on

Alternatively Activated and GM-CSF-Treated Macrophages and Are Negatively Regulated by IL-10, Dexamethasone, and Lipopolysaccharide. **J Immunol**, v. 171, n. 9, p. 4569-4573, 2003.

WINTERBOURN, C. C.; VISSERS, M. C. M.; KETTLE, A. J. Myeloperoxidase. **Cur. Opin. Hematol.**, v. 7, p. 53-58, 2000.

WOZAKOWSKA-KAPLON, B.; GRABSKI, M.; KEDZIORA, J. Hydrogen sulphid e catalase activity in patients with rheumatoid arthritis – in vitro study. **Wiad. Lek.**, v. 59, n.1-2, p.72-77, 2006.

XU, J. et al. Preoperative enteral immunonutrition improves postoperative outcome in patients with gastrointestinal cancer. **Wor. J of Surg.**, v.30, p.1284-1289. 2006.

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

YANG, R. et al. Prefeeding with omega-3 fatty acids suppresses inflammation following hemorrhagic shock. **J Paren Ent Nutr.**, v.34, n. 5, p. 496-502, sep/oct. 2010.

YAP, W. Y.; WHITEMAN, M.; CHEUNG, N. S. Chlorinative stress: An under appreciated mediator of neurodegeneration? **Cell Signal.**, v. 19, p. 219-228, 2007.

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

ZARPELON, A. C.; SOUZA, G. R.; CUNHA, T. M.; SCHIVO, I. R.; MARCHESE, 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. **Neuropharm.**, v. 71, p. 1-9, Mar. 2013.

ZEISEL, S.H. Regulation of nutraceuticals. **Scien.**, v. 285, p. 1853-55,1999.

ZHENG, Y. et al. Application of perioperative immunonutrition for gastrointestinal surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Asia Pac J Clin Nutr.**, v. 16, n.1, p. 253-257, 2007. Suplemento.

APÊNDICE A - Dados Brutos

Dados brutos do resultado da incapacitação articular

H	CONTROLE						MIX 1						MIX 2						MIX 3						DEXA					
1,	13,4	9,7	9,7	11,4	17,6	5,2	9,9	7,5	6,4	9,6	7,7	12,5	13,7	4,2	7,6	6,6	5,7	10,5	13,2	8,7	7,9	6,1	7,2	6,0	7,4	15,4	10,7	6,5	7,5	7,3
2,	37,9	36,5	25,8	27,6	16,5	26,6	10,1	17,2	8,3	11,6	21,5	9,6	27,0	23,2	32,9*	24,6	12,2	24,5	16,7	18,4	16,1	20,3	23,0	28,0	10,9	23,5	15,3	11,1	10,6	9,3
3,	46,4	33,6	37,7	38,6	23,1*	39,6	22,9	27,7	36,8	24,8	35,1	13,2	30,8	18,8	33,2	17,7	14,3	14,3	27,0	14,1	26,6	36,6	31,7	28,5	17,4	29,2	29,2	14,5	17,6	13,4
4,	34,8	40,5	30,7	20,4	50,7	21,1	30,7	21,2	22,3	23,2	38,4	20,6	45,6	46,2	21,4	28,1	15,5	25,6	39,5	12,5	23,2	16,3	45,3	47,1	13,2	35,2	23,8	22,1	16,5	22,8

Dados brutos do resultado do infiltrado total de leucócitos

C	Dexa	MIX-1	MIX-2	MIX-3	N
37,00	9,40	16,15	14,50	28,95	0,05
33,80	18,40	13,65	37,30	16,50	0,15
31,05	13,55	11,95	27,40	15,35	0,10
29,95	14,50	25,65	18,75	10,00	0,10
30,65	10,35	15,70	21,00	25,50	0,00
34,65	5,90	13,40	30,40	13,45	0,00

Dados brutos do resultado da contagem diferencial do infiltrado de leucócitos

C	MIX-1	MIX-2	MIX-3	Dexa
25,90	5,49	7,50	11,00	3,19
27,04	6,55	0,00	5,11	6,80
24,52	2,10	0,00	3,68	3,79
	7,10	11,20	3,10	4,93
27,58	6,10	8,82	8,92	3,93
30,49	4,90	10,04	5,64	2,12

Dados brutos do resultado do edema articular (diâmetro do joelho)

h	CONTROLE						MIX 1						MIX 2						MIX 3						DEXA					
0,	8,51	8,36	8,11	8,50	8,33	8,21	8,21	8,36	8,39	7,81	8,68	8,01	8,04	8,35	8,86	8,66	8,00	8,02	7,78	8,14	8,81	9,28	7,90	8,26	8,69	8,23	8,61	8,12	8,09	8,79
1,	8,51	8,36	8,11	8,50	8,33	8,21	8,21	8,36	8,39	7,81	8,68	8,01	8,04	8,35	8,86	8,66	8,00	8,02	7,78	8,14	8,81	9,28	7,90	8,26	8,69	8,23	8,61	8,12	8,09	8,79
2,	11,12	11,58	11,26	12,05	11,51	12,18	10,00	10,57	11,55	9,98	10,66	9,98	9,83	9,45	8,26	8,72	8,97	10,36	10,56	11,15	12,02*	10,90	10,21	9,55	9,11	9,92	8,73	9,01	9,86	9,41
3,	11,84	10,94	10,95	11,05	12,70	11,67	12,05	10,22	11,16	9,24	10,27	9,86	11,06	9,70	10,34	10,51	9,96	11,86	10,59	11,20	12,37	11,22	11,05	10,09	10,24	10,47	10,87	10,46	10,65	10,27
4,	13,21	11,38	12,75	13,39	13,56	11,96	12,10	11,98	12,14	10,27	11,53	10,72	12,38	10,05	10,23	10,95	10,89	10,22	10,61	11,93	11,35	11,53	11,58	11,65	10,11	10,42	10,62	9,11	10,38	10,46
5,	13,68	12,33	12,01	13,40	12,80	12,72	13,36	11,81	13,05	11,51	10,45	10,79	11,55	11,07	13,69*	12,70	11,90	12,97	11,76	12,20*	11,15	11,99	11,82	11,10	10,82	10,77	10,34	9,29	10,81	10,50

