



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Nathália Regina Felizardo Leal

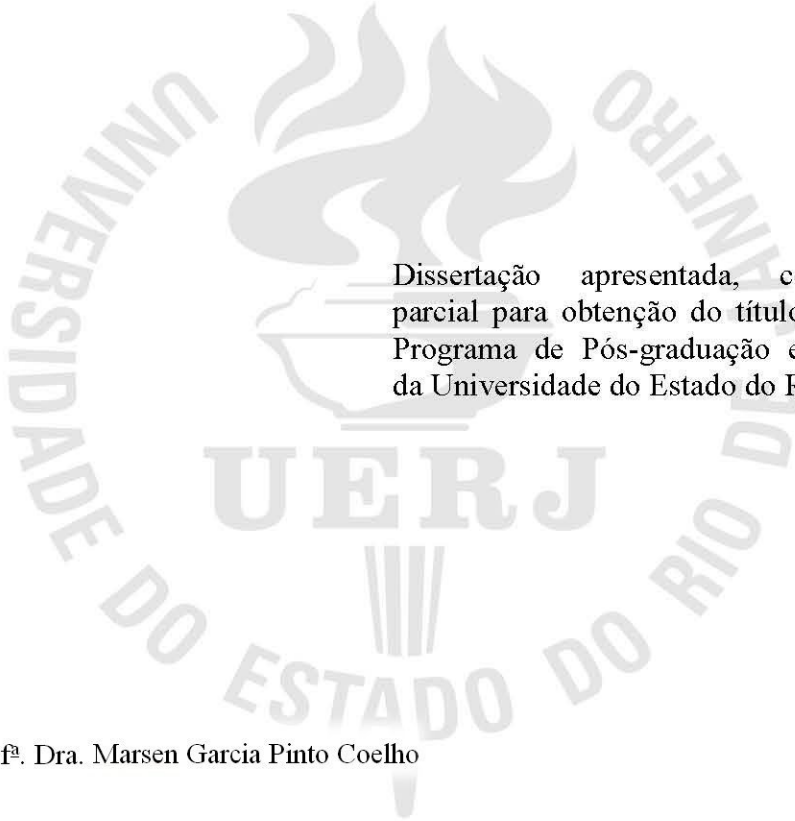
**Avaliação do potencial anti-inflamatório agudo e crônico e imunossupressor  
do extrato etanólico de *Pterodon polygalaeflorus* através de estudos  
*in vivo* e *in vitro***

Rio de Janeiro

2011

Nathália Regina Felizardo Leal

**Avaliação do potencial anti-inflamatório agudo e crônico e imunossupressor do extrato etanólico de *Pterodon polygalaeflorus* através de estudos *in vivo* e *in vitro***



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

L435 Leal, Nathália Regina Felizardo.  
Avaliação do potencial anti-inflamatório agudo e crônico e imunossupressor do extrato etanólico de *Pterodon polygalaeflorus* através de estudos *in vivo* e *in vitro* / Nathália Regina Felizardo Leal. - 2011.

131 f. : il.

Orientador : Marsen Garcia Pinto Coelho..

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Plantas medicinais - Uso terapêutico - Teses. 2. *Pterodon polygalaeflorus* - Teses. 3. Inflamação - Teses. 4. Artrite reumatóide - Teses. 5. Mielopoiese - Teses. 6. Apoptose - Teses. I. Coelho, Marsen Garcia Pinto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 633.88

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Nathália Regina Felizardo Leal

**Avaliação do potencial anti-inflamatório agudo e crônico e imunossupressor do extrato etanólico de *Pterodon polygalaeflorus* através de estudos *in vivo* e *in vitro***

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 18 de fevereiro de 2011

Orientadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Kátia Costa de Carvalho Sabino  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Augusta Borges Cursino de Freitas Arruda  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria da Graça Araújo Baruque  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Rio de Janeiro

2011

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, aos meus pais, aos meus amigos e àqueles que sempre me apoiaram.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que por mais que eu fraquejasse, Ele sempre me deu provas que estava ali ao meu lado, guiando os meus caminhos por mais que fossem difíceis.

Aos meus pais, criaturas mais importantes da minha vida, independente das divergências e dos problemas, que me mostraram o significado do amor. Ensinaram-me a gostar de estudar e de ser perseverante. Deram-me colo nos momentos difíceis e festejaram minhas vitórias. Obrigada mãe por sempre exigir nota 10. Amo vocês!

Às minhas tias, primos e afilhado Roger, pelo apoio, carinho e confiança.

Aos meus amigos Raquel, Carol, Tia Sônia, Thaís, Daniel, Felipe, Igor, Horácio, tia Graça, Larisse e tantos outros que sempre me apoiaram, me ajudaram, me deram força e me ampararam nos momentos difíceis, escutando minhas lamúrias em momentos de desespero.

À minha orientadora Marsen, pela orientação, pela atenção, carinho, compreensão, puxões de orelha, pelo cuidado e por tudo que me ensinou durante estes anos no laboratório.

Ao professor Sérgio Dalmau, meu carinho especial, obrigada pela ajuda, pela disponibilidade em horários e dias desleais de trabalho, pelo carinho, pelas risadas, pelas broncas, pelos ensinamentos, pela compreensão. À professora Kátia, pela atenção nos momentos finais, pela paciência, pela discussão dos resultados, pelos ensinamentos, pela paixão ao trabalho. E à professora Márcia pelo apoio e sugestões.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho Mariana, Fabiana, Daniele, Thiago, Fernanda, Denilson, Gleison, Girlaine, pelas ajudas extremamente indispensáveis no decorrer deste trabalho e também pelas “nights” inesquecíveis! Em especial, a você Gleison, que mesmo sem ter obrigação e passando por momentos indesejáveis, me ajudou, me ensinou, esteve comigo nos momentos finais de trabalho. Obrigada amigo!

Aos amigos Jéssica, Francis, Mauricio, Natália, Cíntia pelas trocas de informações, pelos momentos de descontração na hora do almoço e pelas saídas.

Aos funcionários, Shirley, Paulo, Beto, Michele, Paulinho, pela atenção, pela paciência, pela ajuda, pelas sugestões, pelos ensinamentos.

Aos doutores, Dr<sup>a</sup> Kátia Costa de Carvalho Sabino, Dr<sup>a</sup> Maria Augusta Borges Cursino de Freitas Arruda, Dr<sup>a</sup>. Maria das Graças Araújo Baruque, Dr. Sérgio Ranto Dalmau Arroyo, Dr<sup>a</sup>. Mônica Farah Pereira, por terem aceitado integrar a banca examinadora deste trabalho.

A todos que de certa forma, indireta ou diretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Torna-te eternamente responsável por aquilo que cativas

*Antoine de Saint Exupéry*



## RESUMO

LEAL, Nathália Regina Felizardo. **Avaliação do potencial anti-inflamatório agudo e crônico e imunossupressor do extrato etanólico de *Pterodon polygalaeflorus* através de estudos *in vivo* e *in vitro*.** 2011. 131f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

O gênero *Pterodon* pertence à família das Papilionaceas e inclui cinco espécies nativas do Brasil: *P. pubescens* Benth., *P. emarginatus* Vog., *P. apparicioi* Pedersoli e *P. abruptus* Benth., sendo a espécie objeto deste estudo a *P. polygalaeflorus* Benth.. Seus frutos são livremente comercializados em mercados da flora medicinal e utilizados pela medicina popular devido a propriedades anti-reumática, analgésica, antiinflamatória, dentre outros efeitos associados a esses frutos. O principal uso popular está relacionado ao efeito antiartrítico que parece se encontrar na fração oleosa do fruto. O objetivo deste trabalho foi avaliar o extrato etanólico de *Pterodon polygalaeflorus* (EEPpg) quanto ao seu potencial antiinflamatório crônico através do modelo de artrite induzida por colágeno (CIA) e seu efeito sobre os linfócitos *in vitro*, bem como sobre a expansão de células MAC-1<sup>+</sup> induzida por adjuvante completo de Freund (AFC). A caracterização química do EEPpg foi realizada por cromatografia em camada delgada (TLC), cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS), através dos quais uma gama de compostos, incluindo terpenóides de polaridades variadas e flavonóides, foram observados. No modelo de CIA, o EEPpg reduziu significativamente parâmetros associados ao desenvolvimento e progressão da doença e à severidade da doença, inibindo em até 99% o seu desenvolvimento e levando a ausência de sinais clínicos evidentes após tratamento com as menores doses do extrato (0,01 mg/kg e 0,001 mg/kg). O tratamento com EEPpg também reduziu características histopatológicas típicas de articulações de animais com CIA, que também são observadas na artrite reumatóide. O EEPpg reduziu significativamente o peso dos linfonodos dos camundongos, bem como o número absoluto de segmentados, monócitos e linfócitos no sangue. *In vitro*, O EEPpg mostrou uma atividade anti-proliferativa dos esplenócitos estimulados com concanavalina A (Con A) ou lipopolissacarídeo (LPS) analisada através do ensaio de redução do sal de tetrazólio MTT, corroborada pelo seu efeito sobre o ciclo celular de linfócitos estimulados com Con A, onde o EEPpg nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL reduziu significativamente, de maneira concentração-dependente, o número de células nas fases S+G2/M e aumentou na fase G0/G1 do ciclo celular. O efeito anti-proliferativo do EEPpg parece também estar associado ao aumento da apoptose dos linfócitos após estimulação com Con A, com aumento estatisticamente significativo no percentual de células mortas por apoptose nas maiores concentrações. O EEPpg inibiu a expansão de células Mac-1<sup>+</sup> induzida por AFC no baço, porém não no peritônio. Esse resultado sugere um efeito inibidor do EEPpg sobre a migração celular para as articulações artríticas. Esses resultados contribuem para a validação do uso popular de *P. polygalaeflorus* contra doenças relacionadas a processos inflamatórios e imunes, sobretudo na artrite reumatóide, antes nunca demonstrado.

Palavras-chave: Sucupira. *Pterodon polygalaeflorus*. Inflamação. Artrite Reumatoide. Mielopoiese. Apoptose.

## ABSTRACT

The genus *Pterodon* belongs to the family Papilionaceas and includes five native species of Brazil: *P. pubescens* Benth., *P. emarginatus* Vog., *P. apparicioi* Pedersoli and *P. abruptus* Benth., being the object of this study the species *P. polygalaeflorus* Benth. Its fruits are freely traded in markets and medicinal plants used in folk medicine due to anti-rheumatic, analgesic, antiinflammatory, among other effects associated with these fruits. The main use is related to the popular anti-arthritic effect that seems to be found in oily fraction of the fruit. The aim of this study was to evaluate the ethanol extract of *Pterodon polygalaeflorus* (EEPpg) for their potential anti-inflammatory chronic through the model of collagen-induced arthritis (CIA) and its effect on lymphocytes in vitro, as well as the MAC-cell expansion 1 + induced by Freund's complete adjuvant (CFA). The chemical characterization of EEPpg was performed by thin layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), through which a range of compounds, including terpenoids polarity varied and flavonoids, were observed. In model of CIA, EEPpg significantly reduced parameters associated with the development and progression of disease and disease severity, inhibiting up to 99% its development and leading to the absence of obvious clinical signs after treatment with lower doses of the extract (0,01 mg/kg and 0.001 mg/kg). Treatment with EEPpg also reduced histopathological features typical of arthritic joints that are also observed in rheumatoid arthritis. The EEPpg significantly reduced the weight of the lymph nodes of mice as well as the absolute number of segmented, monocytes and lymphocytes in the blood. In vitro, EEPpg showed an anti-proliferative activity of splenocytes stimulated with concanavalin A (Con A) or lipopolysaccharide (LPS) analyzed by testing to reduce the tetrazolium salt MTT, supported by its effect on the cell cycle of lymphocytes stimulated with Con A, where the EEPpg at concentrations of 5, 10 and 20 mg/mL significantly reduced in concentration-dependent manner, the number of cells in phases S + G2 / M and increased G0/G1 phase of cell cycle. The anti-proliferative EEPpg seems also to be associated with increased apoptosis of lymphocytes after stimulation with Con A, with a statistically significant increase in the percentage of dead cells by apoptosis at higher concentrations. The EEPpg inhibited the expansion of Mac-1 + cells induced by AFC in the spleen but not in the peritoneum. This suggests an inhibitory effect on cell migration by EEPpg into arthritic joints. These results help to validate the popular use of *P. polygalaeflorus* against diseases related to inflammatory and immune disorders, especially rheumatoid arthritis, never shown before.

Keywords: Sucupira. *Pterodon polygalaeflorus*. Inflammation. Rheumatoid Arthritis. Apoptosis. Myelopoiesis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Pterodon polygalaeflorus</i> Benth e seus frutos.....	28
Figura 2	Sinais cardinais da inflamação.....	30
Figura 3	Eventos celulares: etapas da cascata de adesão leucocitária.....	33
Figura 4	Vias extrínseca e intrínseca da apoptose.....	47
Figura 5	Patogênese da artrite reumatóide com base na visão unificada das diversas hipóteses geradas para a gênese e desenvolvimento da doença.....	51
Figura 6	Patogênese da artrite induzida por colágeno.....	58
Figura 7	Análise por cromatografia em camada delgada (TLC) do EEPpg.....	71
Figura 8	Cromatogramas do EEPpg obtidos por HPLC em coluna C18 monitorada em 254 e 220 nm.....	73
Figura 9	Cromatograma do EEPpg por GC/MS.....	75
Figura 10	Visualização do edema das patas dos camundongos DBA/1J com CIA e tratados com EEPpg.....	76
Figura 11	Efeito do EEPpg sobre (A) o desenvolvimento e (B) a severidade de escore clínico da CIA.....	77
Figura 12	Análise histológica da pata de camundongo DBA/1J sadio.....	79
Figura 13	Análise histopatológica da pata de camundongo com CIA.....	80
Figura 14	Análise histológica das patas de camundongos DBA/1J com CIA tratados ou não com EEPpg.....	82
Figura 15	Avaliação do efeito do EEPpg sobre os leucócitos totais do sangue de camundongos com CIA.....	85
Figura 16	Avaliação do efeito do EEPpg sobre os tipos de leucócitos do sangue de camundongos com CIA.....	86
Figura 17	Atividade anti-proliferativa do EEPpg sobre esplenócitos de camundongos DBA/1J.....	88
Figura 18	Análise citofluorimétrica do ciclo celular de esplenócitos murinos estimulados com Con A na presença de EEPpg.....	89
Figura 19	Análise do número de esplenócitos de camundongos DBA/1J machos estimulados com Con A e na presença de EEPpg nas fases S + G2/M.....	91

Figura 20	Efeito do EEPpg na apoptose de esplenócitos estimulados por 48 h com Con A, por marcação com anexina V- FITC e PI.....	92
Figura 21	Análise citofluorimétrica do tamanho e granulosidade de esplenócitos de camundongos da linhagem C57Bl/6 machos do modelo de mielopoiese induzida por AFC.....	94
Figura 22	Análise citofluorimétrica do percentual de esplenócitos Mac-1 <sup>+</sup> nos camundongos da linhagem C57Bl/6 machos do modelo de mielopoiese induzida por AFC.....	95
Figura 23	Efeito do AFC na indução da mielopoiese de células Mac-1 <sup>+</sup> entre os esplenócitos.....	96
Figura 24	Efeito do EEPpg na mielopoiese induzida por AFC no baço de camundongos DBA/1J.....	98
Figura 25	Efeito do EEPpg sobre o percentual de células mieloides Mac-1 <sup>+</sup> no peritônio de camundongos injetados com AFC.....	95

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de Rf do extrato etanólico de <i>Pterodon polygalaeflorus</i> obtidos por TLC em sílica gel 60.....	71
Tabela 2	Tempo de retenção dos picos principais dos cromatogramas do EEPpg obtidos por HPLC monitorada a 220 e 254 nm relativos à Figura 8.....	74
Tabela 3	Nome e Tr dos compostos identificados no EEPpg por GC/MS.....	75
Tabela 4	Peso absoluto e relativo de órgãos de camundongos DBA/1J sadios, ou com CIA (após 49 dias) tratados oralmente com etanol 15% (CIA) ou com EEPpg.....	83
Tabela 5	Percentual de leucócitos no sangue dos camundongos DBA/1J sadios ou com CIA (após 50 dias) tratados com EtOH 15% ou EEPpg.....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
AINES	Antiinflamatórias não-esteroidais
ACPA	Anticorpo contra peptídeo citrulinado
AFC	Adjuvante completo de Freund
Ag	Antígeno
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	Fator de transcrição ativador 1
Apaf-1	Fator apoptótico ativador de protease-1
DNMT	DNA metiltransferase
APCs	Células apresentadoras de antígeno
AR	Artrite Reumatóide
BAX	Proteína X associada a BCL-2
BLyS	Ligante estimulador de linfócito B
BIM	Mediador de morte celular que interage com BCL-2
CAM	Medicina Alternativa e Complementar.
cFLIP	Proteína inibidora celular semelhante a FLICE
CIA	Artrite induzida por colágeno
CII	Colágeno II
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
DA	Doenças autoimunes
DISC	Complexo sinalizador indutor de morte
DMARDs	Drogas modificadores da doença
DNMT	DNA metiltransferase
EEPpg	Extrato etanólico de <i>Pterodon polygalaeflorus</i>
EOPp	Extrato oleoso de <i>Pterodon pubescens</i>
EHPp	Extrato hidroalcoólico de <i>Pterodon pubescens</i>
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FDA	Food and Drug Administration
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa

GM-CSF	Fator estimulador de colônia granulócito-macrófago
HLA	Antígeno leucocitário humano
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IA	Índice de artrite
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
ICAM-2	Molécula de adesão intercelular 2
IgE	Imunoglobulina E
IgG2a	Imunoglobulina G2a
IL	Interleucina
INF- $\alpha$	Interferon alfa
INF- $\beta$	Interferon beta
INF- $\gamma$	Interferon gama
i.p	Intraperitonal
JAM-A	Molécula de adesão juncional A
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
LTD <sub>4</sub>	Leucotrieno D <sub>4</sub>
LTE <sub>4</sub>	Leucotrieno E <sub>4</sub>
Mac-1	Molécula de adesão celular 1
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Maior
MAP	Proteína ativada por mitógeno
MMP	Metaloproteinase de matriz
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear $\kappa$ B
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NKT	Células T <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
NLR	Receptor intracelular do tipo NOD ( <i>NOD-like receptor</i> )
OMG	Organização Mundial de Saúde
OPp	Óleo de <i>Pterodon pubescens</i>
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos

PECAM-1	Molécula de adesão plaqueta-célula endotelial 1
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RANKL	Ligante do receptor ativador do NF- $\kappa$ B
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RE	Resoluções específicas
Rf	Mobilidade relativa ao solvente ( <i>rate flow</i> )
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SIRC	Reposta inflamatória sistêmica
tBID	BID truncada.
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformante beta
T <sub>H</sub>	Linfócitos T helper
TLC	Cromatografia em camada delgada
TLRs	Receptores do tipo Toll ( <i>Toll-like receptors</i> )
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TNF-R1	Receptor do fator de necrose tumoral
T <sub>r</sub>	Tempo de retenção
Tregs	Células T reguladoras
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
UV	Ultravioleta
VCAM-1	Molécula de adesão vascular 1
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
v.o.	Via oral
WHO	World Health Organization



## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
1	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
1.1	<b>Produtos Naturais: plantas Medicinais</b> .....	20
1.1.1	<u>Histórico</u> .....	20
1.1.2	<u>Plantas medicinais como agentes terapêuticos ou fitoterápicos</u> .....	21
1.2	<b>Gênero Pterodon</b> .....	25
1.2.1	<u><i>Pterodon polygalaeforus</i> Bentham</u> .....	27
1.3	<b>Inflamação</b> .....	29
1.3.1	<u>Inflamação aguda</u> .....	31
1.3.1.1	Eventos vasculares.....	32
1.3.1.2	Eventos celulares.....	33
1.3.2	<u>Inflamação crônica</u> .....	35
1.3.3	<u>Mediadores inflamatórios</u> .....	36
1.4	<b>Sistema imune</b> .....	38
1.4.1	<u>Sistema imune inato</u> .....	38
1.4.2	<u>Sistema imune adaptativo</u> .....	40
1.5	<b>Células da resposta imune</b> .....	41
1.5.1	<u>Neutrófilos</u> .....	41
1.5.2	<u>Macrófagos</u> .....	41
1.5.3	<u>Linfócitos</u> .....	43
1.6	<b>Apoptose no sistema imune</b> .....	44
1.7	<b>Doenças auto-ímmunes</b> .....	46
1.8	<b>Artrite reumatóide</b> .....	48
1.8.1	<u>A patogênese da AR</u> .....	50
1.8.2	<u>Imunologia da AR</u> .....	52
1.8.3	<u>Tratamento da AR</u> .....	54
1.9	<b>Artrite induzida por colágeno</b> .....	55
2	<b>MATERIAL</b> .....	59
2.1	<b>Produto natural</b> .....	59

2.2	<b>Animais.....</b>	59
2.3	<b>Material descartável e outros.....</b>	59
2.4	<b>Reagentes, soluções e anticorpos e outros.....</b>	60
2.5	<b>Equipamentos.....</b>	61
3	<b>MÉTODOS.....</b>	62
3.1	<b>Preparo do extrato etanólico de <i>Pterodon polygalaeiflorus</i>.....</b>	62
3.2	<b>Rendimento.....</b>	62
3.3	<b>Análise do EEPpg por cromatografia em camada delgada (TLC).....</b>	62
3.4	<b>Análise do EEPpg por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fotodiodo (HPLC-DAD).....</b>	63
3.5	<b>Análise do EEPpg por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC/MS).....</b>	64
3.6	<b>Estudo do efeito antiartrítico do EEPpg.....</b>	64
3.6.1	<u>Modelo de artrite induzida por colágeno (CIA).....</u>	64
3.6.2	<u>Tratamento com EEPpg dos camundongos com CIA.....</u>	65
3.6.3	<u>Contagem de células do sangue.....</u>	65
3.6.4	<u>Análise histopatologia das patas dos animais com CIA.....</u>	66
3.7	<b>Ensaio de proliferação de esplenócitos.....</b>	66
3.8	<b>Análise do ciclo celular.....</b>	67
3.9	<b>Avaliação do nível de apoptose - Anexina V e PI.....</b>	68
3.10	<b>Modelo de mielopoiese induzida por adjuvante completo de Freund (AFC).....</b>	68
3.11	<b>Avaliação do efeito do EEPpg sobre a mielopoiese número de células Mac-1<sup>+</sup> no baço e no peritônio após injeção com AFC.....</b>	69
3.12	<b>Análise estática.....</b>	69
4	<b>RESULTADOS.....</b>	70
4.1	<b>Rendimento do EEPpg.....</b>	70
4.2	<b>Caracterização fitoquímica do EEPpg.....</b>	70
4.2.1	<u>Análise por cromatografia em camada delgada do EEPpg.....</u>	70
4.2.2	<u>Análise do perfil cromatográfico do EEPpg por HPLC-DAD e GC-MS...</u>	72
4.3	<b>Estudo do efeito do EEPpg sobre a artrite induzida por colágeno.....</b>	72
4.3.1	<u>Efeito do EEPpg sobre o desenvolvimento e a severidade da CIA.....</u>	72

4.3.2	<u>Efeito do EEPpg sobre alterações histopatológicas das patas dos camundongos com CIA.....</u>	78
4.3.3	<u>Efeito subagudo do EEPpg sobre o peso dos órgãos de camundongos com CIA.....</u>	81
4.3.4	<u>Efeito do EEPpg sobre o número de leucócitos totais no sangue de camundongos com CIA.....</u>	84
4.4	<b>Efeito do EEPpg sobre a proliferação <i>in vitro</i> de esplenócitos de camundongos DBA/1J machos induzida por diferentes mitógenos.....</b>	84
4.5	<b>Efeito do EEPpg sobre o ciclo celular.....</b>	87
4.6	<b>Efeito do EEPpg sobre a apoptose.....</b>	90
4.7	<b>Efeito do EEPpg sobre o número de células Mac-1<sup>+</sup> no baço e no peritônio de camundongos DBA/1J após injeção com AFC.....</b>	93
4.7.1	<u>Modelo de mielopoiese induzida por adjuvante completo de Freund.....</u>	93
4.7.2	<u>Efeito do tratamento com EEPpg sobre a expansão de células Mac-1<sup>+</sup> induzida por AFC.....</u>	97
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	100
6	<b>CONCLUSÕES.....</b>	111
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	113

## INTRODUÇÃO

A inflamação é um mecanismo fisiológico, cuja principal função é resolver um processo infeccioso ou reparar um dano tecidual e retornar ao estado homeostático do organismo. Logo, a resposta inflamatória ideal deve ser rápida, específica e autolimitada (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Barton, 2008). O excesso de resposta, entretanto, pode conduzir ao desenvolvimento de uma inflamação patológica, que está relacionada à perda da tolerância e/ou de processos regulatórios, que em excesso, podem levar a danos irreversíveis ao tecido e ao desenvolvimento de doenças (Calder *et al.*, 2009).

A artrite reumatoide é uma doença autoimune sistêmica que tem como principais alvos as articulações, causando artrite inflamatória (Lorenzo, 2007). A inflamação crônica e exarcebada leva ao dano articular, além de outras doenças co-existentes, principalmente no sistema cardiovascular e destruição óssea, incapacitando os indivíduos que a possuem, acompanhado de crescente declínio sócio-econômico. Desta forma, a artrite reumatóide é uma doença de importância social (McInnes e O'Dell, 2010).

A artrite reumatoide é uma doença sem cura. Vários medicamentos tem sido utilizados a fim de minimizar os sintomas e melhorar a doença, porém efeitos restritos, os diversos efeitos colaterais e também o alto custo dessas terapias tornam seu uso limitado (Scott *et al.*, 2010). Com base nisso, novas formas de terapia tornam-se fundamentais. O estudo de produtos naturais, incluindo as plantas, tem mostrado que estes podem ser importantes “minas de ouro” no tratamento da artrite reumatoide, através da modulação das respostas inflamatórias (Khanna *et al.*, 2007). Nessa dissertação o efeito artrítico do extrato etanólico de *Pterodon polygalaeiflorus* e alguns dos mecanismos de ação da planta foram estudados. A *Pterodon polygalaeiflorus* pertence ao gênero *Pterodon*, cujas plantas deste gênero tem como principal uso pela população brasileira no tratamento da artrite (Pio Corrêa, 1984; Sabino, 1995). Estudos realizados anteriormente em nosso laboratório (LIA-BPPN, UERJ) demonstraram uma ação antiartrítica do extrato hidroalcoólico dos frutos de *Pterodon pubescens* (EHPp) em modelo de artrite experimental (Sabino *et al.*, 1999<sup>a</sup>). Desse modo, demonstrar a existência de um efeito antiartrítico de *Pterodon polygalaeiflorus* e/ou de efeitos sobre componentes da resposta imune e inflamatória torna-se de grande relevância, tanto do ponto de vista etnofarmacológico e principalmente do ponto de vista terapêutico.

Sendo assim, o objetivo geral desta dissertação foi avaliar o potencial antiartritogênico do extrato etanólico de *Pterodon polygalaeiflorus* através do modelo de artrite induzida por colágeno (CIA) e seu mecanismo de ação e os objetivos específicos foram:

- Avaliar as alterações bioquímicas e morfológicas da CIA através de métodos histoquímicos.
- Avaliar o efeito anti-proliferativo do extrato etanólico de *Pterodon polygalaeflorus* sobre cultura de esplenócitos murinos.
- Avaliar o efeito do extrato etanólico de *Pterodon polygalaeflorus* sobre o ciclo celular e na indução de morte celular por apoptose em esplenócitos murinos;
- Estudar o efeito do extrato etanólico de *Pterodon polygalaeflorus* sobre a expansão de células Mac-1<sup>+</sup> induzida por adjuvante de Freund completo.

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Produtos Naturais: plantas medicinais

#### 1.1.1 Histórico

Ao longo dos séculos, os seres humanos têm contado com a natureza para suas necessidades básicas na produção de alimentos, abrigos, roupas, meios de transporte, fertilizantes, aromas e fragrâncias, e não menos importante, os medicamentos (Gurib-Fakim, 2006).

Desde os primórdios da civilização há uma preocupação constante da população pela procura de tratamento das principais doenças que acometem a humanidade. Isto é facilmente comprovado pelos inúmeros registros encontrados nas primeiras civilizações que habitaram a terra. Basicamente, os recursos terapêuticos utilizados pelos nossos ancestrais concentravam-se notadamente nas plantas, animais e minerais (Calixto e Siqueira Jr., 2008).

A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque as civilizações Egípcia, Greco-romana e Chinesa (Viegas Jr. e Bolzani, 2006). É provável que o profundo conhecimento de plantas medicinais em culturas tradicionais foi desenvolvido através de tentativas e erros durante muitos séculos, e as mais importantes curas foram cuidadosamente transmitidas oralmente de uma geração para outra. Embora algumas das propriedades terapêuticas atribuídas às plantas tenham sido provadas como erradas, a terapia com plantas medicinais é baseada nos resultados empíricos de centenas e milhares de anos (Gurib-Fakim, 2006). Há registros do uso de plantas medicinais, como a papoula (*Papaver somniferum*), maconha (*Cannabis sativa*), babosa (*Aloe vera*), dentre outras, há milhares de anos antes de Cristo (Calixto e Siqueira Jr., 2008).

A Revolução Industrial e o desenvolvimento da Química Orgânica resultaram na preferência por produtos sintéticos para tratamentos farmacológicos devido à fácil obtenção de compostos puros, que após modificações estruturais puderam produzir drogas mais ativas e seguras. Consequentemente, nas sociedades ocidentais industrializadas passou-se a considerar o uso de drogas a partir de recursos naturais como uma opção para pessoas de baixa educação ou baixa renda ou simplesmente como uma superstição religiosa sem valor farmacológico (Rates, 2001).

No século XIX iniciou-se, efetivamente, a procura pelos princípios ativos presentes nas plantas medicinais, criando assim os primeiros medicamentos com as características que se conhece atualmente (Calixto e Siqueira Jr., 2008).

Antes da Segunda Guerra Mundial, já no século XX, uma série de produtos naturais isolados de plantas passou a ser utilizado clinicamente e ainda é usado nos dias de hoje. Como exemplos, a quinina (da casca de *Cinchona*), a morfina e a codeína (do látex da papoula), a digoxina (de folhas de *Digitalis*), atropina e hioscina (de espécies de *Solanaceae*) ainda são utilizadas atualmente. Outro exemplo é a penicilina, produto natural derivado de fungos, usada antes e durante a Segunda Guerra Mundial e ainda utilizada nos dias de hoje devido aos seus efeitos antibacterianos (Rates, 2001; Phillipson, 2001).

Desde 1977, a Organização Mundial de Saúde (OMS), tem então incentivado o estudo de plantas tradicionais com a esperança na obtenção de benefícios a partir de seus compostos (Corrêa *et al.*, 2003).

### 1.1.2 Plantas medicinais como agentes terapêuticos ou fitoterápicos

Plantas medicinais têm desempenhado importante função na saúde mundial, a despeito dos grandes avanços na medicina moderna. Encontram-se distribuídas pelo mundo, mas são mais abundantes nos países tropicais.

Análise de novas drogas aprovadas pela FDA (Food and Drug Administration, USA) de 1981 a 2002 revelou que os produtos naturais continuaram a desempenhar um papel fundamental durante este período (Newman *et al.*, 2003). Aproximadamente 25-30% de todas as drogas disponíveis como terapêuticas são derivadas direta ou indiretamente de produtos naturais (plantas, micróbios e animais) (Clardy e Walsh, 2004).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002), cerca de dois terços a três quartos da população mundial, principalmente nos países em desenvolvimento, devido à pobreza e carência de acesso à medicina moderna, ainda depende essencialmente das plantas medicinais para seus cuidados de saúde primários. Assim sendo, muitas plantas têm sido cientificamente estudadas para avaliar sua qualidade, segurança e eficácia (Calixto, 2005).

A Fitoterapia tem como objetivo prevenir, atenuar ou curar um estado patológico a partir da utilização de produtos de origem vegetal e vem sendo cada vez mais utilizada como alternativa terapêutica nestes últimos anos. Simultaneamente, observa-se um grande avanço científico envolvendo estudos químicos e farmacológicos das plantas medicinais, visando o isolamento de novos compostos com propriedades terapêuticas (Phillipson, 2001), mas

também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 1998). Este avanço vem sendo demonstrado pelo aumento do número de trabalhos produzidos nesta área, tanto apresentados em congressos como publicados em periódicos, nacionais e internacionais (Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Revista Brasileira de Farmacognosia, Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Química Nova, Revista Brasileira de Farmácia e Memórias do Instituto Oswaldo Cruz).

As plantas medicinais apresentam grande potencial para uso como agentes farmacêuticos (Balunas e Kinghorn, 2005). Os extratos de plantas são tipicamente constituídos por uma mistura de compostos químicos que podem agir individualmente, aditivamente ou em sinergismo para melhorar a saúde, podendo uma única planta conter substâncias que estimulam a digestão, outros compostos que são anti-inflamatórios, capazes de reduzir edemas e dor, compostos fenólicos que podem agir como antioxidante, taninos antibacterianos e antifúngicos, substâncias diuréticas e toxinas e alcaloides que melhoram o humor e dão uma sensação de bem-estar (Gurib-Fakim, 2006).

Em geral, estimam-se que haja aproximadamente 320 mil espécies de plantas superiores no mundo (Lewinsohn e Prado, 2005), sendo que aproximadamente 10 mil têm uso medicinal documentado.

Diversas evidências suportam os benefícios potenciais dos extratos de plantas à saúde, como atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacteriana, analgésica e antitumoral (McKay e Blumberg, 2006). Em alguns casos particulares, tais como drogas antitumorais e antimicrobianas, cerca de 60% dos medicamentos atualmente disponíveis no mercado e a maioria daqueles em estágios finais de testes clínicos são derivadas de produtos naturais, principalmente de plantas superiores (Newman *et al.*, 2003).

O uso de plantas medicinais como agentes terapêuticos tem ultrapassado os limites da tradicionalidade. Além da tradição no uso de plantas medicinais nos países em desenvolvimento, alguns países desenvolvidos, como Alemanha, França, Itália e Estados Unidos, também fazem uso de medicamentos provenientes de plantas e existem regulamentações adequadas para o registro dos medicamentos existentes (Eisenberg *et al.*, 1993; Fisher e Ward, 1994; Brevoort, 1995; Grünwald, 1995; Brevoort, 1996; Roberts e Tyler, 1998, Blumenthal *et al.* 1998; Blumenthal, 1999).

O mercado mundial de fitoterápicos cresce gradativamente, com maior destaque nos países desenvolvidos devido ao aprimoramento da tecnologia farmacêutica nesta área, com moderna tecnologia de fracionamento, identificação e quantificação de compostos químicos,



permitindo um melhor controle de qualidade de fármacos, e tornando possível a fabricação de fitofármacos mais seguros, eficazes e de efeito totalmente reprodutivo (Cechinel Filho *et al.*, 2001). Estima-se que o mercado mundial de medicamentos fitoterápicos já atinja mais de 20 bilhões de dólares (Carvalho *et al.*, 2008). Mais especificamente, na medicina ocidental (EUA, Europa ocidental, etc.), verifica-se que cerca de 150 – 200 agentes terapêuticos provenientes de plantas estão documentados. Esta ainda é uma porcentagem pequena perto da quantidade de plantas superiores. Sendo assim, ainda existem muitas descobertas importantes a serem exploradas no reino vegetal para aplicação farmacêutica (McChesney *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas, tem-se observado um aumento do interesse das grandes companhias farmacêuticas na investigação de plantas superiores, visando à descoberta de estruturas novas e também o desenvolvimento de fitoterápicos padronizados com comprovada eficácia, segurança e qualidade (Editorial, 1994; De Smet, 1997). Associado a isso, muitos avanços significativos na ciência e na indústria têm ocorrido com objetivo de capturar o valor dos produtos naturais, promovendo um incentivo em pesquisas de produtos naturais (Gomord *et al.*, 2005; Brown e Newman, 2006; Fullbeck *et al.*, 2006). Talvez o mais forte impulso para o desenvolvimento de novos produtos naturais é o avanço da tecnologia de bioensaio durante os últimos anos (Piggot, 2004; Littleton *et al.*, 2005; Potterat, 2006; Rollinger *et al.*, 2006). Além, também, dos avanços na tecnologia de separações e elucidação estrutural, através de metodologias de cromatografia de alta performance (Foucault, 1995), tecnologias de alta resolução em espectrometria de massa (Deng e Sanyal, 2006) e espectrometria de alto campo de ressonância magnética nuclear (Croasmun e Carlson, 1994; Claridge, 1999), entre diversas outras metodologias.

A maior compreensão das vias biológicas e fisiológicas e os avanços na biotecnologia também têm contribuído para o desenvolvimento de medicamentos mais específicos e seletivos em relação à aplicabilidade (McChesney *et al.*, 2007).

Além disso, a globalização da economia mundial serve como um estimulante para o desenvolvimento farmacêutico. A descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos são capazes de manter a posição competitiva de uma determinada indústria. Isso tem levado ao interesse em pesquisas de produtos naturais como uma forma de aumentar a eficiência de descoberta e desenvolvimento (Vuorela, 2004).

Agentes fitoterápicos são normalmente comercializados como preparações padronizadas em forma líquida, sólida ou viscosa, preparadas por maceração, percolação ou destilação em água ou em outros solventes (Schulz *et al.* 1996).

As vantagens que justificam o uso de fitoterápicos incluem: 1) efeitos sinérgicos, pois as plantas possuem vários compostos com efeitos similares, aumentando o efeito dos mesmos, podendo o sinergismo ocorrer através do mesmo mecanismo de ação ou por mecanismos diferentes; 2) associação de mecanismos por compostos agindo em alvos moleculares diferentes; 3) menor custo em pesquisa (Yunes e Calixto, 2001).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo compreendendo 20-22% do total de espécies de plantas superiores do planeta. Em função disso e, sobretudo pela tradição do uso de plantas medicinais pela população brasileira, há um enorme interesse dos pesquisadores brasileiros em estudar as propriedades medicinais das plantas e, mais recentemente, das indústrias farmacêuticas, interessada em desenvolver novos medicamentos (Calixto e Siqueira Jr., 2008).

Apesar disso, nosso país não possui uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos, ficando atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente. Nossa política não contribui de forma efetiva para a pesquisa científica de produtos naturais como em países da Europa e Ásia, que mesmo possuindo uma biodiversidade significativamente menor do que a brasileira, possuem um sistema político que dá um enorme apoio às pesquisas científicas.

Embora o Brasil possua a maior diversidade vegetal do mundo, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas (Prance, 1977), apenas 8% foram estudadas para pesquisas de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (Guerra e Nodari, 2001).

No Brasil, embora não existam dados oficialmente atualizados, estima-se que o mercado de fitoterápicos movimente 160 milhões de dólares anualmente (Carvalho *et al.*, 2008).

O principal órgão responsável pela regulamentação de plantas medicinais e seus derivados no Brasil é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde, que tem como papel proteger e promover a saúde da população garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços e participando da construção do seu acesso (Brasil, 1999). Isso inclui o registro de medicamentos, etapa na qual os medicamentos são avaliados quanto a sua segurança, eficácia e qualidade antes de serem expostos à venda para utilização pela população (Carvalho *et al.*, 2008). A Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 48/2004 é a regulamentação em vigor para registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil, que determina aspectos essenciais ao registro, como identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade e provas de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas. Ainda existem mais quatro Resoluções específicas (RE): RE 88/2004

– Listas de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos; RE 88/2004 – Lista de registro simplificado de fitoterápicos; RE 90/2004 – Guia para a realização dos testes de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos; RE 91/2004 – Guia para realização de inclusões, notificações e cancelamento pós-registro de fitoterápicos (Brasil, 2004<sup>a, b, c, d, e</sup>).

O Brasil também possui uma política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos aprovada por meio do Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que estabelece diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações voltadas à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil, ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como ao fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos, ao uso sustentável da biodiversidade brasileira e ao desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde (Brasil, 2006).

Extratos de plantas são amplamente utilizados na medicina popular para tratamento de processos inflamatórios e afecções imunes e diversos estudos científicos têm validado os efeitos de extratos de plantas sobre componentes do processo inflamatório e do sistema imune (Cardoso *et al.*, 2008; Dutra *et al.*, 2009; Chen, 2010; Ramadan *et al.*, 2010).

## 1.2 Gênero *Pterodon*

O gênero *Pterodon*, pertence à família das Papilionáceas e inclui cinco espécies nativas do Brasil: *P. pubescens* Benth., *P. emarginatus* Vog., *P. polygalaeflorus* Benth., *P. apparicioi* Pedersoli e *P. abruptus* Benth. (Mors *et al.*, 1966; Pedersoli, 1970; Fascio *et al.*, 1976).

Seus frutos são livremente comercializados em mercados da flora medicinal, usados devido suas propriedades farmacológicas (Evangelista *et al.*, 2007). Infusões hidroalcoólicas de seus frutos são utilizadas na medicina popular por suas propriedades antirreumática, analgésica e anti-inflamatória, bem como no combate a hemorragias, fraqueza orgânica, doenças do estômago e úlceras (Coimbra, 1942; Cruz, 1965).

O principal uso popular está relacionado ao efeito antiartrítico que parece se encontrar na fração oleosa desses frutos (Coimbra, 1942; Penna, 1946; Pio Corrêa, 1984; Sabino, 1995). As cascas são amargas e adstringentes, sendo utilizadas no tratamento de diarreias crônicas e diabetes. E também são utilizadas como tônicas, depurativas, e digestivas.

Estudos fitoquímicos do gênero *Pterodon*, mostram a presença de compostos alcaloides na casca (Torrenegra *et al.*, 1989); isoflavonas e alguns triterpenos na madeira (Marques *et al.*, 1998), diterpenos (Fascio *et al.*, 1976; Arriaga *et al.*, 2000), isoflavonas

(Braz-Filho e Gottlieb, 1971) e sequeiterpenos (Mors *et al.*, 1966; Neto, 1976) no óleo do fruto.

As investigações das espécies do gênero *Pterodon* foram iniciadas em 1967 (Mors *et al.*, 1967) através do isolamento da molécula 14,15-epoxigeranilgeraniol do óleo essencial do fruto de *P. pubescens* que provou ser um eficiente agente quimioprolifático na esquistossomose. Em seguida, foram isolados diterpenoides (Mahjan e Monteiro, 1970; Mahjan e Monteiro, 1973) e isoflavonas (Braz-Filho e Gottlieb, 1971), e terpenos (Fascio *et al.*, 1970) do óleo de *P. emarginatus* e *P. pubescens*, respectivamente. Em 1973, achados sobre a ação cercaricida do óleo do fruto de *P. pubescens* (Mahjan e Monteiro, 1973) e também das outras quatro espécies (Fascio *et al.*, 1976), em adição a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo obtido de *P. pubescens* (Neto, 1973) motivaram os estudos com as espécies do gênero *Pterodon*.

Algumas das propriedades farmacológicas das espécies de *Pterodon* conhecidas popularmente têm sido comprovadas cientificamente e seus efeitos biológicos têm sido estudados simultaneamente com a caracterização química. Das cinco espécies do gênero, apenas *P. polygalaeflorus*, *P. pubescens* e *P. emarginatus* foram estudadas farmacologicamente.