Dados brutos do resultado da permeabilidade vascular (extravasamento de azul de evans)

Naive	C	Mix1	Mix2	Mix3	Dexa
0,000382282	0,004700597*	0,001827981	0,002950519	0,003580018*	0,000555191
0,000327316	0,003580623	0,001091329*	0,001661117*	0,001164691	0,00076546
0,000329381	0,002957747	0,002977659	0,002027499	0,00134366	0,002133482
0,000316954	0,003059089	0,001662718	0,002426546	0,000820679	0,000716839
0,000325677	0,003495319	0,002753508	0,003151088	0,000559007*	0,000756809
0,000450307	0,003430945	0,00268971	0,002804714	0,00106633	0,000918914

Dados brutos do resultado da hipernociceção mecânica plantar induzida por Carragenina

Horas	Controle						Mix 1						Mix 2						Mix 3						Indometacina					
1,	0,0	0,0	0,0	0,0	5,3	7,4	0,0	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0	4,6	7,5*	0,0	5,7*	3,5	1,1	1,9	0,0	1,7	3,1	0,2	5,6*	0,2	3,3	0,0	0,0	7,7*	9,0*
2,	0,4	1,3	3,2	0,0*	10,3	10,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	5,9*	0,0	5,0	6,4*	0,1	1,9	3,2	11,9	5,5	11,7	13,0	2,0	2,4	0,4	0,4	7,1	6,5	
3,	6,3	0,0*	3,3	0,4	10,3	4,0	5,0	15,5*	2,1	4,6	2,6	9,7	12,8	10,6	7,2	17,9*	11,0	4,6	16,0	3,2	10,1	15,5	10,7	17,0	0,0	5,4	0,0	0,2	13,3	3,4
4,	20,8	12,9	16,4	8,0	17,8	21,9	16,1	10,6	0,0	4,2	7,7	5,2	3,9	11,5	0,0	14,4	16,4	11,3	0,0	0,0	12,2	7,8	12,3	9,8	3,3	11,1	4,2	5,1	12,2	10,5
5,	15,7	14,9	11,2	16,0	30,4	18,4	8,6	5,6	7,8	0,0	1,9	9,2	3,9	9,5	0,0	9,2	11,3	4,1	9,4	5,9	11,5	10,1	11,8	11,0	0,0	4,5	0,0	0,6	12,5	8,8

Dados brutos do resultado da hipernociceção mecânica plantar induzida por PGE2

h	Controle						Dipirona						Mix1						Mix2						Mix3					
2,	4,2	6,1	5,9	7,1	28,1	10,9	7,7	7,5	5,1	10,3	5,1	9,3	7,0	3,4	3,1	5,4	6,5	1,6	10,9	24,5	19,8	14,6	1,4	1,4	6,8	12,7	12,7	5,9	7,8	9,1
3,	24,1	14,2	14,4	26,2	14,8	27,6	20,1	6,1	15,0	4,6	13,1	24,9*	20,5	18,1	21,8	15,2	10,6*	17,2	23,3	32,6	18,8	11,7	20,3	15,1	13,3	19,4	19,4	24,8	15,9	18,6

4,	25,5	16,0	15,9*	27,3	31,5	27,8	21,3*	13,4	11,6	17,5	12,6	19,5	15,4*	21,4	18,2	18,1	21,5	18,5	33,3	33,9	21,5	22,1	15,2	16,2	18,4	35,5	24,3	31,5	22,7	30,9
5,	16,3*	20,4	26,0	28,4	23,8	22,2	16,2	15,9	13,0	8,3	18,9	22,9	23,0	20,3	19,4	17,3	17,6	19,1	30,4	34,9	28,9	18,9	15,3	12,7	16,6	25,0	30,5	35,4	21,1	38,4

Dados brutos do resultado da atividade de mieloperoxidase (MPO)

71353,540000	3,289000
35676,770000	2,714000
17838,380000	1,356000
8919,192000	0,556000
4459,596000	0,271000
2229,798000	0,152000
1114,899000	0,075000
557,449500	0,036000
278,724800	0,020000

0,000000
0,126000
0,132000
0,043000
0,031000
0,000000

2,357000
2,993000
1,320000
0,000000
2,741000
1,489000

1,643000
1,553000
1,128000
2,715000
1,987000
2,025000

0,939000
1,530000
2,665000
1,097000
1,878000
2,041000

1,554000
1,636000
1,796000
0,723000
1,664000
1,287000

1,141000
1,786000
1,387000
0,914000
1,010000
1,324000

ANEXO A- Termo de Aprovação do Comitê de Ética



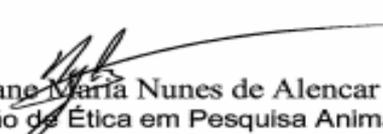
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 50/11, sobre o projeto intitulado: **“PRÉ-CONDICIONAMENTO ENTERAL COM MIX DE ÓLEOS DE ÔMEGA3, 6 E 9 NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM RATOS”**, de responsabilidade de BEATRIZ TORRES DE MELO CAVALCANTE, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

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

Fortaleza, 12 de dezembro de 2011.

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