Efeitos analgésicos e anti-inflamatórios de *Pterodon pubescens* foram comprovados. O extrato oleoso de frutos de *P. pubescens* (EOPp) e suas frações exibiram atividade analgésica em modelos de formalina e contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos. No modelo de contorção o EOPp e as frações 1 (PF1) e 2 (PF2) tiveram efeito analgésico significativo. No modelo de formalina, PF1 e PF2 tiveram efeito analgésico em doses baixas, porém, através de mecanismos diferentes. A PF1 inibiu ambas as fases e a PF2 inibiu principalmente a segunda fase do processo de nocicepção, demonstrando, então, um efeito periférico e/ou central das frações (Coelho *et al.*, 2005). As frações obtidas com hexano e diclorometano também demonstraram efeito analgésico (Coelho *et al.*, 2005). Além disso, o geranilgeraniol e compostos derivados do vouacapano (metil éster 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ -dihydroxivouacapan-17 $\beta$ -oato) isolados do extrato bruto de *P. pubescens* também demonstraram atividade analgésica em diversos modelos experimentais (Spindola *et al.*, 2010).

Nosso laboratório (LIA-BPPN, UERJ) demonstrou uma ação antiartrítica do extrato hidroalcoólico dos frutos de *Pterodon pubescens* (EHPp) em camundongos da linhagem DBA/1J com artrite induzida por colágeno tipo II (CIA). O tratamento diário via oral (v.o.) reduziu 60% da severidade da CIA (Sabino *et al.*, 1999a), além de afetar a produção de

anticorpos anti-CII. O tratamento com EHPp também diminui a contagem absoluta de células T CD4 ativadas, mas não interferiu sobre o número de células T CD8 ativadas. Esta informação é de grande importância visto que a CIA é mediada principalmente por células T CD4 (Dalmau *et al.*, 1999). A avaliação histopatológica das patas dos animais com CIA mostrou um grande infiltrado inflamatório com predominância de neutrófilos polimorfonucleares, áreas de fratura e neoformação óssea. O tratamento com EHPp mostrou um tecido conjuntivo livre de células inflamatórias nas patas dos animais tratados (Sabino *et al.*, 1999a; Coelho *et al.*, 2004).

Sabino e colaboradores (1999b) demonstraram ausência de atividade mutagênica e ausência de toxicidade aguda do EOPp em camundongos machos da linhagem DBA/1J, mesmo quando testado em doses muito maiores do que a utilizada na medicina popular. O extrato etanólico (oleoso) de *P. pubescens* também foi capaz de exercer atividade anti-edematogênica aguda e tópica quando testado no modelo de edema de pata induzido por carragenina e edema de orelha induzido por óleo de cróton (Silva *et al.*, 2004), respectivamente.

Compostos isolados de *P. polygalaeiflorus* e *P. pubescens* também exerceram atividade anti-proliferativa em células cancerígenas (Vieira *et al.*, 2008; Euzébio *et al.*, 2009; Euzébio *et al.*, 2010). Estudos em nosso laboratório mostraram que o óleo de *P. pubescens* (OPp) foi capaz de inibir a proliferação *in vitro* das células leucêmicas K562 através da indução da apoptose dessas células. A síntese de DNA foi inibida significativamente pelo OPp em  $23 \pm 3,8\%$  com  $30 \mu\text{g/mL}$ , induzindo um acúmulo de células na fase G1 do ciclo, em relação ao controle (Pereira *et al.*, 2010). Pereira e colaboradores (2011) também mostraram o efeito indutor da apoptose da subfração terpenica de *P. pubescens* em células leucêmicas K562 através da modulação da expressão de genes envolvidos no processo de apoptose, fator apoptótico ativador de protease-1 (Apaf-1) e DNA metiltransferase (DNMT).

Estudos com *P. emarginatus* tem demonstrado a presença de compostos fenólicos e a atividade antioxidante desses compostos (Dutra *et al.*, 2008) e do extrato hexânico (Paula *et al.*, 2005), além dos efeitos anti-ulcerogênico e anti-inflamatório de suas sementes (Carvalho *et al.*, 1999; Dutra *et al.*, 2009).

### 1.2.1 *Pterodon polygalaeiflorus* Bentham

*Pterodon polygalaeiflorus* Benth., conhecida popularmente como sucupira-branca, é uma árvore aromática (Figura 1) que atinge de 8-18 metros de altura (Lorenzi e Matos, 2002).

Diversos diterpenos e furano diterpenos foram isolados e identificados dos extratos obtidos dos frutos de *P. polygalaeflorus*, como os diterpenoides furanos 6 $\alpha$ -hidroxivouacapano-7 $\beta$ ,17 $\beta$ -lactona, ácido 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxivouacapano-17 $\beta$ -óico e metil 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxivouacapano-17 $\beta$ -oato. Esses compostos mostraram atividade antinociceptiva em modelos experimentais em roedores (Demuner *et al.*, 1996; Duarte *et al.*, 1996). O furano diterpeno 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ -dihidroxivouacapano-17-oato, isolado do óleo do fruto de *P. polygalaeflorus*, exibiu atividade anti-inflamatória no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos (250  $\mu$ mol/kg) inibindo 24% do edema por via oral (v.o.) e 45 % por via intraperitoneal (i.p) e efeitos analgésicos no modelo de contorção abdominal em camundongos, tendo a dose 200  $\mu$ mol/kg reduzido 43% das contrações abdominais (Duarte *et al.*, 1992; Almeida, 1993). Modificações químicas do composto podem torná-lo tanto anti-inflamatório quanto pró-inflamatório como mostrado por Nunan e colaboradores (1982).



Figura 1 – *Pterodon polygalaeflorus* Benthian e seus frutos  
Fonte: [www.flickr.com](http://www.flickr.com)

Estudos envolvendo derivados do ácido 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ -dihidroxivouacapano-17- $\beta$ -óico mostraram o envolvimento de peptídeos opioides (Duarte *et al.*, 1992) e catecolaminas (Duarte *et al.*, 1996) no mecanismo de ação analgésica. Estudos *in vitro* mostraram que esses derivados são capazes de inibir contrações do íleo de cobaias induzidas por estimulação elétrica por um mecanismo ainda não esclarecido, mas que pode estar relacionado com a ativação de receptores opioides ou 2 $\alpha$ -noradrenérgicos (Belinelo *et al.*, 2002), sugerindo que os compostos de *P. polygalaeflorus* podem ter uma ação direta sobre tecidos musculares lisos. O extrato etanólico dos frutos de *P. polygalaeflorus* apresentou efeito larvicida significativo

sobre o mosquito *Aedes aegypti* (De Omena *et al.*, 2006). Leal e colaboradores (2000) demonstraram os efeitos analgésico, anti-inflamatório e broncodilatador do extrato hidroalcoólico dos frutos de *P. polygalaeflorus* nos modelos de edema de pata induzido por carragenina e dextrano para avaliação da atividade anti-inflamatória e no modelo de formalina e contorção induzida por ácido acético para avaliação do efeito analgésico. O extrato foi capaz de inibir 55% das contorções induzidas por ácido acético, bem como inibir 68% da fase II no modelo de formalina. E no modelo de inflamação *P. polygalaeflorus* mostrou inibição de 68% do edema de pata. Doses de tratamento variaram entre 100-200 mg/kg.

Apesar de todos os trabalhos realizados com as espécies do gênero *Pterodon*, ainda sabe-se pouco sobre os efeitos anti-inflamatórios de *P. polygalaeflorus* tanto na resposta inflamatória aguda e principalmente na resposta inflamatória crônica.

### 1.3 Inflamação

A primeira defesa do organismo a um dano tecidual é a resposta inflamatória (Cruvinel *et al.*, 2010). A inflamação é definida como uma resposta à infecção, desafio antigênico ou injúria tecidual que é designada a erradicar microrganismos ou irritantes e pontencializar o reparo tecidual (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

A infecção por microrganismos, a injúria tecidual ou o trauma cirúrgico levam a liberação de mediadores químicos endógenos e exógenos que por sua vez, dão origem aos primeiros sinais cardinais da inflamação: vermelhidão (rubor), edema (tumor), calor (aplicável apenas às extremidades do corpo) e dor (Serhan, *et al.*, 2008). Esses sinais, além do quinto sinal, perda da função (*functio laesa*), foram caracterizados por nossos ancestrais, baseados na observação visual da inflamação. Os quatro primeiros destes sinais foram nomeados por Celsus na Roma antiga (30-38 a. C.) e o último por Galeno (130-200 d. C.) (Hurley, 1972).

Os mediadores exógenos incluem peptídeos microbianos que atuam como quimioatraentes para o recrutamento de neutrófilos. Estes, por sua vez, fagocitam e destroem microrganismos e debris celulares através da produção de espécies reativas de oxigênio e enzimas degradativas, que ao escaparem para o meio extracelular provocam dano tecidual local e amplificam os sinais inflamatórios agudos dentro de minutos a horas.



Figura 2 – Sinais cardinais da inflamação. Fonte: [www.patofisio.wordpress.com](http://www.patofisio.wordpress.com)

Os mediadores químicos endógenos incluem os eicosanoides (como prostaglandina  $E_2$  e leucotrieno  $B_4$ ) e componentes do complemento (como  $C5a$ ). Esses mediadores são liberados pelas células infiltradas no sítio inflamatório, mas também podem levar inadvertidamente ao dano tecidual (Serhan, *et al.*, 2008).

A inflamação pode ser classificada em quatro tipos: (1) inflamação causada por imunidade inata e adaptativa contra agentes infecciosos através da ativação celular e liberação de mediadores a fim de prevenir ou combater a infecção e remover o material estranho; (2) inflamação causada por diferentes agentes inalados ('irritantes') como partículas da exaustão do diesel, ozônio e endotoxinas; (3) inflamação alérgica onde anticorpos IgE específicos associados aos mastócitos se ligam aos alérgenos e em consequência disso, ocorre uma liberação imediata de mediadores inflamatórios e ativação de células inflamatórias; (4) inflamação neurogênica, mediada pelo sistema neural; podendo ocorrer simultaneamente esses mecanismos ou parte deles (Calder *et al.*, 2009). A resposta inflamatória pode, entretanto, também ser estimulada em casos de mau funcionamento ou estresse do tecido. Esse tipo de resposta inflamatória é mais comum, porém ocorre em menor magnitude que as respostas inflamatórias clássicas induzidas por infecção e injúria (Medzhitov, 2008).

O processo inflamatório é um mecanismo fisiológico, porém em excesso pode levar ao risco de resposta inflamatória sistêmica (SIRC), falência múltipla dos órgãos e até a morte. A principal função da inflamação é resolver a infecção ou reparar o dano e retornar ao estado de homeostasia. Logo, a resposta inflamatória ideal deve ser rápida e, se necessário, destrutiva além de específica e autolimitada (Barton, 2008). Logo, mecanismos de auto-regulação do



processo inflamatório, que incluem secreção de citocinas anti-inflamatórias, inibição de cascatas de sinalização pró-inflamatórias, liberação de receptores para mediadores inflamatórios e ativação de células reguladoras são ativadas. A inflamação patológica envolve a perda da tolerância e/ou de processos regulatórios, que quando em excesso, podem levar a danos irreversíveis ao tecido hospedeiro e a doenças (Calder *et al.*, 2009). A importância desse equilíbrio é demonstrada em certas infecções crônicas e desordens inflamatórias onde a resposta inflamatória causa mais dano ao hospedeiro que ao microrganismo em si (Segal *et al.*, 2000; Nathan, 2002).

A inflamação pode ser dividida em duas categorias principais, baseado no tempo e em suas características patológicas: inflamação aguda e inflamação crônica (Quadro 1). Durante ambos os processos, uma variedade de fatores solúveis estão envolvidos no recrutamento de leucócitos através do aumento da expressão de moléculas de adesão e quimioatração. Muitos desses fatores regulam a ativação de células residentes (como fibroblastos, células endoteliais, macrófagos teciduais e mastócitos) e o recrutamento de células inflamatórias (como monócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos). Outros resultam em respostas sistêmicas do processo inflamatório (por exemplo, febre, hipotensão, síntese de proteínas de fase aguda) (Feghali e Wright, 1997). Esses fatores solúveis que medeiam estas respostas incluem: (1) metabólitos lipídicos solúveis, como o fator ativador plaquetário (PAF) e derivados do metabolismo do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas); (2) três cascatas de substrato/ proteases solúveis (cascata do complemento, de cininas e de coagulação) que geram numerosos peptídeos pró-inflamatórios; (3) o óxido nítrico; e (4) as citocinas, que orquestram a resposta inflamatória (Feghali e Wright, 1997) e as quimiocinas que tem função na quimiotaxia de leucócitos (Viola e Luster, 2008).

### 1.3.1 Inflamação aguda

A inflamação aguda tem duração relativamente curta (horas a dias) e é caracterizada por vasodilatação, exsudação de líquido rico em proteínas plasmáticas (exsudato), que leva a formação de edema, e por recrutamento e ativação de leucócitos, principalmente granulócitos polimorfonucleares seguido por monócitos que se diferenciam localmente em macrófagos (Splettstoesser e Schuff-Werner, 2002; Carraway *et al.*, 2003; Levi e van der Poll, 2005; Lawrence e Gilroy, 2006). Na inflamação aguda predominam elementos da resposta imune inata (Abbas, 2007). Ela pode ser dividida em eventos vasculares e celulares.

Características dos processos inflamatórios agudo e crônico.	Inflamação Aguda	Inflamação Crônica
<b>Agente causal</b>	Patógenos orgânicos, radiação ionizante, agentes químicos, trauma mecânico.	Persistência do estímulo inflamatório inicial
<b>Células envolvidas</b>	Neutrófilos, monócitos, macrófagos, mastócitos	Macrófagos, linfócitos, fibroblastos
<b>Mediadores primários</b>	Aminas vasoativas, eicosanoides, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio	INF- $\gamma$ , citocinas, fatores de crescimento, enzimas hidrolíticas
<b>Início</b>	Imediato	Tardio
<b>Duração</b>	Poucos dias	Meses ou anos
<b>Evolução</b>	Cicatrização com restituição integrada, formação de abscesso ou cronificação	Destruição tecidual e fibrose

Quadro 1. Características dos processos inflamatórios, agudo e crônico.  
Fonte: Cruvinel *et al.*, 2010, adaptado.

### 1.3.1.1 Eventos vasculares

Os eventos vasculares caracterizam-se por vasodilatação arteriolar local e aumento da permeabilidade vascular, resultando na formação de edema (Cruvinel, *et al.*, 2010).

A vasodilatação é característica clássica da inflamação aguda. É clinicamente caracterizada por vermelhidão e calor e ocorre a fim de facilitar a entrega local de mediadores solúveis e células inflamatórias. A vasodilatação é mediada pela ação do óxido nítrico e prostaglandinas vasodilatadoras (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Kumar *et al.*, 2007).

O aumento da permeabilidade vascular é induzido por mediadores inflamatórios como histamina, bradicinina, leucotrienos, componentes do sistema complemento, substância P e fator ativador plaquetário (PAF) (Denzlinger, 1985; Friedl, 1989) que levam ao fluxo de líquido rico em proteínas do interior do vaso sanguíneo para o interstício e consequente formação do edema, através de alterações nas funções de barreira dos pequenos vasos sanguíneos e aumento da permeabilidade dos capilares e vênulas a água e proteínas (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Kumar *et al.*, 2007).

### 1.3.1.2 Eventos celulares

Os eventos celulares são caracterizados pela marginalização, adesão e migração dos leucócitos para o sítio inflamatório, onde ocorre a fagocitose de agentes patogênicos, destruição de bactérias e outros microrganismos, degradação de tecido necrótico e de antígenos estranhos. Os primeiros leucócitos a chegarem ao local da inflamação ou infecção são os neutrófilos (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). Os leucócitos também podem prolongar a inflamação e induzir lesão tecidual ao liberarem enzimas, mediadores químicos e radicais livres de oxigênio (Kumar *et al.*, 2007).

A cascata de adesão leucocitária refere-se aos eventos envolvidos na migração dos leucócitos do sangue para o sítio inflamatório. Diversos estudos (Laudanna *et al.*, 2002; Muller, 2003; Imhof e Aurrand-Lions, 2004; Kinashi, 2005) têm levado a expansão da versão original de três etapas (rolamento, adesão e transmigração), para uma versão incluindo, rolamento lento, adesão forte, rastejamento intraluminal, migração paracelular e migração transcelular (Ley *et al.*, 2007).

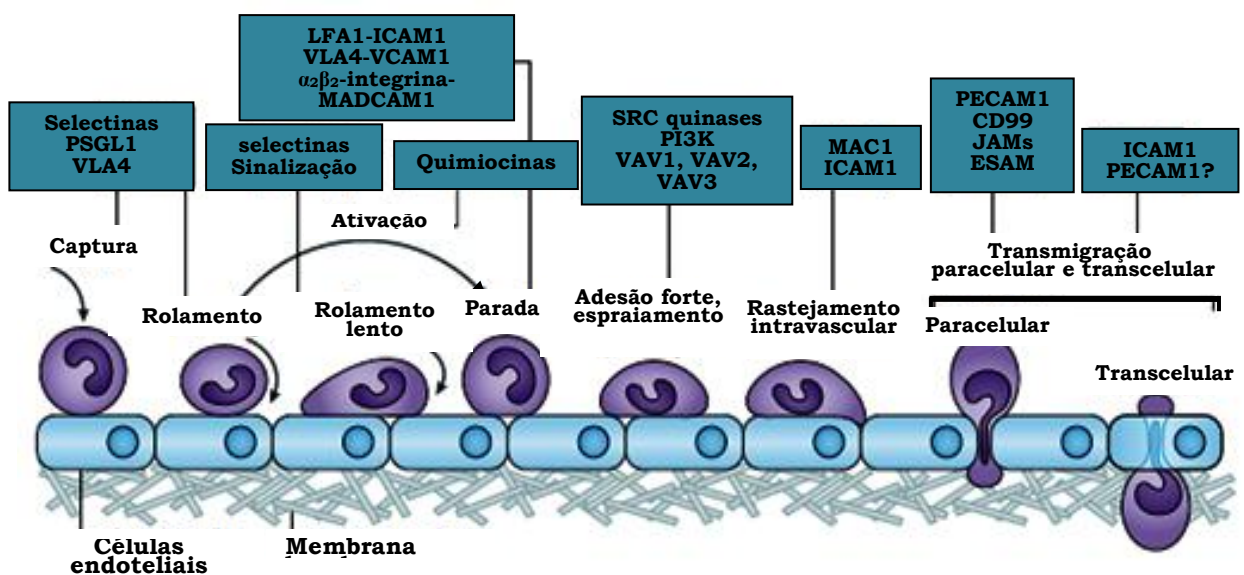


Figura 3 – Eventos celulares: etapas da cascata de adesão leucocitária.

Fonte: Ley *et al.*, 2007, traduzido.

O processo da adesão e a transmigração de leucócitos são determinados principalmente por moléculas de adesão presentes na superfície dos leucócitos e das células endoteliais, por fatores quimiotáticos (como, IL-8, MCP-1), e por certas citocinas que

regulam a expressão na superfície celular e a intensidade de adesão destas moléculas (Laudanna *et al.*, 2002; Muller, 2003; Imhof e Aurrand-Lions, 2004; Kumar *et al.*, 2007).

O rolamento dos leucócitos é mediado pelas selectinas e seus ligantes, que incluem as L-selectinas, expressas pela maioria dos leucócitos, E-selectinas, expressas pelas células endoteliais ativadas e P-selectinas, expressas em plaquetas ativadas e também em células endoteliais ativadas (Ley *et al.*, 2007). O rolamento dos leucócitos resulta da interação de baixa afinidade entre os leucócitos e as células endoteliais (Garrood *et al.*, 2006). Outras moléculas de adesão celular podem atuar como mediadores do rolamento de leucócitos independente das selectinas, como a glicoproteína transmembrana tipo I (CD44), que é expressa numa forma ativada por subgrupos de linfócitos ativados (Ponta *et al.*, 2003).

As integrinas também participam do rolamento de leucócitos e medeiam a adesão firme dos leucócitos ao endotélio inflamado (Ley *et al.*, 2007). Como ligantes das integrinas tem-se os componentes da matriz extracelular ou contra receptores específicos (Danen e Sonnenberg, 2003). As integrinas têm diversas funções envolvidas na regulação do sistema imune, na organização tecidual e na sinalização celular (Danen e Sonnenberg, 2003; Schmidt e Friedl, 2010). No Quadro 2 são mostradas integrinas identificadas como particularmente importantes na migração de leucócitos.

Integrina	Subunidades	Expressão	Ligantes
LFA-1, CD11A/CD18	$\alpha_1\beta_2$	Monócitos, neutrófilos, células T, macrófagos, células dendríticas	ICAM-1, -2, -3
Mac-1, CD11b/CD18	$\alpha_M\beta_2$	Monócitos, neutrófilos, células NK	ICAM-1, iC3b, Fator X Fibrinogênio
P150, 95, CR4 CD11c/Cd18	$\alpha_x\beta_2$	Monócitos, células NK, neutrófilos, subgrupos de células T e B	ICAM-1 iC3b, fibrinogênio
VLA-4, CD 49d/CD29	$\alpha_4\beta_1$	Células T e B, monócitos	VCAM-1, MAdCAM-1, fibronectina
LPAM-1	$\alpha_4\beta_7$	Células T e B	VCAM-1, MAdCAM-1

ICAM, molecular adesão intracelular; LFA-1, antígeno funcional de leucócito; LPAM-1, molécula de adesão dos linfócitos da placa de Peyers 1; MAdCAM-1, molécula de adesão dirigida a mucosa 1; VCAM, molécula de adesão vascular 1, VLA-4, antígeno de ativação muito tardio-4.

Quadro 2 – Integrinas de leucócitos e seus ligantes endoteliais.

Fonte: Garrod *et al.*, 2006, traduzido.

As integrinas mais relevantes para a adesão leucocitária pertencem às subfamílias integrina- $\beta_1$  e integrina  $\beta_2$ . A integrina CD11b/CD18 ou Mac-1 é uma integrina  $\beta_2$  expressa principalmente em células mieloides (granulócitos e monócitos), mas também é encontrada em células T (Fagerholm *et al.*, 2006). Esta integrina está envolvida na fagocitose, adesão a ICAM-1 e migração através do endotélio, bem como outras funções como regulação da apoptose e desgranulação (Springer, 1990; Gahmberg, 1997). A integrina Mac-1 tem um grande repertório de ligantes que inclui o fibrinogênio (Wright *et al.*, 1988), ligantes de molécula 1 e 2 de adesão intercelular (ICAM-1 e ICAM-2) (Diamond *et al.*, 1990; Xie *et al.*, 1995), a proteína do sistema complemento iC3b (Beller *et al.* 1982), colágeno (Walzog *et al.*, 1995) e a metaloproteinase de matriz, MMP9 (Stefanidakis *et al.*, 2003).

A transmigração através das paredes venulares é o último passo no processo da emigração de leucócitos para os tecidos inflamados. A transmigração ocorre como resultado da interação entre as integrinas dos leucócitos e seus ligantes em células endoteliais, como ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, JAM-A, entre outras (Ley *et al.*, 2007). Esse processo tem a membrana basal como o último obstáculo para a completa evasão dos leucócitos para o sítio inflamatório e os mecanismos pelos quais os leucócitos passam pela membrana basal parecem estar associados a regiões com menor expressão de certos constituintes da membrana basal endotelial (como laminina-10 e colágeno IV), o que parece favorecer a passagem de neutrófilos (Wang *et al.*, 2006) e células T (Sixt *et al.*, 2001), além da interação entre integrinas leucocitárias e componentes da membrana basal, como a fibrina, a fibronectina (Cruvinel *et al.*, 2010), laminina (Dangerfield *et al.*, 2002), e a enzima elastase (Wang, *et al.*, 2005).

### 1.3.2 Inflamação crônica

Se a inflamação aguda não for resolvida completamente com a remoção do estímulo nocivo ou se houverem falhas nos mecanismos de resolução, esta pode evoluir para inflamação crônica (Lawrence e Gilroy, 2006). A inflamação crônica tem duração prolongada (semanas a meses ou anos). É caracterizada por inflamação ativa e destruição tecidual e tentativa de reparo ao mesmo tempo, além de infiltração de células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), proliferação de vasos sanguíneos e fibrose. Podem surgir infecções persistentes, exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos e reação imune contra antígeno (Ag). Doenças inflamatórias crônicas incluem artrite reumatoide, lúpus

eritematoso sistêmico, silicose, aterosclerose e doença inflamatória intestinal (Davies *et al.*, 2003; Liew, 2003; Libby, 2007; Cruvinel *et al.*, 2010).

### 1.3.3 Mediadores inflamatórios

Diversos mediadores de origem, características químicas e funções diferentes são importantes na regulação da resposta inflamatória.

O **óxido nítrico** (NO) provoca dilatação dos vasos sanguíneos (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004), suprime a agregação plaquetária, regula a migração leucocitária e adesão celular ao endotélio, atenua a migração e a proliferação celular da musculatura lisa vascular, inativa/ inibe a expressão de certas moléculas de adesão e influencia na produção do ânion superóxido (Vallance e Chan, 2001). Espécies reativas geradas a partir de NO atuam como agentes antimicrobianos e sua produção exagerada pode levar ao dano tecidual e pode levar a apoptose dependente de caspases (Vallance e Chan, 2001; Kumar *et al.*, 2007; Gao, 2010).

As **aminas vasoativas** incluem a histamina e a serotonina. A histamina possui ação vasodilatadora arteriolar e aumenta a permeabilidade venular, promovendo o extravasamento de líquido inflamatório para o tecido inflamado, sendo também constritora das artérias de grande calibre (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Kumar *et al.*, 2007). A serotonina (5-HT) também aumenta a permeabilidade vascular (Kumar *et al.*, 2007).

**Os eicosanóides** formam uma família de metabólitos oxidados do ácido araquidônico, que incluem prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX), leucotrienos e lipoxinas. As PG e TX são formados por ação de enzimas da via da ciclooxigenase, a ciclooxigenase-1 (COX-1), constitutivamente expressa, e ciclooxigenase-2 (COX-2) que é induzida durante a inflamação, e sintetases específicas. Pela via das lipooxigenases, através das enzimas 5-lipooxigenase, 12/15 lipooxinogenase, leucotrieno A<sub>4</sub> hidrolase e leucotrieno C<sub>4</sub> sintase, são produzidos várias classes de leucotrienos e lipoxinas (Haeggström *et al.*, 2010).

A COX-2 é um potencial alvo terapêutico. Drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (AINES) específicas para COX-2, conhecidas como coxibs, tem sido amplamente prescrita para dor inflamatória associada à artrite reumatoide e osteoartrite (Haeggström *et al.*, 2010).

As prostaglandinas estão envolvidas na vasodilatação e na formação de edema, na promoção da febre e na inibição da agregação plaquetária. O tromboxano A<sub>2</sub>, ao contrário, é vasoconstrictor e facilita a agregação plaquetária (Narumiya, 2009). Os leucotrienos estão envolvidos na promoção e as lipoxinas na resolução do processo inflamatório (Hersberger, 2010). O leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) é um quimioatraente de leucócitos e está envolvido no

aumento do rolamento e na adesão ao endotélio, seguindo por migração transendotelial. Também estimula a secreção do ânion superóxido e a liberação de diferentes constituintes dos grânulos dos leucócitos (Hafstrom, 1981; Rae e Smith, 1981; Funk, 2001). Os leucotrienos cisteinil (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>) aumentam a permeabilidade vascular (Di Gennaro *et al.*, 2009) e são potentes broncoconstritores, sendo importantes durante a patogênese da asma (Funk, 2005; Dahlen, 2006; Fal e Kopeck, 2010).

**O PAF** é também um mediador derivado dos fosfolipídios de membrana e estimula a agregação plaquetária, tem ação bronco-constritora e, em concentrações muito altas, estimula a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular. Também estimula adesão leucocitária, quimiotaxia, desgranulação e estresse oxidativo (Yost *et al.*, 2010).

Três cascatas de proteases influenciam os eventos da resposta inflamatória: cascata do complemento, cascata das cininas e cascata de coagulação. A **cascata do complemento ou sistema complemento** é dividida em três vias: clássica, alternativa e das lectinas. Estas vias promovem a inflamação e a destruição microbiana, através da quimioatração de neutrófilos, opsonização e fagocitose de microrganismos e formação do complexo proteolítico com componentes do sistema complemento, que provoca a ruptura da membrana celular microbiana, levando conseqüentemente à morte (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Zipfel, 2009). A **cascata das cininas ou sistema calicreína-cinina** culmina na produção de bradicinina, que exerce várias funções, dentre elas, a produção de dor inflamatória (Ueno e Oh-ishi, 2003). As cininas parecem também estar envolvidas na vasodilatação, no aumento da permeabilidade vascular, extravasamento do plasma e migração celular (Hall e Morton, 1997; Marceau e Bachvarov, 1998). A **cascata de coagulação** é constituída por duas vias: a via extrínseca (via do fator tecidual-fator VIIa) e a via intrínseca (sistema de contato) (Macfarlane, 1964; Davie e Ratnoff, 1964; Levi *et al.*, 2003) que culminam na gênese da enzima trombina, que, por proteólise, converte o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel (Franco, 2001). Do ponto de vista fisiológico da coagulação e da limitação em modelos *in vivo*, a cascata de coagulação tem sido dividida em três fases: iniciação, amplificação e propagação (Becker, 2005), como mostrado na Figura 4.

As **citocinas** são polipeptídios que atuam como reguladores das reações inflamatórias e imunes e são os principais determinantes da produção do infiltrado inflamatório, do estado de ativação celular e das respostas sistêmicas a inflamação (Feghali e Wrigth, 2001; Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). São sintetizadas por diversos tipos celulares, dentre eles os fibroblastos residentes, células endoteliais e epiteliais, células dendríticas, NK (*natural killer*), linfócitos T, sendo que monócitos/macrófagos são seus maiores produtores (Sherwood

e Toliver-Kinsky, 2004). As **quimiocinas** constituem uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas, responsáveis pela movimentação dos leucócitos, inclusive sua migração para locais de inflamação tecidual a partir do sangue (Kunkel e Butcher, 2002; Locati *et al.*, 2005). As citocinas contribuem para a resposta imune adaptativa e/ou patogênese de várias doenças ao ser crucial na migração de células mononucleares pelo corpo e para os tecidos (Cyster, 1999; Rossi e Zlotnik, 2000).

## 1.4 Sistema imune

O sistema imune desempenha importante função na proteção do hospedeiro de uma infinidade de organismos patogênicos, além de ajudar na remoção de substâncias tóxicas e alérgicas que penetram através das mucosas. O sistema imune deve ter a habilidade de eliminar o patógeno invasor, a toxina ou o alérgeno e, além disso, diferenciar o próprio do não próprio. Existem dois mecanismos imunes envolvidos na detecção e eliminação dos patógenos microbianos: a imunidade inata e a imunidade adaptativa (Chaplin, 2010).

### 1.4.1 Sistema imune inato

A imunidade inata é uma resposta rápida e estereotipada a um grande, porém limitado número de estímulos. Este sistema está preparado para agir rapidamente após invasão por patógeno ou toxina, constituindo, dessa forma, a primeira resposta do hospedeiro. É representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis. A resposta inata inclui proteínas solúveis e moléculas bioativas presentes no fluido biológico (como proteínas do complemento) ou que são liberadas por células ativadas (incluindo citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos, espécies reativas de oxigênio, aminas biotivas e certas enzimas). Contudo, características da resposta inflamatória aguda, como aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação e infiltração celular, também fazem parte da imunidade inata (Medzhitov e Janeway, 2000; Barton, 2008; Chaplin, 2010).

As principais células envolvidas na resposta imune inata são os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer*, que estão envolvidas na fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, síntese de proteínas de fase aguda, citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-15, IL-18, e quimiocinas (Delves e Roitt, 2000; Cruvinel *et al.*, 2010).



Os receptores da resposta imune inata são limitados quanto a sua especificidade, reconhecendo “alvos” conservados evolutivamente. Esses padrões moleculares incluem os lipopolissacarídeos, resíduos de manose, proteínas derivadas de aldeído encontrados em patógenos, e são chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs).

Os PAMPs são reconhecidos por diferentes receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), dentre eles os receptores NOD-like (NLR) e *Toll-like* (TLRs) (Janeway e Medzhitov, 2002; Barton, 2008). Esses receptores estão envolvidos na opsonização, ativação do sistema complemento, fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio, e liberação de citocinas, autacoides e mediadores lipídicos, através da ativação de fatores de transcrição que ativam genes pró-inflamatórios (Wright, 1999; Takeda, 2005; Barton, 2008). Dentre os PRRs, os TLRs são os melhores caracterizados e se destacam por seu papel central na ligação a patógeno e iniciação das respostas inflamatória e imune. Estão presentes principalmente em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Barton, 2008; Crunivel *et al.*, 2010). Dentre os ligantes dos TLRs, encontra-se o lipopolissacarídeo (LPS) (TLR4), peptidoglicano e zimosan (TLR2), além de RNA de fita simples (TLR7 e 8) e fita dupla (TLR3) (Barton, 2008).

A resposta imune inata exerce duas principais funções: a ativação da cascata inflamatória, a fim de conter a infecção, e a ativação do sistema imune adaptativo (Barton, 2008). A ativação via TLR gera condições favoráveis para a ativação de células que ainda não entraram em contato com qualquer antígeno (células T *naive*). As células apresentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas) reconhecem o antígeno e o drenam para os nódulos linfoides, onde as células T são ativadas. A resposta imune inata ainda fornece o segundo sinal necessário para iniciar a proliferação e diferenciação de linfócitos T e B antígenos-específicos (Harris e Ronchese, 1999) e influenciam na natureza da resposta imune adaptativa em função do tipo de microrganismo que infecta o hospedeiro. Em infecções por microrganismos intracelulares, estes são fagocitados e processados pelos macrófagos, estes expressam moléculas co-estimulatórias e secretam citocinas como IL-12, as quais vão ativar a resposta imune adaptativa mediada por linfócitos. Os microrganismos extracelulares que atingem o sangue, ativam o sistema complemento que vai levar à estimulação da produção de anticorpos (Acs) por linfócitos B. Microrganismos extracelulares também estimulam a secreção de TNF- $\alpha$ , quimiocinas e IL-1 por macrófagos (Abbas *et al.*, 2007).

### 1.4.2 Sistema imune adaptativo

A resposta imune adaptativa é uma resposta biológica altamente sofisticada, envolvendo anticorpos e receptores de células T, como sistemas de reconhecimento de patógenos com alto padrão de mutação e replicação intracelular (Moser e Leo, 2010). Depende da ativação de células especializadas, os linfócitos (citotóxicos, auxiliares, células B, plasmócitos), além das células apresentadoras de antígeno (APCs), que são responsáveis pela sua ativação dos linfócitos através da apresentação de antígenos associados a moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) (Cruvinel *et al.*, 2010). As APCs retiram o antígeno de tecidos periféricos e o entrega aos linfócitos, no linfonodo ou no baço, através da linfa ou do sangue, respectivamente, para que sejam reconhecidos (Medzhitov, 2007).

Uma característica importante da resposta imune adaptativa é o desenvolvimento de células em estado aparentemente dormente, que após contato com antígeno específico pode re-expressar suas funções efectoras (Chaplin, 2010).

As principais características da resposta imune adaptativa são: especificidade e diversidade de reconhecimento, memória especializada de resposta, autolimitação e tolerância a componentes próprios do organismo (Delves e Roitt, 2000). Pode ser dividida em três fases: reconhecimento do antígeno pelo linfócito, ativação e fase efectora (Abbas *et al.*, 2007).

A resposta imune adaptativa pode ser do tipo humoral, quando é mediada por anticorpos produzidos por linfócitos B, ou celular, quando é mediada por linfócitos T (Abbas *et al.*, 2007). Os antígenos extracelulares são reconhecidos por imunoglobulinas associadas à membrana dos linfócitos B (receptor de célula B ou BCR), que quando ativados, se diferenciam em células produtoras de anticorpos específicos àquele antígeno. Já os antígenos intracelulares são processados e reconhecidos pelos receptores de células T (TCR) (Moser, 2010).

Após a eliminação do patógeno, o sistema imune entra no processo de homeostase, com a morte dos linfócitos antígenos-específicos por apoptose (Holtzman *et al.*, 2000) e manutenção de células de memória, que são responsáveis pela resposta imune secundária, mais rápida e mais intensa, ao antígeno em caso de novo contato do organismo com o mesmo (Jenkins *et al.*, 2001).

## 1.5 Células da resposta imune

### 1.5.1 Neutrófilos

Os neutrófilos representam a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos invasores, sendo, portanto, importantes na resposta imune inata (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Produtos bacterianos, citocinas e quimiocinas (TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-8 e INF- $\gamma$ ) são responsáveis pela mobilização e ativação dessas células, que adquirem funções a fim de eliminar o patógeno, através da fagocitose (Wright *et al.*, 2010). Os neutrófilos possuem em seus grânulos diversas proteases e produzem espécies reativas de oxigênio para rapidamente matar o patógeno fagocitado. Essas moléculas, porém, são capazes de causar dano ao tecido hospedeiro, como é observado em doenças autoimunes, após a liberação dessas moléculas tóxicas por neutrófilos ativados inapropriadamente. Neutrófilos quiescentes no sangue periférico possuem tempo de vida muito curto (12-18 h). Após a ativação ocorre uma extensão no tempo de vida e alteração de suas propriedades moleculares, como apoptose retardada, síntese de mediadores pró-inflamatórios e a habilidade de apresentar antígenos as células T (Wright *et al.*, 2010). Os neutrófilos apresentam antígenos via MHC classe II, estimulando a ativação e proliferação de linfócitos T (Gosselin *et al.*, 1993). As citocinas secretadas por neutrófilos ativados incluem a IL-8, IL-1, IL-1RA, IL-6, IL-12, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , que ativam outros neutrófilos e outras células do sistema imune (células dendríticas, macrófagos e linfócitos). Além de secretar ligante estimulador de linfócito B (BLyS) que dirige a proliferação e maturação de células B (Scapini *et al.*, 2005) e IFN- $\gamma$  que participa na ativação de macrófagos e na diferenciação de linfócitos T (Ethuin *et al.*, 2004). Os neutrófilos também produzem leucotrienos e prostaglandinas, principalmente LTB<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub>. LTB<sub>4</sub> é quimioatraente de neutrófilo e promove adesão e migração através do aumento da expressão da integrina Mac-1, já a PGE<sub>2</sub> exibe um efeito anti-inflamatório nos neutrófilos, diminuindo a atividade da NADPH oxidase e diminuindo os níveis de adesão endotelial e quimiotaxia (Hecker *et al.*, 1990).

### 1.5.2 Macrófagos

Macrófagos são células fagocíticas residentes de tecidos linfoides ou não linfoides, originadas a partir da diferenciação dos monócitos. Estão envolvidos na homeostase do

tecido, através do *clearance* de células apoptóticas e produção de fatores de crescimento (Geissmann *et al.*, 2010), além de possuírem várias funções tróficas (Pollard, 2009). Os macrófagos possuem funções tanto na imunidade inata (fagocitose de patógenos e debris celulares) quanto na imunidade adaptativa (processamento e apresentação de antígeno via MHC) (Abbas, 2007). Na resposta imune e inflamatória, os macrófagos atuam como APCs e potencializam a ativação de linfócitos B e T pela expressão de moléculas co-estimuladoras e liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e quimiocinas, além de ROS e NO. Os macrófagos também podem em certas infecções, como aquelas por *Mycobacterium tuberculosis*, que são resistentes a ação microbicida do macrófago, se tornar grandes e multinucleados e junto aos linfócitos e fibroblastos, formarem os granulomas, a fim de impedir a disseminação do patógeno (Cruvinel *et al.*, 2010). Os macrófagos são altamente versáteis e plásticos dependendo da exposição a sinais microambientais. As citocinas e produtos microbianos são responsáveis por afetar a função especializada e polarizada dos fagócitos mononucleares. Os macrófagos são divididos em dois tipos: macrófago M1 e M2. O INF- $\gamma$  e/ou LPS ou outras citocinas, como TNF- $\alpha$  e GM-CSF, estão envolvidos na polarização do tipo M1 dos macrófagos ou ativação clássica do macrófago (Hamilton, 2002). Macrófagos M1 são caracterizados por alta capacidade de apresentação de antígeno, alta produção de IL-12 e IL-23 (Verreck *et al.*, 2004), além de outras citocinas e consequente ativação de resposta T<sub>H1</sub> e alta produção de intermediários tóxicos, como NO e intermediários reativos de oxigênio (ROI). Medeiam também a resistência contra parasitas intracelulares e tumores. Outras formas de ativação de macrófagos que não correspondem à ativação clássica M1, são chamadas genericamente como ativação alternativa ou M2. Os macrófagos M2 são ativados através da exposição a IL-4 ou IL-13, imunocomplexos, IL-10, glicocorticoides, hormônios corticosteroides, activina A ou IL-21. Macrófagos M2 são caracterizados pela alta produção de IL-10, capacidade de produção de citocinas pró-inflamatórias na presença de determinados estímulos, como na presença de LPS, estão envolvidos também no reparo tecidual, estimulando fibroblastos e promovendo a deposição de matriz extracelular e promovem a resposta T<sub>H2</sub> (Mantovani *et al.*, 2004; Gordon and Taylor, 2005; Gallina *et al.*, 2006; Mantovani *et al.*, 2007; Mosser and Edwards, 2008).

Os macrófagos, devido as suas funções imunológicas e de reparo, e a desregulação dessas atividades, encontram-se envolvidos em muitas doenças, como na artrite reumatoide (Pollard, 2009).

### 1.5.3 Linfócitos

Os linfócitos B, T e células NK são formados a partir de precursores linfóides na medula óssea (Mesquita-Junior *et al.*, 2010). Os linfócitos medeiam o reconhecimento de antígenos na imunidade adaptativa através de receptores de antígenos: receptor de célula B (imunoglobulinas) e receptor de célula T (TCR). Esses receptores são gerados a partir da recombinação somática de segmentos de genes, que leva a formação de um repertório altamente variável de receptores de antígeno, porém cada receptor é altamente específico (Medzhitov, 2000; Chaplin, 2010).

Existem dois tipos de células T: T-helper ( $T_H$ ) ou  $T\ CD4^+$  (chamada assim, devido à expressão do co-receptor CD4); e as células T citotóxicas ou  $T\ CD8^+$  (que expressa CD8). Essas células reconhecem peptídeos antigênicos que se encontram ligados ao MHC classe II e classe I, respectivamente. A diferenciação dos linfócitos nos tipos celulares efetores e a localização destes no sítio de infecção são reguladas pela ação de citocinas e quimiocinas, respectivamente, geradas pelo sistema imune inato (Medzhitov, 2007). As células  $T_H$  podem se diferenciar em células  $T_{H1}$  e  $T_{H2}$  (Medzhitov, 2007). A resposta  $T_{H1}$  está associada a infecções intracelulares e sua principal função é promover a fagocitose mediada por imunidade antimicrobiana (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). Dentre as diversas citocinas secretadas pelas células  $T_{H1}$ , está o  $INF-\gamma$ , que causa a ativação de macrófagos e estimula a função citolítica das células  $T\ CD8^+$ . O  $INF-\gamma$  também estimula células B a produzirem anticorpos IgG2a opsonizantes e ligantes de complemento (Libby, 2007; Medzhitov, 2007). A IL-12 secretada pelas células dendríticas e macrófagos promove a diferenciação de linfócitos T *naive* em um fenótipo  $T_{H1}$  (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). A resposta  $T_{H2}$  está relacionada à patógenos extracelulares. A diferenciação em células  $T_{H2}$  é induzida por IL-4, através da ativação do fator de transcrição STAT 6. As células  $T_{H2}$  estimulam a imunidade humoral pela produção de diversas citocinas (como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). Essas citocinas estimulam a maturação de células B em células plasmáticas produtoras de anticorpos (plasmócitos) e promovem a ligação entre células B a fim de aumentar a produção de anticorpos IgE. As células  $T_{H2}$  podem recrutar e ativar mastócitos, outros efetores da resposta alérgica, que estão relacionados com uma variedade de estados de doença, contribuindo na inflamação crônica (Libby, 2007). As células  $T_{H2}$  são importantes na resolução da inflamação, pois produzem citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4, IL-10 e IL-13 (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Libby, 2007).

As células  $T_H$  também podem se diferenciar em outras células efetoras, como  $T_H17$  e T reguladoras (Tregs). As células  $T_H17$  produzem IL-17 que promove o recrutamento de neutrófilos e monócitos através de mediadores quimioatraentes como IL-8 e proteína quimioatraente de neutrófilo e promove a maturação e o crescimento de células mieloides recrutadas. Além disso, a IL-17 estimula a produção de IL-6, óxido nítrico e  $PGE_2$ , pode atuar em sinergismo com citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e ligante de CD40, conduzindo a expressão de genes e amplificando a resposta inflamatória (Afzali *et al.*, 2007). As células Tregs, por sua vez, têm a capacidade de inibir a proliferação e produção de citocinas pelas células T, estando envolvidas no controle da tolerância periférica. As Tregs produzem fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e IL-10. O TGF- $\beta$  suprime as funções das células  $T_H1$  e  $T_H2$ , macrófagos, células NK e células B (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Afzali *et al.*, 2007; Vignali *et al.*, 2008). A citocina IL-17 e as células Treg parecem estar envolvidas de maneira mutuamente exclusiva na promoção e no desenvolvimento de doenças autoimunes, como na artrite reumatoide, tendo a IL-17 contribuindo com suas funções pró-inflamatórias e as células Tregs com propriedades anti-inflamatórias (Afzali *et al.*, 2007).

## 1.6 Apoptose no sistema imune

A remoção de células danosas, danificadas, defeituosas ou supérfluas é crítica para o desenvolvimento normal e homeostase tecidual em organismos multicelulares (Vaux e Strasser, 1996) e em geral, a morte dessas células ocorre por apoptose (Rastogi *et al.*, 2009)). O termo apoptose refere-se a um processo dependente de energia, iniciado por diversos estímulos intracelulares e extracelulares, como radiação ultravioleta, estresse oxidativo e agentes químicos genotóxicos, no qual as células vivas participam de sua própria morte de maneira eficiente e organizada, contrariando ao processo “desorganizado” da morte celular por necrose, (Huerta *et al.*, 2007, Rastogi *et al.*, 2009). A apoptose é um processo crucial dentro dos sistemas biológicos e é considerado como um componente imperativo de vários processos incluindo a renovação celular normal, o bom desenvolvimento e funcionamento do sistema imunológico, a multiplicação dos cromossomos mutados, atrofia dependente de hormônios, o desenvolvimento embrionário normal, a eliminação de células que impedem a manutenção da homeostase (Reed & Tomaselli, 2000; Elmore, 2007). Danos ao DNA e produção de lesões predominantes, como resultado da radiação ultravioleta (RUV), radiações

ionizantes (RI), estresse oxidativo, da replicação ou erros de recombinação, bem como de compostos genotóxicos ambientais e terapêuticos são uns dos principais fatores desencadeantes de apoptose (Nagata, 1997; Norbury e Zivotovsky, 2004; Batista *et al.*, 2009).

A apoptose é caracterizada morfologicamente e biologicamente por prolongamentos da membrana plasmática, exposição de fosfatidilserina para a superfície, condensação do núcleo, fragmentação do DNA internucleossomal, e fagocitose dos corpos apoptóticos por células vizinhas (Hengartner, 2000; Savill e Fadok, 2000).

As vias extrínseca(ou receptor de morte) e intrínseca tem sido bem descritas e envolvem uma grande número de proteínas (Igney & Krammer, 2002), dentre elas, as proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bid e Bak) e anti-apoptóticas (como Bcl-2 e Bcl-XL) e as caspases (Grivicich *et al.*, 2007). As caspases clivam muitas proteínas celulares, como a laminina e ativam proteoliticamente enzimas (como DNAses) que contribuem para a destruição celular.

A via extrínseca inicia-se através da ligação de um ligante ao receptor de morte, como por exemplo, CD95 (ou Fas) que conduz a formação do complexo sinalizador indutor de morte (DISC), através da ligação da proteína adaptadora, FADD, aos seus domínios citoplasmáticos dos receptores, resultando na ativação de caspases iniciadoras 8 e 10, as quais por sua vez ligam e ativam as caspases executoras 3, 6 e 7 culminando na apoptose (Chinnaiyan *et al.*, 1995; Krammer, 2000; Walczak e Krammer, 2000; Muppidi *et al.*, 2005; Bouillet e O'Reilly, 2009). A ligação de Fas por seu ligante, FasL, potencialmente dirige a apoptose (Kischkel *et al.* 1995; Nagata, 1997; Strasser *et al.*, 2009). A via extrínseca é indispensável na apoptose dirigida por remoção de citocinas ou estresse citotóxico como aqueles impostos por radiação  $\gamma$  ou drogas quimioterapêuticas.

A via intrínseca, ou via mitocondrial envolve a ativação de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, como o mediador de morte celular que interage com BCL-2 (BIM) levando a permeabilidade da membrana mitocondrial e consequente liberação do citocromo c do espaço intermembrana para o citosol, que uma vez liberado interage com o fator de ativação de peptidase apoptótica (Apaf-1), ATP e pró-caspase 9 para formar o apoptossoma. O apoptossoma cliva e ativa a caspase 9, a qual leva a apoptose através da ativação das caspases 3, 6 e 7 (Adrain e Martin, 2001; Bayir e Kagan, 2008; Bouillet e O'Reilly, 2009). Estresse intracelular ou extracelular como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes podem levar a ativação desta via (Grivicich *et al.*, 2007).

As vias da apoptose, entretanto, apesar de distintas, encontram-se associadas e influenciam uma a outra (Figura 4).

A morte celular por apoptose tem um papel crítico no desenvolvimento e no funcionamento do sistema imune. Durante a diferenciação, a apoptose elimina linfócitos desprovidos de receptores de antígenos úteis e aqueles perigosos. A morte do linfócito está também envolvida na limitação da magnitude e duração das respostas imunes. Estudos prévios de morte celular induzida por ativação concluíram que o CD95 (componente da via extrínseca) tem um papel importante no encerramento das respostas imunes mediadas por linfócitos T, em contrapartida, outros estudos propõem o BIM (componente da via intrínseca) como o principal fator responsável. Porém, com base em estudos recentes, um novo modelo que acomoda papéis complementares tanto de Fas quanto de BIM tem sido proposto (Bouillet e O'Reilly, 2009). Estudos têm mostrado também, que a super-expressão ou perda de membros da família Bcl-2 pode levar a hiperplasia ou hipoplasia de populações celulares hematopoiéticas, porém nenhuma das mutações nocaute com caspases teve efeitos dramáticos sobre o sistema hematopoiético (Marsden e Strasse, 2003). A deficiência na apoptose de células imunes também está envolvida na geração de doenças autoimunes (Nagata, 2010).

### 1.7 Doenças autoimunes

As doenças autoimunes (DA) são definidas como uma síndrome clínica causada por ativação de células B ou células T ou ambas, na ausência de uma infecção ou outra causa discernível (Davidson e Diamond, 2001). As DA incluem mais de 70 diferentes desordens e afeta aproximadamente 5% da população Ocidental. Resultam da complexa interação de fatores ambientais e genéticos e são altamente variáveis quanto aos tecidos alvos, idade de início da doença e respostas a tratamentos imunossupressores. As DA tem a participação tanto da imunidade humoral quanto celular em resposta a injúria tecidual. Muitos dos fatores envolvidos no desenvolvimento de doenças autoimunes ainda não foram identificados (Selmi *et al.*, 2004; Burek e Taylor, 2009; Dedeoglu, 2009; Selmi e Gershwin, 2009).

Alterações que diminuem o limiar para sobrevivência e ativação de células B e produção de auto-anticorpos, alterações genéticas que afetam globalmente as funções das células T reguladoras ou a produção de citocinas levam ao desenvolvimento de várias desordens autoimunes (Majet *et al.*, 2000; Boismenu e Chain, 2000).



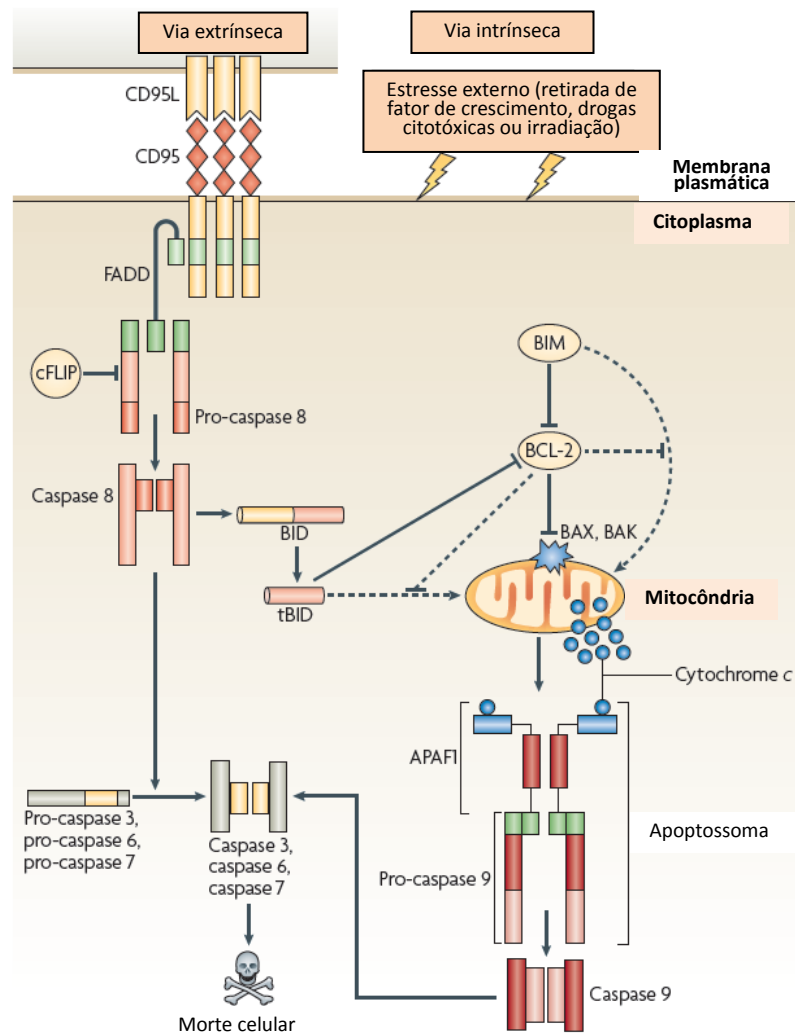


Figura 4 – Vias extrínseca e intrínseca da apoptose. Na via extrínseca (ou via de morte regulada por receptor), a ligação do CD95L ao CD95 leva a ativação da caspase 8 pela proteína adaptadora FADD (domínio de morte associado a Fas) e a formação do complexo sinalizador indutor de morte (DISC) através da interação de domínios homólogos. A caspase 8 ativada cliva as caspases 3, 6 e 7, que tem como alvo, substratos celulares vitais, induzindo a morte celular. Na via intrínseca, sinais de estresse externo como privação de fator de crescimento, exposição a drogas citotóxicas ou radiação medeiam a ativação de proteínas como mediador de morte celular que interage com BCL-2 (BIM), que ativam proteína X associada a BCL-2 (BAX) e o antagonista de BCL-2 (BAK) tanto direta (linha pontilhada) quanto indiretamente (linha sólida) por interação com membros anti-apoptóticos da família de BCL-2. A oligomerização de proteínas como BAX e BAK causa a permeabilização da membrana mitocondrial externa, liberação do citocromo e ativação da caspase iniciadora 9 no apoptossoma. A caspase 9, então, ativa as caspases 3, 6 e 7, que em última instância resulta na morte celular. APAF1, fator apoptótico ativador de protease-1; cFLIP, proteína inibidora celular semelhante a FLICE; tBID, BID truncada. Fonte: Bouill e O'Reill, 2009, traduzido.

A presença de um grande número de auto-anticorpos contra estruturas funcionais das células (ácido nucleico, moléculas nucleares, receptores, ou outros componentes funcionais das células) é observada nas DA. Esses auto-anticorpos são detectados no soro e são centrais no diagnóstico e classificação desse tipo de desordem. Os auto-anticorpos podem estar presentes no soro dos pacientes muitos anos antes das manifestações clínicas da doença. Porém, a presença de auto-anticorpos não se encontra limitada somente a doenças autoimunes, pois outras condições clínicas, como o câncer e o dano tecidual agudo, estão associados a sua presença. A presença de auto-anticorpos, entretanto, é uma evidência de quebra ou falha da tolerância de células B para com auto-antígenos correspondentes (Lleo *et al.*, 2010).

Os mecanismos envolvidos na quebra da auto-tolerância ainda são amplamente desconhecidos. O desenvolvimento de tolerância pelas células B ocorre na fase de maturação dessas células, tanto na medula óssea (tolerância central), quanto na periferia (tolerância periférica). Células B auto-reativas costumam morrer por apoptose, porém a falha na tolerância central e periférica leva ao aumento dessas células, favorecendo o desenvolvimento da autoimunidade. As células T helper estão profundamente envolvidas na quebra da tolerância ao próprio pelas células B levando a produção de auto-anticorpos (Lleo *et al.*, 2010).

Os auto-anticorpos podem causar dano tecidual através de mecanismos que incluem a formação de complexos imunes, citólise e fagocitose de células-alvos e interferência na fisiologia celular (Davidson e Diamond, 2001). A deposição de imunocomplexos circulantes pode causar glomerulonefrite, vasculite e artrite (Lleo *et al.*, 2010). Além dos auto-anticorpos, as células T auto-reativas também podem causar dano tecidual, principalmente células T<sub>H1</sub>, através do recrutamento de células inflamatórias e produção de mediadores (O'Garra *et al.*, 1997).

## 1.8 Artrite reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica crônica que afeta o sistema do tecido conjuntivo, tendo como principais alvos as articulações, especialmente as membranas sinoviais, causando artrite inflamatória (Lorenzo, 2007). A artrite inflamatória está associada ao dano articular, além de comorbidades, principalmente no sistema cardiovascular e destruição óssea. Torna-se uma doença de importância social visto que existe uma crescente incapacidade e declínio sócio-econômico nos indivíduos acometidos com AR (McInnes e O'Dell, 2010). É induzida por uma combinação de fatores genéticos, ambientais e

mecanismos aleatórios, além da desregulação das respostas imunes envolvendo células imunes inatas, incluindo neutrófilos, macrófagos e APCs, bem como a ocorrência da perda de tolerância por células B e T (Laufer, 2010). A AR é considerada, segundo estudos observacionais que utilizam critérios de classificação da doença, quando tratada, como uma doença grave de duração longa, com características dominantes extra articulares, opções de tratamento limitadas e resultados pobres (Scott *et al.*, 2010).

Clinicamente a AR tem como sintomas predominantes a dor, rigidez, e edema nas juntas periféricas. O curso clínico da doença é extremamente mutável, variando entre uma artrite média, autolimitada a uma inflamação multissistêmica rapidamente progressiva com profunda morbidade e mortalidade (Lee e Weinblatt, 2001).

A distribuição da AR é mundial, tendo uma prevalência de aproximadamente 1% da população (Lorenzo, 2007) e um pico de incidência entre 40 e 60 anos de idade. Sabe-se que fatores genéticos e ambientais contribuem para sua patogênese, porém pouco se sabe sobre sua etiologia (Lorenzo, 2007; Kochi *et al.*, 2009). Estudos epidemiológicos mostram que a prevalência da AR varia geograficamente e esta variação depende do *background* genético. É observado que caucasianos são mais susceptíveis ao desenvolvimento da AR que os asiáticos e os africanos (Rothschild *et al.*, 1992; Koshi *et al.*, 2009). Tem-se notado também que a AR possui uma baixa prevalência na África rural e alta prevalência em tribos específicas das Américas Nativas, porém não existe uma clara associação entre AR e status socioeconômicos (Lee e Weinblatt, 2001). O maior fator de risco ambiental é o fumo. Outros fatores de risco em potencial são ingestão de álcool, café, estado de vitamina D, uso de contraceptivos orais, embora as evidências que suportam esses outros fatores sejam fracas (Scott *et al.*, 2010).

Quanto ao gênero, a AR afeta mais as mulheres que os homens (2:1), e sugere-se que isto esteja relacionado a fatores ambientais e genéticos e dos hormônios sexuais, que provavelmente modulam o curso da doença e contribuem para as diferenças observadas (Gelderman *et al.*, 2007).

Cinquenta por cento do risco de desenvolver AR está atribuído a fatores genéticos (van der Woude *et al.*, 2009). Estudos tem sustentado fortemente a existência da predisposição genética pela evidência de maior concordância entre gêmeos e irmãos, mostrando que gêmeos monozigóticos possuem maiores índices de concordância que gêmeos dizigóticos (MacGregor *et al.*, 2000). E observa-se que irmãos de pacientes com AR tem risco aumentado de desenvolver a doença, numa relação 2:17 em relação a população (Seldin *et al.*, 1999). Maior susceptibilidade a artrite está associada a genes do antígeno leucocitário humano HLA, dentre eles o HLA-DR1 e o HLA-DR4 (Deighton *et al.*, 1989; Laufer, 2010).

Aproximadamente, 85% dos pacientes com AR é fator reumatoide positivo. Fator reumatoide é um anticorpo contra a porção Fc da imunoglobulina G. Imunocomplexos com o fator reumatoide tem sido mostrado em pacientes com artrite reumatoide. Uma teoria é que esses complexos ativem o sistema complemento contribuindo para o processo inflamatório da AR. Além do fator reumatoide, anticorpos contra peptídeos citrulinados (ACPA) têm sido encontrados em pacientes com AR (Harris *et al.*, 2005; Raza *et al.*, 2005; Lee e Schur, 2003; Zeng *et al.*, 2003; Van Gaalen *et al.*, 2004). Acredita-se que antígenos sejam modificados por citrulinização, o que permitiria a ligação destes a alelos HLA, e o resultado dessa ligação seria a quebra da tolerância que permite a ligação de anticorpos a esses antígenos (Hill *et al.*, 2003).

### 1.8.1 A patogênese da AR

O início da AR é precedido por uma fase pré-articular com quebra da auto-tolerância, porém, ainda não se sabe se a inflamação do tecido sinovial ocorre ao mesmo tempo em que o desenvolvimento da autoimunidade ou se ocorre um evento de transição da autoimunidade, a ocorrência clínica da inflamação articular (Figura 5). Manifestações clínicas da doença caracterizam-se por sinovite na junta e dano ao osso e à cartilagem adjacente (Iain e O'Dell, 2010).

O tecido sinovial inflamado é central a patofisiologia da AR (Lee e Weinblatt, 2001). A camada sinovial é constituída por sinoviócitos, semelhantes a fibroblastos (tipo B) e semelhantes a macrófagos (tipo A) (Laufer, 2010). Durante a AR o número dessas células na camada sinovial aumenta (Bartok e Firestein, 2010). A membrana sinovial na AR transforma-se de uma estrutura quiescente relativamente acelular para uma forma hiperplásica, invasiva do tecido e repleta de células imunocompetentes (Bartok e Firestein, 2010).

Histologicamente, o tecido sinovial na AR se caracteriza por hiperplasia celular, influxo de leucócitos inflamatórios, mudanças de expressão na superfície celular de moléculas de adesão, proteinases, inibidores de proteases, pronunciada angiogênese e grande quantidade de citocinas (Lee e Weinblatt, 2001). Na camada subsinovial, durante a AR, existe uma infinidade de leucócitos ativados, incluindo macrófagos, células dendríticas, células B (5%), células T CD4 (30-40%), T CD8, mastócitos, células Natural Killer (NK) e células T Natural Killer (NKT) e algumas vezes agregados linfóides (Firestein, 2009; McInnes e O'Dell, 2010). A infiltração celular é garantida pela grande quantidade de fatores pró-angiogênicos que provocam uma vascularização proliferativa. Apesar da intensa vascularização, o ambiente

sinovial na AR é altamente hipóxico, porém a significância biológica disso é pouco compreendida (Taylor e Sivakumar, 2005).

Um fator característico da AR é a formação do *pannus*, que é definido com um tecido sinovial invasivo (Lee e Weinblatt, 2001), envolvido na erosão das articulações na AR. O *pannus* se desenvolve em resposta a citocinas secretadas por células imunes inflamatórias e também por sinoviócitos tipo B, que além da secreção de citocinas, adotam um fenótipo crescentemente agressivo (Bartok e Firesten, 2010).

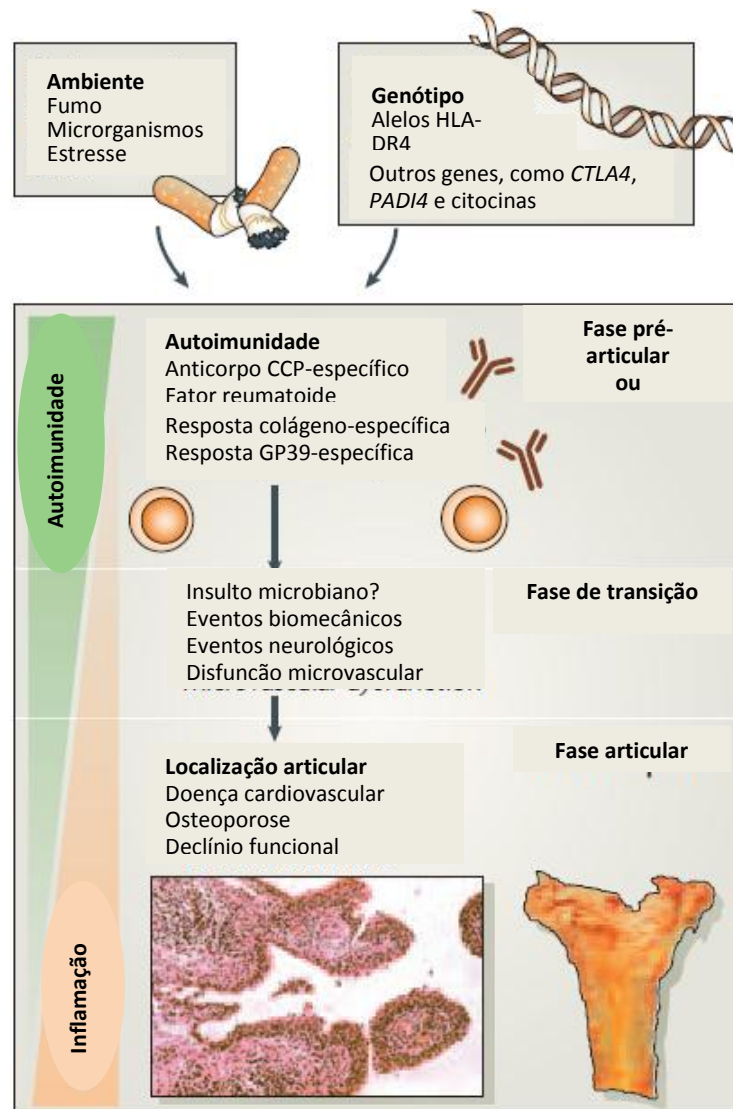


Figura 5 – Patogênese da artrite reumatoide com base na visão unificada das diversas hipóteses geradas para a gênese e desenvolvimento da doença. Inicialmente, ocorre a fase de autoimunidade que precede (mais de anos) o começo clínico da doença. A transição para a fase clínica da doença é iniciada por processos mal entendidos, como eventos biomecânicos e neurológicos. Em seguida ocorre inflamação, destruição da articulação e aumento de comorbidades, como doenças cardiovasculares. Fonte: McInnes & Schett, 2007, traduzido.

O *pannus* possui características histológicas distintas das outras regiões da sinóvia e possui fases de progressão ao longo da doença. Inicialmente, ocorre a penetração da cartilagem pelo *pannus* sinovial, composto por células mononucleares e fibroblastos com alta expressão de metaloproteinases de matriz pelas células da camada sinovial. E em fases mais tardias da doença o *pannus* pode ser substituído por *pannus* fibroso compreendido por uma camada minimamente vascularizada de células do *pannus* e colágeno sobrejacente à cartilagem (Lee e Weinblatt, 2001).

A inflamação crônica da sinóvia, na AR, é mantida pelas células do infiltrado e pelos sinoviócitos através da produção de fatores reumatóides e produção de citocinas do repertório Th1 e Th2 (Weissmann, 2006).

Existe uma comunicação bidirecional entre o sistema imune adaptativo e a articulação. Ao passo que a articulação inflamada nutre o ambiente linfóide, as células T, células B e macrófagos induzem proliferação sinovial e ativação de osteoclastos (Manzo *et al.*, 2010).

### 1.8.2 Imunologia da AR

O desenvolvimento da AR envolve componentes tanto do sistema imune inato quanto do sistema adaptativo. Componentes do sistema imune inato, como as células dendríticas, macrófagos, receptores *Toll-like* (TLRs), receptores *NOD-like* e componentes moleculares do inflamossoma têm grande importância na AR (Sidiropoulos *et al.*, 2008; Huang e Pope, 2010) e estão envolvidos no reconhecimento de PAMPs, na ativação celular, produção de citocinas e na ativação de vias de sinalização como a via do fator nuclear  $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B), a via das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAP quinase) e via do fator de transcrição ativador 1 (AP-1), que estão relacionados a expressão de citocinas inflamatórias, mediadores e metaloproteinases na AR (Gierut *et al.*, 2010).

O sistema imune inato é persistentemente ativado na AR, como mostrado pela expressão contínua de citocinas derivadas de macrófagos, como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 (Gierut *et al.*, 2010).

Com relação aos componentes da imunidade adaptativa, além da presença abundante de subtipos de células T CD4 e T CD8 ativadas, células B, plasmócitos e células do plasma na sinóvia (Iain e O'Dell, 2010), centros germinativos ectópicos, constituídos por células T CD4<sup>+</sup>, BCD20<sup>+</sup> e um rede de células dendríticas foliculares estão presentes numa proporção substancial de pacientes, e estudos recentes têm relacionado estes centros germinativos como

locais para a maturação e ativação de células B e promoção da produção de auto-anticorpos (Humby *et al.*, 2009). A base celular para a apresentação de auto-anticorpos permanece desconhecida, mas parece que está relacionada à função das células B e células dendríticas mieloides e plasmocitoides.

A AR foi historicamente considerada como uma doença mediada pela resposta Th1, porém estudos recentes tem mostrado que células Th2 podem predominar na fase inicial de produção de auto-anticorpos (Raza, 2005) e células Th17, que secretam IL-17 tem mostrado efeitos cruciais na AR (Lubberts, 2010).

A presença de células T é predominante à de células B no tecido sinovial, sendo as células T CD4<sup>+</sup> ativadas encontradas em maior quantidade (Weyand, 2000), incluindo células T de memória. A participação de células T na AR compreende a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$  e GM-CSF, o contato células célula, respostas antígenos específicas, ativação de osteoclastos e reabsorção óssea (Firestein, 2003). A susceptibilidade genética associada à haplótipos de MHC mostra a importância e o papel crítico das células T na AR, inclusive no que se refere ao reconhecimento de auto-antígenos apresentados pelas APCs (Taneja e David, 2010), o sistema imune de pacientes com AR possui um alto nível de células T auto-reativas (Goronzy *et al.*, 1998). Além disso, moléculas co-estimuladoras CD40 ligante promovem a proliferação de células B, produção de imunoglobulinas, ativação de monócitos e diferenciação de células dendríticas. Moléculas co-estimulatórias podem estar presentes em níveis elevados no tecido reumatoide, induzindo ativação de células T independente de antígenos (Scrivero *et al.*, 2007) .

A apoptose de leucócitos no fluido sinovial, incluindo os linfócitos, encontra-se inibida na artrite reumatoide estabelecida. Os mecanismos responsáveis por essa inibição parecem estar relacionados aos altos níveis de citocinas anti-apoptóticas na artrite precoce (IL-2, IL-4, IL-15, GMCSF, GCSF) (Raza *et al.*, 2006).

Os linfócitos B estão envolvidos na produção de auto-anticorpos, apresentação de antígenos através do BCR, ativação da função das APCs, modulação de células T, síntese de citocinas, funções mediadas por quimiocinas, neolinfogênese ectópica e parecem estar envolvidas na homeostase do osso (Marston *et al.*, 2010).

As citocinas estão implicadas em cada fase da AR, promovendo a autoimunidade, manutenção da sinovite inflamatória crônica e conduzindo a destruição do tecido adjacente (McInnes e Schett, 2007). Dentre as citocinas envolvidas na AR encontram-se: a IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , que medeiam a ativação de osteoclastos, a expressão de moléculas de adesão, a secreção de quimiocinas e mediadores inflamatórios (NO e PG); TNF- $\alpha$ , envolvido na ativação de

monócitos, *burst* oxidativo, apoptose de células T, regulação clonal e disfunção de TCR, aumento da produção de MMP e citocinas e aumento da expressão de moléculas de adesão endoteliais; IL-6, que regula a proliferação de células B e produção de anticorpos, a hematopoiese, a proliferação, diferenciação e citotoxicidade de células T, produção de proteínas de fase aguda; IL-12, que induz a proliferação e a diferenciação de células Th1, a citotoxicidade de células T e NK e ativação de células B; IL-23, que causa a proliferação de células Th17; IL-17, atua na liberação de citocinas pelos fibroblastos sinoviais e liberação de MMP, osteoclastogênese, aumento da produção de citocinas dos leucócitos; interferon tipo I, que causa o aumento da expressão de MHC, ativação de macrófago e linfócito, diferenciação, sobrevivência e alterações citoesqueléticas; fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), que é importante na angiogênese; ligante do receptor ativador do NF- $\kappa$ B (RANKL), que está envolvido na ativação e maturação de osteoclastos e logo, na reabsorção óssea e modula interações células T-células dendríticas (McInnes e Schett, 2007). Fatores de sobrevivência, como BLYS e APRIL, que são críticos para a manutenção da auto-reatividade de células B, e adipocitocinas tem mostrado a existência de uma intrigante ligação entre ativação tecidual de adipócito, síndrome metabólica e inflamação articular (Toussiro *et al.*, 2007; Daridon *et al.*, 2009).

### 1.8.3 Tratamento da AR

A AR ainda é uma doença incurável. Várias abordagens têm sido aplicadas em estágios patológicos diferentes da doença. O tratamento de pacientes com artrite reumatoide inclui AINES, drogas modificadoras da doença (DMARDs), agentes biológicos e glicocorticoides.

Os AINES têm sido por muito tempo utilizados para o tratamento de pacientes com AR, porém essas drogas só são capazes de melhorar os sintomas da doença, e não de modificar a progressão e a incapacitação em longo prazo da doença. Devido a limitada eficiência dos AINES e seus efeitos colaterais gastrointestinais e cardíacos, essas drogas perderam seu papel histórico como a primeira linha de tratamento da AR (Emery, 2006; Scott *et al.*, 2010).

As DMARDs são um grupo heterogêneo de agentes agrupados por uso e convenção (Scott *et al.*, 2010). São considerados o pilar do tratamento da AR (Donahue *et al.*, 2008), porém seus diversos mecanismos de ação ainda são desconhecidos. Essas drogas são capazes de reduzir o edema e a dor na junta, diminuir marcadores de fase aguda, limitar o dano



articular progressivo e melhorar a função (Scott *et al.*, 2010). A DMARD mais utilizada é o metotrexato, porém a sulfassalazina e lefunomida também são amplamente utilizados. Os DMARDs podem ser utilizados sozinhos (monoterapia) ou em combinação a fim de aumentar a eficácia (Lee, 2001; Choy *et al.*, 2005). Porém, os DMARDs são pobremente tolerados a longo-prazo e provocam vários efeitos colaterais, incluindo uns menos severos, como náuseas e outros mais graves, como hepatotoxicidade, discrasias sanguíneas e doença intersticial pulmonar (Alcorn e Madhok, 2009; Salliot e van der Heijde, 2009).

Os glicocorticoides são utilizados há mais de 60 anos no tratamento da AR. Durante curto prazo, os glicocorticoides reduzem a inflamação do tecido sinovial. Em longo prazo, diminuem o dano articular, porém expõem a riscos adversos substanciais, como infecções e osteoporose, e seu risco global/benefício é considerado desfavorável (Kirwan *et al.*, 2007; Ravindran *et al.*, 2009).

Entre os agentes biológicos utilizados para o tratamento da AR, estão os inibidores de TNF- $\alpha$ , que foram os primeiros a serem aprovados para o tratamento da AR. Estes inibidores podem ser uma forma recombinante do receptor de TNF ou um anticorpo direcionado a TNF (Lee, 2001) e são marcadamente efetivos em pacientes que não respondem a tratamento com DMARDs. São convencionalmente utilizados combinados a DMARDs, a fim de aumentar a eficácia do tratamento. O bloqueio de TNF dramaticamente diminui o dano estrutural, além de levar a melhoras substanciais de sinais e sintomas associados doença (Emery, 2006; Scott *et al.*, 2010). Efeitos adversos incluem reações e infecções no local da injeção ou infusão, risco de tuberculose (Dixon *et al.*, 2009), infecção por hepatite A e B aumentados e à longo prazo, riscos de infecções bacterianas (ex. sepsia), fúngicas (ex. candidíase) e virais (ex. herpes zoster) (Scott *et al.*, 2010). E existem evidências, porém ainda não convincentes, que esses agentes podem ainda aumentar o risco de desenvolvimento de linfomas (Kaiser, 2008). Outro ponto negativo é que o custo dessas terapias é extremamente alto (Gibbons e Hyrich, 2009).

### 1.9 Artrite induzida por colágeno

Os modelos animais de artrite autoimune têm sido utilizados como ferramentas de pesquisa para estudo dos mecanismos patogênicos da artrite, bem como para o desenvolvimento de novas terapias (Cho *et al.*, 2007). A artrite induzida por colágeno (CIA) é um modelo amplamente utilizado para o estudo da AR. Caracteriza-se por uma hipersensibilidade imunológica ao colágeno, o maior componente estrutural do tecido conjuntivo, o que poderia explicar a natureza sistêmica e a cronicidade da inflamação na AR

(Trentham *et al.*, 1977). O modelo de CIA tem sido utilizado para estudar mecanismos patogênicos da autoimunidade, incluindo o papel dos tipos celulares individualmente, no começo e na progressão da doença, bem como para designar e testar novas terapias. Nos últimos anos esse modelo tem ajudado no desenvolvimento de terapias com base biológica como os inibidores de TNF- $\alpha$  (Cho *et al.*, 2007). A patogênese da CIA divide diversas características patológica com a AR incluindo hiperplasia sinovial, infiltração de células mononucleares, degradação da cartilagem e a susceptibilidade ligada a expressão específica de genes MHC classe II (Cho *et al.*, 2007).

A CIA é primariamente uma doença autoimune das articulações, que requer tanto a imunidade mediada por células T quanto por células B a colágeno tipo II autólogo para manifestação da doença (Kannan *et al.*, 2005). Os linfócitos B têm como principal função a produção de anticorpos artritogênicos anti-CII (Holmdahl *et al.*, 2002). Modelos de artrite induzida por coquetel de anticorpos monoclonais específicos para epítomos de CII comprovam a importância dos anticorpos específicos para CII, e também dessas células (Nandakumar e Holmdahl, 2006; Oestergaard *et al.*, 2008). Os linfócitos T têm papéis regulatórios na sinóvia e aumentam (através da ativação de linfócitos B e de outras células e da produção de citocinas) ou inibem (através das células T reguladoras) a inflamação e erosão óssea, dependendo das condições que prevalecem (Corthay *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2007).

A CIA é elucidada em linhagens de camundongos que possuem o haplótipo H-2<sup>q</sup> ou H-2<sup>r</sup>, através da imunização com colágeno II heterólogo em adjuvante completo de Freund (AFC). As linhagens de camundongos mais suscetíveis são DBA/1J, B10.Q e B10.RIII (Fugger *et al.*, 1996; Rosloniec *et al.*, 1997). Campbell e colaboradores (2000) demonstraram que camundongos C57BL/6 (B6; H-2b) também podem desenvolver a CIA com alta incidência (60-70%) e severidade sustentada. Como resultado, ocorre a ativação da resposta imune após uma ou duas semanas da imunização e o início da artrite macroscópica após 2 semanas ou na maioria dos casos após várias semanas ou meses. Dentro de alguns dias após o começo da artrite, as juntas afetadas são danificadas por uma reação inflamatória, onde ocorre uma destruição severa da junta com a formação do *pannus* erosivo e remodelamento da articulação, semelhante à AR. A inflamação ativa, porém, após 3-4 semanas do início da doença diminui, ficando apenas a junta danificada e remodelada, mas sem inflamação (Holmdahl *et al.*, 2002).

A idade e o sexo influenciam na susceptibilidade a CIA. Diferentemente da AR, machos são mais suscetíveis que fêmeas. Os hormônios sexuais femininos exibem um papel protetor forte da artrite (Jansson e Holmdahl, 2001).

Após a imunização com CII, células dendríticas reconhecem o CII e tornam-se maduras. O LPS e o peptídeo glicano presentes no AFC são importantes na maturação dessas células. As células dendríticas maduras têm alta expressão de receptores de quimiocinas, moléculas MHC classe II, citocinas pró-inflamatórias e moléculas co-estimuladoras. Essas células, então, migram para os nódulos linfoides e apresentam os peptídeos de CII, através de moléculas de MHC classe II apropriadas, as células T *naive*. Isso leva a uma reposta proliferativa de células T CD4<sup>+</sup> específicas para CII nos nódulos linfoides e no baço. A interação célula dendríticas e linfócito T também conduz à ativação de linfócitos B *naive*, que quando ativados produzem diversas classes de anticorpos anti-CII. A CIA é caracteristicamente uma doença mediada por resposta T<sub>H</sub>1 e altos níveis de IFN- $\gamma$ , devido a natureza antigênica do CII e também pelo uso do AFC, como veículo de entrega do antígeno (Cho *et al.*, 2007). Apesar dos altos níveis de IFN- $\gamma$ , estudos têm mostrado que camundongos nocaute para IFN- $\gamma$  exibem susceptibilidade aumentada a AR, mostrando que o IFN- $\gamma$  pode ter um papel ainda mais importante na regulação da resposta imune (Ortmann e Shevach, 2001; Brand *et al.*, 2003). Os anticorpos anti-CII são essenciais na iniciação da reposta inflamatória na articulação, através da ativação da cascata do complemento (Fleming e Tsokos, 2006). O C5a, do sistema complemento, recruta neutrófilos e macrófagos. Essas células são ativadas ao se ligarem através do receptor Fc $\gamma$  e secretam diversas citocinas e mediadores inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-1, NO, PGE-2. Isso leva ao recrutamento e ativação de outras células inflamatórias, como NK, células dendríticas, células T e células B e ativação de fibroblastos e macrófagos sinoviais. Estas células, por sua vez, produzem outras citocinas, como IL-23 e IL-17, quimiocinas e MMPs. A degradação da matriz e a apresentação do antígeno CII amplificam a resposta imune por células T. A IL-23 regula a secreção de IL-17 pelas células T<sub>H</sub>17. IL-17, por sua vez, ativa a via do NF- $\kappa$ B culminando na formação de diversos mediadores inflamatórios, como RANKL, TNF- $\alpha$ , IL-1. Juntamente a estas últimas, a IL-17 tem mostrado efeito aditivo ou até mesmo sinérgico na indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias e dano articular. O NO também é importante na destruição da cartilagem porque induz a degeneração dos condrócitos. As células Tregs também exercem funções importantes na CIA, sendo reguladoras da doença através da liberação de TGF- $\beta$  e IL-10. Semelhante a AR também ocorrem casos de formação de centros germinativos ectópicos na sinóvia. O resultado final é a destruição da junta (Lubberts *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2007; Lubberts, 2010).

Com base nessas informações o modelo de CIA torna-se um adequado modelo para o desenvolvimento de novas terapias efetivas para AR, inclusive aquelas baseadas em plantas medicinais, dando subsídio para o entendimento e avaliação de seus efeitos.

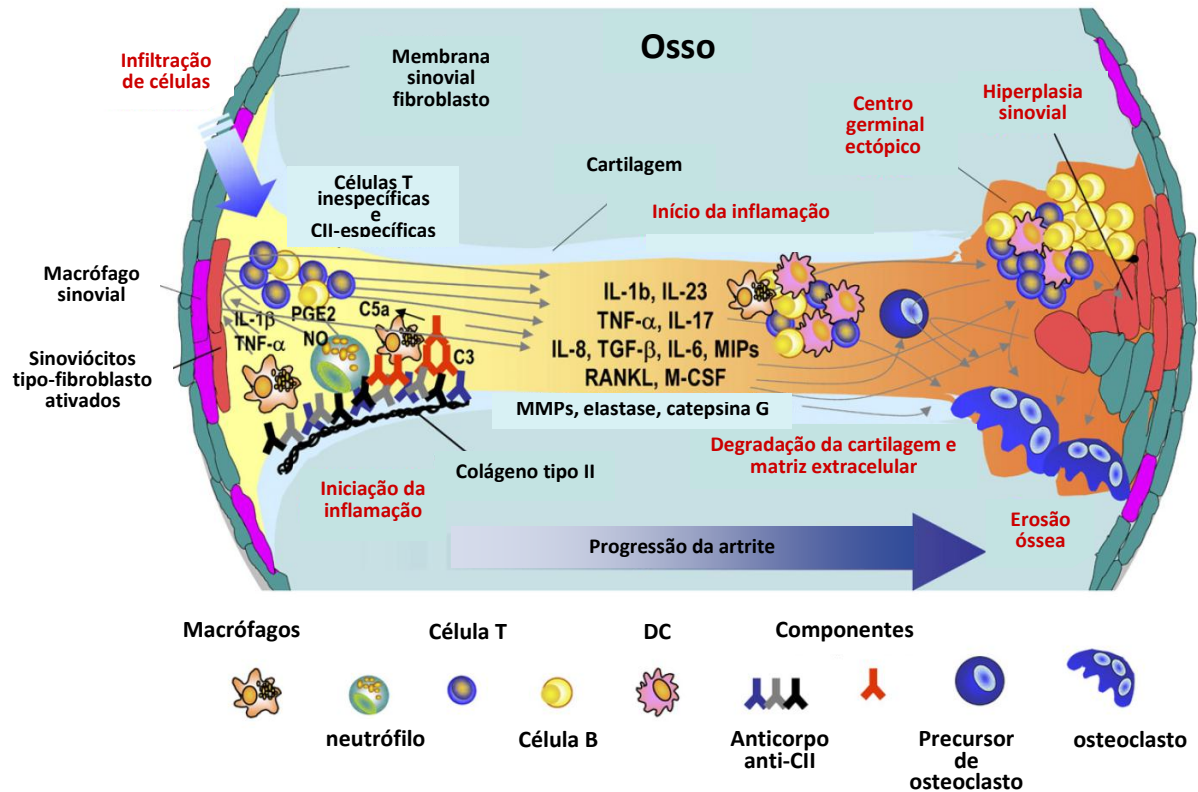


Figura 6 – Patogênese da artrite induzida por colágeno. Diagrama esquemático da inflamação e erosão óssea nas articulações artríticas de camundongos com CIA. A imunização com CII heterólogo em AFC produz a formação de anticorpos anti-CII, que por sua vez ativam o sistema complemento. O C5a do complemento recruta neutrófilos e macrófagos e aumenta a expressão do Fc $\gamma$ R. Esses leucócitos ativados produzem diversos mediadores inflamatórios e quimioatraentes, como IL-1, TNF- IL-8, NO, PGE2, IL-6, que atuam sobre macrófagos sinoviais e células mononucleares infiltrantes. No começo da inflamação, ocorre uma proliferação de linfócitos T, B, células dendríticas (DC), células sinoviais, que produzem citocinas que interagem uma com as outras. Ocorre também a produção de MMPs, elastase e catepsina G que degradam a matriz extracelular e a cartilagem. Os fibroblastos e macrófagos sinoviais progridem para hiperplasia. Há formação de novos vasos sanguíneos. Em condições restritas, células T<sub>H</sub>17 podem induzir osteoclastogênese, levando a erosão óssea. Fonte: Cho *et al.*, 2007, traduzido.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Produto natural

Frutos de *Pterodon polygalaeiflorus*, da família das Papilionáceas. A identificação botânica da espécie foi confirmada por Haroldo Cavalcanti Lima, do Departamento de Botânica Sistemática do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, onde uma amostra encontra-se depositada (RB350278, julho 1999).

### 2.2 Animais

Foram utilizados camundongos das linhagens DBA/1J e C57Bl/6 machos (18 – 24 g), criados no Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas, em temperatura controlada (24°C), com ciclo de luminosidade de 12 h sendo alimentados com água e ração *ad libitum*. A higienização e desinfecção das caixas foram realizadas em dias alternados, com hipoclorito de sódio, sendo utilizada maravalha de pinho branco estéril.

Os experimentos foram realizados seguindo os padrões éticos para o uso de animais de experimentação e aprovados pelo Comitê de Ética do IBRAG-UERJ – Protocolo 05/2009.

### 2.3 Material descartável e outros

- Seringas de plástico de 1,0 mL e agulhas hipodérmicas estéreis, B-D plastipak, Brasil.
- Câmara de Neubauer, Boeco, Alemanha.
- Placas de cultura de células de fundo plano com tampa de 96 poços, estéreis, Falcon Becton Dickinson Labware, EUA.
- Sonda orogástrica metálica IC800, Insight, Brasil.
- Placas de cromatografia em camada delgada de sílica gel 60, Alugram Sil G, Macherey-Nagel, Alemanha.
- Lâminas 24 x 50 mm, Glasscyto, Brasil.
- Lamínulas 24 x 32 mm, Roni Alzi, Brasil.
- Cassetes histológicos 210 x 297 mm, Kajocopy, Erviegas, Brasil.
- Parafina purificada (P.F. 56°C – 58°C), Proquímios, Brasil.

- Coluna capilar Restek RTX – 5 MS, com 30 m (comprimento) x 0,25 mm d.i. (diâmetro interno) e 0,25 µm d.f. (espessura do filme), Restek Corporation, EUA.
- Coluna para HPLC C18 100 Å (dimensão do poro), com 250 mm x 4,6 mm. (comprimento x d.i.) e granulometria de 5 µm, Kromasil, Suécia.
- Garrafas plásticas de cultura de células de 75 cm<sup>2</sup>, Corning, EUA.
- Microtubos de plástico de 1,5 mL, Eppendorf, Brasil.

#### 2.4 Reagentes, soluções e anticorpos e outros

- NP (ácido difenilbórico aminoetiléster – “natural product”), PEG (polietileno glicol 400), vanilina, DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), Tween 20 (Polyxyethylenesorbitan Monolaurate), PI (Iodeto de propídeo), detergente não iônico Triton X-100, RNase de pâncreas bovino, MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazol brometo), SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% e Con A (concanavalina A), Lipopolissacarídeo (LPS), da Sigma Chemical Company, EUA.
- Acetato de etila, metanol absoluto e diclorometano, grau HPLC, Tedia Brazil, Ltda., Brasil.
- Acetona, ácido sulfúrico, ácido acético, xilol, éter de petróleo, etanol absoluto (qualidade Omnisolv), Merck S.A., Brasil.
- Soro fetal bovino (SFB) inativado e estéril, Cultilab, Brasil.
- Meios de cultura RPMI 1640 e DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco), Gibco, Brasil.
- Adjuvante completo de Freund da Termo Scientific, Pierce Protein Research Products, EUA.
- Anticorpo anti-CD11b integrina (Mac-1α chain) de camundongo acoplado a PE, clone M1/70; Anexina V, BD Pharmingen, EUA.
- Anticorpo anti-CD32/16 de camundongo, clone 93, Southern Biotechnology Associates, Inc., EUA.

Os demais reagentes foram usados em grau analítico.

## 2.5 Equipamentos

- Agitador magnético, modelo 257, FANEM, Brasil.
- Balança analítica, modelo B200, Micronal, Brasil.
- Balança analítica, modelo PB 3002, Mettler Toledo, Suíça.
- Banho-Maria, modelo 802, Fisatom, Brasil.
- Banho histológico, modelo BH05 e Dispensador de parafina modelo DP-01, Lupe Indústria e Comércio, Brasil.
- Câmaras de fluxo laminar, modelo FLV, série 301, Trox do Brasil, Ltda. e modelo VLFS, série FL4761, Veco, Brasil.
- Centrífuga clínica, modelo Universal II, Hettich, Brasil.
- Cromatógrafo líquido, modelo LC- 20 AT, acoplado a detector de fotodiodo, modelo SPD-M20A (HPLC-DAD), com sistema controlador CBM-20A, Shimadzu, Japão.
- Cromatógrafo a gás, modelo Shimadzu 17A acoplado ao espectrômetro de massas, modelo Shimadzu QP 5050A com uma energia de ionização de 70 eV, Shimadzu, Japão.
- Estufa bacteriológica com controle de temperatura digital, modelo 294, de Leo & Cia Ltda., Brasil.
- Estufa incubadora de CO<sub>2</sub>, modelo COM-17AC, Sanyo, EUA.
- Evaporador rotativo, modelo 802, Fisatom, Brasil.
- Gabinete para visualização de fluorescência (U.V. 365 nm e 254 nm), modelo BOIT-GAB01, Boitton, Pró Análise, Brasil.
- Liofilizador Heto Drywinner, modelo FD6/55, Heto Lab Equipament, Heto-Holten A/S, Dinamarca.
- Máquina fotográfica digital, modelo DSC-H50, Sony, Brasil.
- Microscópio de campo claro, modelo CBA, Olympus, Japão.
- Microscópio invertido com contraste de fase, modelo CK2, Olympus, Japão.
- Micrótomo Rotativo, modelo RM2125RT, LEICA Microsystems, Alemanha.
- Pletismômetro, modelo 7140, UGO-BASILE, Itália.
- Potenciômetro, série 1106/93, Analyser, Brasil.
- Ultrapurificador de água, modelo Milli-Q plus, Millipore Corporation, EUA.

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 Preparo do extrato etanólico de *Pterodon polygalaeflorus*

Os frutos de *Pterodon polygalaeflorus* foram lavados rapidamente em água destilada corrente, secos a temperatura ambiente, pesados (100 g), e em seguida pulverizados em nitrogênio líquido em um graal metálico, sendo transferidos, com auxílio de uma espátula. O material obtido foi colocado em cartuchos de papel de filtro previamente pesados, para a determinação da massa do material pulverizado. A amostra foi submetida à maceração em etanol 100% (10 mL/g de fruto) durante 15 dias, em vidro de cor âmbar, protegido da luz, em temperatura ambiente. Após o período de 15 dias, o cartucho foi removido do etanol. Deixou-se a solução etanólica escoar completamente através do papel de filtro e, posteriormente, descartou-se o cartucho. O extrato foi transferido para um balão de fundo redondo, previamente pesado (P1) e o solvente evaporado utilizando o evaporador rotativo. Após a completa evaporação do solvente, o balão foi pesado novamente (P2) e o peso do material extraído pelo etanol correspondeu à diferença entre P2 e P1. Este extrato bruto obtido foi denominado de extrato etanólico de *Pterodon polygalaeflorus* (EEPpg).

#### 3.2 Rendimento

O rendimento do extrato etanólico de *P. polygalaeflorus* foi calculado relacionando-se a massa dos frutos macerados em etanol com o material obtido após a evaporação do solvente, como é descrito na expressão abaixo:

$$\% \text{ de rendimento} = (\text{peso do material obtido} / \text{peso do material inicial}) \times 100$$

#### 3.3 Análise do EEPpg por cromatografia em camada delgada (TLC)

A análise cromatográfica do EEPpg em camada delgada foi realizada em placas de Silica Gel 60, medindo 7 x 3 cm e desenvolvida em cuba de vidro com tampa, à temperatura ambiente. A amostra do EEPpg, diluída em metanol 100% (10 mg/mL) foi aplicada em banda com auxílio de aplicadores, a uma distância de 1 cm da margem inferior marcada a lápis.



Foram realizadas uma ou duas aplicações no mesmo ponto para fins de concentração da amostra e a placa foi seca à temperatura ambiente.

Para a revelação com sulfato de cério foi utilizada como fase móvel a mistura de solventes acetona:éter de petróleo (1:9 v/v) para verificar a presença de compostos em geral. Ao final da corrida, a placa foi seca e revelada com sulfato de cério 1% em ácido sulfúrico 1,5% seguido de aquecimento da placa na estufa a 100°C por 5 min. Posteriormente a placa foi fotografada.

Para a revelação com NP-PEG foi utilizada como fase móvel a mistura de solventes diclorometano:acetato de etila (9:1 v/v) para verificar a presença de flavonoides. Ao final da corrida, a placa foi seca e revelada com reagente NP-PEG. A placa foi revelada com NP 0,5 g% em acetato de etila e após secar a temperatura ambiente, foi aspergida com PEG 5 g% em diclorometano e seca em estufa a 100°C por 5 min. A fluorescência foi observada em gabinete para visualização de fluorescência (365 nm) e posteriormente fotografada.

Para a revelação com vanilina foi utilizada como fase móvel a mistura de solventes diclorometano: acetato de etila (9:1 v/v), para verificar a presença de terpenoides. Ao final da corrida a placa foi aspergida com ácido sulfúrico 5%, seca a temperatura ambiente e posteriormente revelada com vanilina 0,2% em etanol e aquecida em estufa por 5 minutos a 100°C.

#### **3.4 Análise do EEPpg por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fotodiodo (HPLC-DAD)**

O EEPpg foi analisado por HPLC com o objetivo de avaliar seu perfil cromatográfico. Foram injetados 50 µL de amostra do extrato etanólico diluídos em 50 µg/mL em metanol 100% utilizando-se como fase estacionária uma coluna de fase reversa C18 (Kromasil 100 Å de 250 x 4,6 mm). A eluição foi monitorada em dois comprimentos de onda, 220 nm e 254 nm, que foram escolhidos baseados na varredura de espectro previamente realizada em espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu UV 160A, sendo utilizada como fase móvel, água/acetonitrila. Foi realizado um , com fluxo de 1 mL/min, começando com 30% até alcançar 100% de acetonitrila por 20 min, permanecendo a 100% por mais 15 min.

### **3.5 Análise do EEPpg por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC/MS)**

O EEPpg foi analisado por GC/MS. Foram injetados 2 µL de amostra do extrato diluído a 1 mg/mL em metanol 100%. A cromatografia gasosa foi desenvolvida em um aparelho Shimadzu modelo GC/MS – QP 2010 Plus. Para a separação dos constituintes da amostra foi utilizada uma coluna capilar Rester RTX – 5 MS, com 30 m de comprimento 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura da fase. Hélio ultra puro foi utilizado como gás de arraste com fluxo constante de 1 mL/min. A temperatura da coluna foi programada para iniciar com 120°C com um aumento de 6°C a cada minuto até alcançar 300°C, permanecendo a 300°C por mais 4 min. A análise foi processada no modo de impacto de elétrons com uma energia de ionização de 70 eV.

### **3.6 Estudo do efeito antiartrítico do EEPpg**

#### **3.6.1 Modelo de artrite induzida por colágeno (CIA)**

Para avaliação do efeito antiartrítico do EEPpg foi utilizado o modelo de artrite induzida por colágeno, desenvolvido segundo Wooley e colaboradores (1981). Animais DBA/1J machos, com peso entre 18-24 g, foram primeiramente imunizados com uma injeção intradérmica (i.d.) no dorso com 100 µL de colágeno II (CII) emulsificado em adjuvante completo de Freund (AFC) na concentração de 2 mg/mL. No 21º dia após a primeira imunização, os animais receberam uma dose reforço através de injeção intraperitoneal (i.p.) de 100 µL de CII (4 mg/mL).

O desenvolvimento da CIA foi avaliado através da análise do volume das patas por pletismografia e avaliação clínica por escore. O pletismômetro mede automaticamente o deslocamento de volume de líquido induzido pela introdução da pata no recipiente contendo 0,05% de NaCl e 0,3% do reagente BBC97, fornecido pelo fabricante (Ornano, Itália). O volume de líquido deslocado pela pata, no pletismômetro, foi considerado o volume da pata.

O índice de artrite (IA) representa o percentual de aumento do volume da pata mais edemaciada no dia X em relação ao dia 0 e foi calculado segundo Sabino e colaboradores (1999a), como:

$$IA(\%) = \frac{\text{vol. da pata no dia X} - \text{vol. da pata no dia 0}}{\text{vol. da pata no dia 0}} \times 100$$

Camundongos com índice superior a 30% foram considerados artríticos.

O escore clínico expressou a severidade da artrite numa escala de 0-4 por pata de acordo com mudanças no eritema e/ou edema, observadas visualmente, como descrito por Kin e colaboradores (2000): score 0 - normal; score 1 - artrite detectável com eritema em alguns dígitos; score 2 - significativo edema e eritema; 3 - edema severo e eritema da articulação ao dígito; score 4 - edema máximo com anquiloses. O total de escore foi cumulativo com máximo de 16 por animal.

### 3.6.2 Tratamento com EEPpg dos camundongos com CIA

O tratamento dos camundongos com CIA foi realizado diariamente por via oral (v.o.), a partir da segunda injeção de CII (21º dia) até o final do experimento. Os grupos tratados com EEPpg receberam 100 µL do extrato nas doses de 0,1; 0,01 ou 0,001 mg/kg de peso corporal (p.c.). O grupo controle recebeu apenas o veículo de diluição das amostras (etanol 15%). O nível de inibição da CIA pelo tratamento com EEPpg foi avaliado pelo decréscimo no índice de artrite do grupo tratado comparado ao grupo controle CIA. Ao final do experimento o sangue foi coletado, os órgãos pesados e as patas removidas para posterior análise.

### 3.6.3 Contagem de células do sangue

O sangue da artéria carótida foi coletado dos camundongos. Gotas do sangue foram utilizadas para montagem de esfregaço que foram corados com corante panótico, e as lâminas analisadas ao microscópio óptico, para a realização da contagem de segmentados, monócitos e linfócitos. O restante do sangue foi utilizado para contagem dos leucócitos totais, para isso o

sangue foi transferido para um tubo falcon e adicionado 10 mL de tampão ACK (145 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM de  $\text{KHCO}_3$  e 2 mM de EDTA). Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 1000 x g por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e, então, se adicionou 10 mL de meio RPMI 1640 contendo 5% de SFB, 2 mM de glutamina e 50  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol, para a lavagem das células seguida por mais uma centrifugação a 1000 x g por 5 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 5 mL de meio RPMI 1640 contendo 5% de SFB, 2 mM de glutamina e 50  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol. As células foram contadas em câmara de Neubauer.

#### 3.6.4 Análise histopatologia das patas dos animais com CIA

As patas dos animais foram removidas e submetidas ao procedimento histológico. Primeiramente o material foi fixado em formaldeído 4% tamponado (tampão fosfato de Na 10 mM pH 7,4) durante sete dias. Depois, o material foi lavado em água corrente por 30 minutos e descalcificado com ácido nítrico 10% durante no mínimo seis dias ou até perderem a rigidez. As patas foram então lavadas em água corrente, depois clivadas em metades e desidratadas através de imersões subsequentes em soluções de concentração crescente de etanol (70%, 90%, 100%, 100%) por 1 h cada uma. Em seguida as patas foram clarificadas em xilol por 2 horas. Para inclusão das peças, após o xilol, as patas foram imersas em dois banhos de parafina, por 1 h cada. Após o segundo banho, as patas foram imersas em blocos de parafina e secos sob resfriamento. Os blocos então foram cortados com o auxílio do micrótomo. Os cortes histológicos com espessura de 5  $\mu\text{m}$  foram corados convencionalmente com hematoxilina e eosina e posteriormente fotografados.

#### 3.7 **Ensaio de proliferação de esplenócitos**

A atividade anti-proliferativa do EEPpg sobre os esplenócitos foi avaliada através do teste de redução do MTT. Os esplenócitos foram obtidos a partir de camundongos DBA/1J machos. Inicialmente, o animal foi eutanasiado, seu baço retirado e picotado com o auxílio da tesoura. Em seguida, as células foram dispersas em 5 mL de meio RPMI 1640 contendo 5% de SFB, 2 mM de glutamina e 50  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol, com auxílio de tela de 200 mesh e de um bastão de borracha. A suspensão celular obtida foi transferida para um tubo Falcon, onde foram adicionados 10 mL de tampão ACK (145 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM de  $\text{KHCO}_3$  e 2 mM de EDTA) para a lise das hemácias. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 1000 x g

por 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e, então, se adicionou 10 mL de meio RPMI 1640 diluído em PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, pH 7,4) para a lavagem das células seguida por mais uma centrifugação a 1000 x g por 5 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 5 mL de meio RPMI 1640 contendo 5% de SFB, 2 mM de glutamina e 50 µM de β-mercaptoetanol. As células foram contadas em câmara de Neubauer e adicionadas em placas de 96 poços a uma concentração de 2x10<sup>6</sup> células/mL (100 µL/poço), estimuladas com Concanavalina A (5 µg/mL) ou Lipopolissacarídeo (10 µg/mL) e expostas a diferentes concentrações do EEPpg (0,1; 1; 5; 10 e 20 µg/mL) por 48 h em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Ao término do período de 48 h, adicionou-se 10 µL da solução de MTT 5 mg/mL e incubou-se por 2 h. Os cristais de formazana obtidos a partir da oxidação do MTT foram solubilizados pela adição de 100 µL de solução de SDS 10% contendo HCl 0,01 N. Após solubilizar os cristais, a absorvância foi lida no comprimento de onda de 570 nm em leitor de microplacas. Os resultados estão expressos em percentual de viabilidade, calculado em função da absorvância obtida pelo grupo controle, o qual foi considerado como 100%.

### 3.8 Análise do ciclo celular

As células do baço (2 x 10<sup>6</sup> células/mL) de camundongos DBA/1J machos foram cultivadas em RPMI 1640 suplementado com 2 mM de glutamina e 50 µM de β-mercaptoetanol, na presença de 5% de SFB e 10 µL de Con A, na ausência ou presença das amostras de EEPpg, nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL, em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup>, volume total de 10 mL/garrafa, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, atmosfera úmida, por 48 horas. Após incubação, as células vivas (refringentes) foram contadas em câmara de Neubauer. Uma alíquota da suspensão celular de cada condição estudada, contendo 1 x 10<sup>6</sup> células, foi centrifugada (400 x g, 5 min) e depois suspensa em 500 µL de solução em tampão citrato a 43 mM contendo iodeto de propídeo (PI) a 50 µg/mL e Triton X-100 a 0,3%, permanecendo à temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luz. O PI se liga no DNA, permitindo assim avaliar as fases do ciclo celular em função da intensidade de sua fluorescência. Em seguida, adicionou-se 500 µL de solução de RNase 100 µg/mL em tampão citrato 43 mM, e deixou-se incubando por mais 15 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (100.000 eventos por ponto), laser de argônio 488 nm, no canal de fluorescência 2 (FL2) - 585 ± 15 nm. A aquisição foi realizada com o programa Cellquest – Pro e a análise dos resultados com o programa WinMDI 2.8. Os

fragmentos de núcleo e *doublets* foram descartados da análise após seleção em FSC x FL2 (ou FL3) seguido de FL2-a x FL2-w.

### 3.9 Avaliação do nível de apoptose – Anexina V e PI

O nível de apoptose foi avaliado segundo a externalização do fosfolípido fosfatidilserina na membrana plasmática. Primeiramente, as células ( $2 \times 10^6$ /mL) foram tratadas e cultivadas por 48 h nas mesmas condições utilizadas no estudo de ciclo celular, conforme citado anteriormente. Ao final do experimento, as células ( $5 \times 10^5$ ) de cada condição foram lavadas com PBS e suspensas em 250 mL de tampão de ligação (HEPES 10 mM/NaOH, pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM). Posteriormente, 100 µL contendo  $2 \times 10^5$  células foram transferidos para tubos de citometria. Em cada tubo, adicionou-se 2,5 µL da anexina V – FITC (25 µg/mL) e 1 µL de PI (100 µg/mL), misturou-se gentilmente, e incubou-se por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido este tempo, foram adicionados 400 µL de tampão de ligação em cada tubo e as células foram analisadas, por citometria de fluxo. A aquisição das células ( $\leq 100.000$  eventos por amostra) foi feita com o programa Cellquest – Pro. A fluorescência do PI foi detectada pelo canal FL2 (banda  $585 \pm 15$  nm). A fluorescência da Anexina foi detectada pelo canal FL1 (banda  $535 \pm 15$  nm). Os resultados foram analisados com programa WinMDI 2.8.

### 3.10 Modelo de mielopoiese induzida por adjuvante completo de Freund (AFC)

Estudos anteriores (Buhles e Moshe, 1978; Matthys *et al.*, 1999) serviram como base para o desenvolvimento deste modelo em nosso laboratório (LIA-BPPN). Animais C57BL/6 foram submetidos à injeção no dorso, i.d, com 100 µL de AFC emulsificado (1:1 v/v) em PBS pH 7,4. Seis dias depois os animais foram eutanasiados e seus baços removidos. As células do baço foram dispersas em 15 mL de meio RPMI 1640 diluído em PBS estéril (1:2 v/v). O extrato celular foi centrifugado a  $1000 \times g$  por 5 minutos, em seguida o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular suspenso em 10 mL do mesmo meio. As células foram contadas em câmara de Neubauer. As células ( $1,0 \times 10^6$ ) foram marcadas com anticorpo anti-CD32/16 para evitar ligações inespecíficas, seguido por marcação com anticorpo anti-CD11b (Mac-1) acoplado a PE. Em seguida, as células foram analisadas por citometria de fluxo. A aquisição das células (200.000 eventos por amostra) foi feita com o programa Cellquest – Pro.

A fluorescência do anticorpo Mac-1 foi detectada pelo canal FL2 (banda  $585 \pm 15$  nm). Os resultados foram analisados com programa WinMDI 2.8.

### **3.11 Avaliação do efeito do EEPpg sobre o número de células Mac-1<sup>+</sup> no baço e no peritônio após injeção com AFC**

Camundongos DBA/1J foram tratados durante 10 dias com doses (0,001 e 0,01 mg/kg) do EEPpg. No 5º dia de tratamento, os animais foram submetidos à injeção no dorso, i.d, com 100 µL de AFC emulsificado em PBS (1:1 v/v). No 11º dia os animais foram eutanasiados tiveram a cavidade peritoneal lavada com PBS contendo 2 mM EDTA e seus baços removidos. As células do baço foram dispersas em 15 mL de meio RPMI 1640 diluído em PBS estéril (1:2 v/v) com 5% SFB. O suspensão celular do baço e as células do lavado peritoneal foram centrifugados a 1000 x g por 5 minutos, em seguida o sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 10 mL e 1mL do mesmo meio, respectivamente. As células foram contadas em câmara de Neubauer e marcadas ( $1,0 \times 10^6$ ) em meio com 5% SFB com anticorpo anti-CD32/16, seguido pela marcação com anticorpo anti-CD11b (Mac-1) marcado com ficoeritrina (PE) e analisadas por citometria de fluxo. A aquisição das células (200.000 eventos por amostra) foi feita com o programa Cellquest – Pro. A fluorescência do anticorpo anti Mac-1 foi detectada pelo canal FL2 (banda  $585 \pm 15$  nm). Os resultados foram analisados com programa WinMDI 2.8.

### **3.12 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada e os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão. Nos experimentos contendo vários grupos, a análise da variância dos resultados entre os grupos foi realizada pelo teste One-way ANOVA e a comparação múltipla entre os grupos pelo teste de Tukey. Diferenças relacionadas ao grupo controle foram calculadas usando o teste de comparação múltipla de Dunnett. Quando a análise estatística era entre dois grupos somente, utilizou-se o teste *t* de Student. Valores com  $p < 0,05$  foram considerados significativos (Dawson-Saunders & Trapp, 1994). Foram utilizados os programas Microsoft® Office Excel, GraphPad Prism® 5 for Windows e WinMDI 2.8.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Rendimento do EEPpg

A extração do óleo dos frutos de *P. polygalaeflorus* em etanol 100%, resultou num extrato com massa recuperada de 33,9% em relação à massa inicial.

### 4.2 Caracterização fitoquímica do EEPpg

#### 4.2.1 Análise por cromatografia em camada delgada do EEPpg

A análise do EEPpg por cromatografia em camada delgada, mostrada na Figura 7, foi realizada a fim de avaliar a presença de compostos em geral, de flavonoides e de terpenoides no extrato.

A revelação de compostos gerais no extrato por sulfato de cério mostrou separação eficiente do EEPpg. A presença de várias bandas indica coexistência de vários compostos com polaridades diferentes, ou seja, baixa (elevada migração) e alta polaridade (próximo ao ponto de aplicação). As mobilidades relativas das bandas (*rate flow* ou Rf) são mostradas na Tabela 1.

A presença de flavonoides no EEPpg analisada através de revelação por NP-PEG foi evidenciada por bandas alaranjada e esverdeada após a separação com acetato de etila:diclorometano que sugere sua presença no EEPpg. A análise com vanilina mostrou a presença de várias bandas de polaridades diferentes, o que sugere que o EEPpg apresenta uma grande variedade de terpenoides. Na Tabela 1 encontram-se os valores de Rf correspondentes a cada banda revelada.



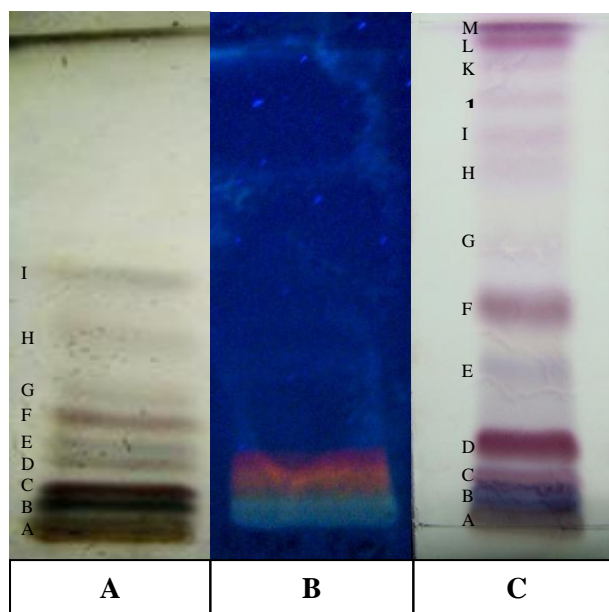


Figura 7 – Análise por cromatografia em camada delgada (TLC) do EEPpg. As cromatografias foram desenvolvidas em placa de sílica gel 60 com 3 x 7 cm. **A.** Placa de TLC revelada para compostos gerais. Como solvente utilizou-se acetona:éter de petróleo (1:9 v/v) e como revelador, sulfato de cério 1% em ácido sulfúrico 1,5%. **B.** Placa de TLC revelada para flavonoides. Para a revelação a placa foi aspergida com NP:PEG. **C.** Placa de TLC revelada para terpenoides. Para a revelação utilizou-se vanilina 0,2% seguida por ácido sulfúrico 5%. Em ambas as TLCs reveladas para flavonoides e terpenoides, foi utilizado diclorometano:acetato de etila (9:1 v/v) como solvente.

Tabela 1 – Valores de Rf do EEPpg obtidos por TLC em sílica gel 60.

Bandas	Rf (cm)	
	Revelação para compostos gerais	Revelação para terpenoides
A	0,037	0,029
B	0,075	0,056
C	0,100	0,103
D	0,150	0,162
E	0,187	0,323
F	0,225	0,441
G	0,275	0,544
H	0,412	0,713
I	0,562	0,779
J	-	0,853
K	-	0,919
L	-	0,948
M	-	0,978

#### 4.2.2 Análise do perfil cromatográfico do EEPpg por HPLC-DAD e GC-MS

Para análise por HPLC foi utilizada uma coluna de fase reversa C18. O monitoramento foi realizado através de dois comprimentos de onda (Figura 8). O cromatograma do EEPpg por HPLC apresentou um único pico majoritário no final da corrida com tempo de retenção ( $T_r$ ) em 25,656 min, quando monitorado no comprimento de onda de 254 nm, que também absorveu em 220 nm. No comprimento de 220 nm o EEPpg mostrou um perfil com vários picos, que apareceram entre 14 e 26 min. Estes tempos de retenção ratificam a presença de compostos com características mais apolares no EEPpg. Os tempos de retenção obtidos desta amostra por HPLC estão sumarizados na Tabela 2.

O cromatograma obtido por GC/MS foi utilizado para análise de compostos voláteis presentes no EEPpg. O EEPpg mostrou um cromatograma complexo, com picos predominantes entre 5 e 10 min e entre 19 e 29 min de corrida (Figura 9) dentre os quais foi identificada a presença de hidrocarbonetos saturados e insaturados, sesquiterpenos e de farneseno, após a comparação dos fragmentogramas com a biblioteca de espectros de massa NIST acoplada ao aparelho. A Tabela 3 mostra os valores dos tempos de retenção observados e os compostos do EEPpg que puderam ser identificados através do GC/MS (NIST).

### 4.3 **Estudo do efeito do EEPpg sobre a artrite induzida por colágeno**

#### 4.3.1 Efeito do EEPpg sobre o desenvolvimento e a severidade da CIA

A CIA foi induzida nos camundongos DBA/1J machos através da injeção de CII, purificado de esterno de galináceos, emulsificado em AFC. A CIA pode ser observada visualmente nos camundongos através do edema das patas dianteiras e traseiras (Figura 10).

O desenvolvimento da artrite nos camundongos que receberam v.o. etanol 15% iniciou-se 8 dias após a segunda injeção com CII (29º dia), e apresentou pico máximo de edema no 40º dia, com o índice de artrite (IA) atingindo 170,48%. Logo após, iniciou-se um declínio espontâneo da CIA (Figura 11A). Foram considerados artríticos os camundongos que atingiram IA igual ou superior a 30%.

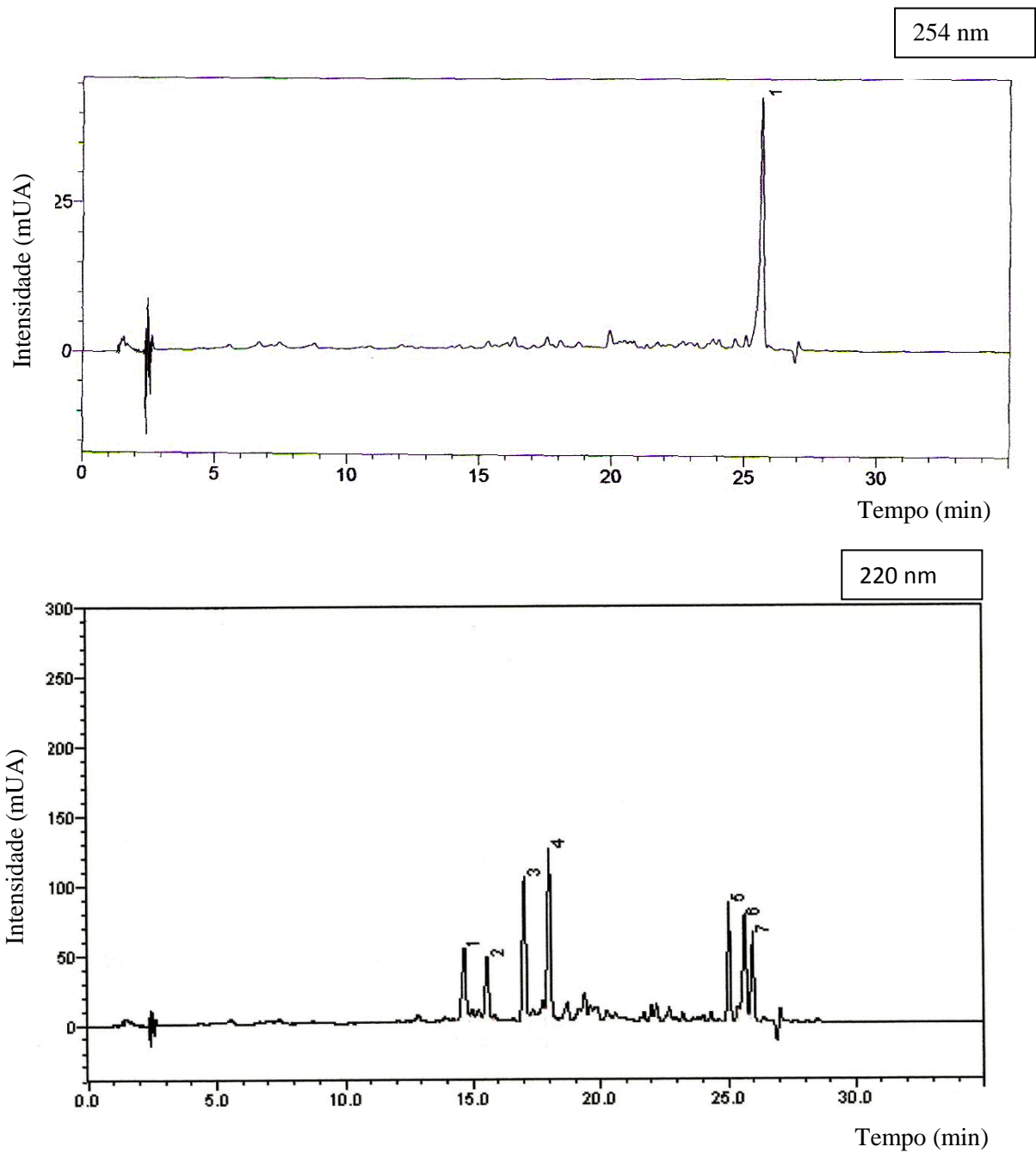


Figura 8 – Cromatogramas do EEPpg obtidos por HPLC em coluna C18 monitorada em 254 e 220 nm. Foi utilizada uma coluna C18 Kromasil 100 A (4,6 x 250 mm) e como fase móvel acetonitrila/água (gradiente de acetonitrila 30-100% com fluxo de 1 mL/min).

Tabela 2 – Tempo de retenção dos picos principais dos cromatogramas do EEPpg obtidos por HPLC monitorada a 220 e 254 nm relativos à Figura 8.

<b>EEPpg</b>			
<b>Pico</b>	<b>T<sub>r</sub> (min)</b>	<b>Pico</b>	<b>T<sub>r</sub> (min)</b>
	<b>220 nm</b>		<b>254 nm</b>
1	14,675	1	25,656
2	15,557		
3	17,027		
4	18,007		
5	25,031		
6	25,657		
7	25,958		

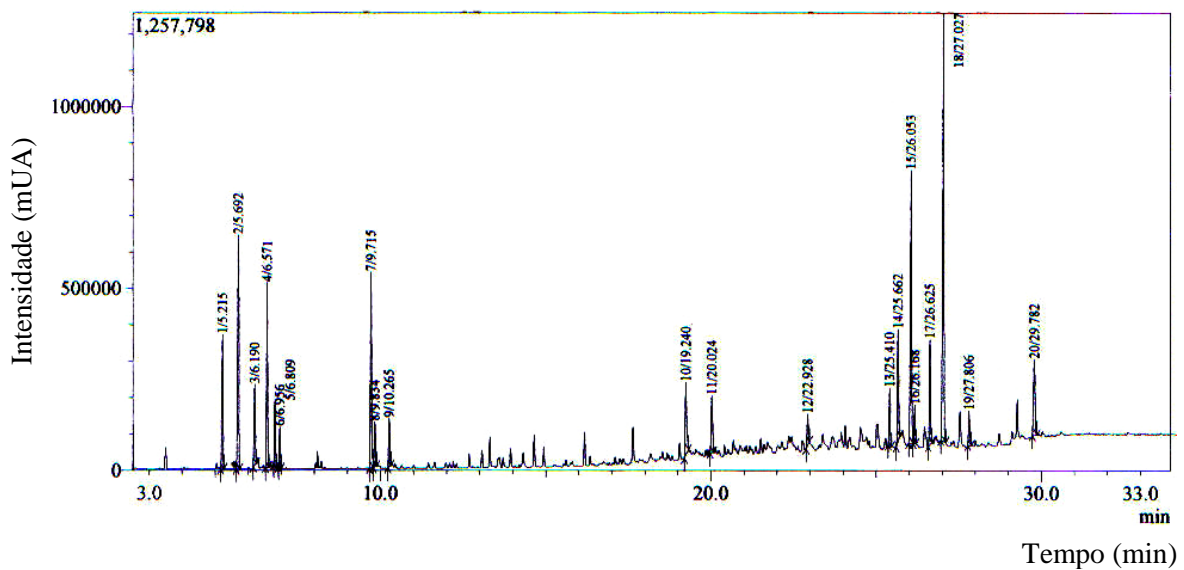


Figura 9 – Cromatograma do EEPpg por GC/MS. Foi utilizada uma coluna capilar Rester RTX – 5 MS (30 m x 0,25 mm de d.i. e 0,25  $\mu$ m d.f.) e hélio como gás de arraste com fluxo constante de 1 mL/min. Aplicados 2  $\mu$ L de amostra a 1 mg/ mL.

Tabela 3 – Nome e Tr dos compostos identificados no EEPpg por GC/MS.

Tr (min)	Composto
5,22	1-Metilenil
5,69	Cariofileno
6,19	1,6-Ciclodecadieno
6,57	1- metiletil
6,80	1-Metiletilideno
6,96	Ciclohexano
9,72	2-�cido Propen�ico
9,83	�cido Propanóico
10,27	1,6,10-Dodecatrieno
19,24	Biciclo[5.2.0]nonano
20,02	-
22,93	-
25,41	-
25,66	-
26,05	-
26,17	-
26,63	-
27,03	-
27,81	-
29,78	-



Figura 10 – Visualização do edema das patas dos camundongos DBA/1J com CIA e tratado com EEPpg. **A.** camundongo sadio com pata sem edema e eritema. **B.** camundongo com CIA mostrando edema e hiperemia nas patas traseiras e nas patas dianteiras, exibindo também edema e eritema em apenas um dígito. **C.** Visão lateral da pata traseira de camundongo com CIA tratado com etanol 15%. **D.** Visão lateral da pata traseira de camundongo com CIA tratado com EEPpg 0,1 mg/kg p.c.. **E.** Pata dianteira hiperedemaciada e hiperemiada de camundongo com CIA. **F.** Visão subplantar de pata traseira edemaciada de camundongo com CIA.

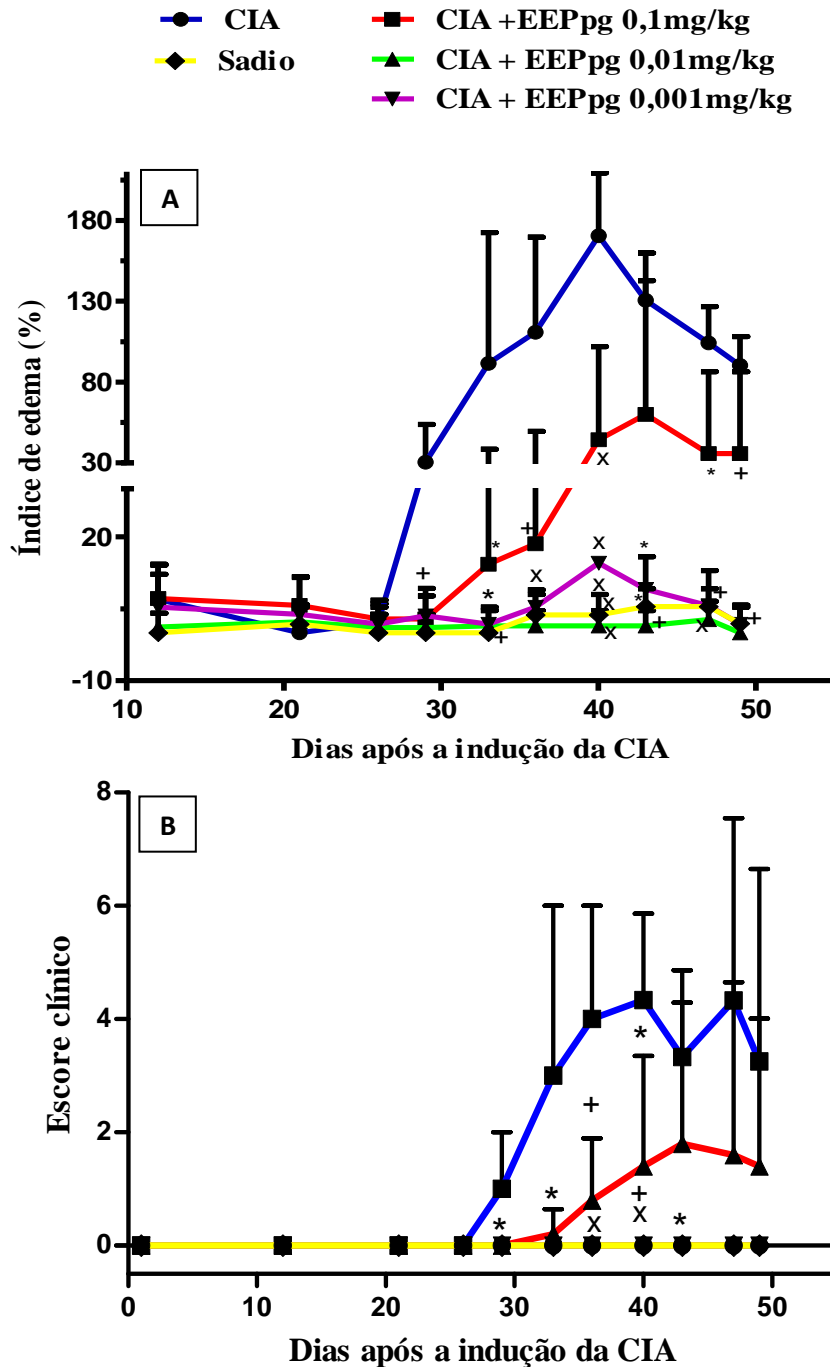


Figura 11 – Efeito do EEPpg sobre (A) o desenvolvimento e (B) a severidade clínica da CIA. Camundongos DBA/1J foram divididos em cinco grupos, dos quais quatro receberam no dorso i.d. 2 mg de CII emulsificado em AFC (1:2 v/v) no dia 0 e 4 mg de CII i.p. no 21º dia. O controle positivo da artrite (CIA; n = 6) foi tratado com etanol 15%. Os grupos tratados com EEPpg (CIA + EEPpg) correspondem às doses 0,1 mg/kg (n=5), 0,01 mg/kg (n=5) e 0,001 mg/kg (n=4). O grupo de animais saudáveis (Sadio) não recebeu tratamento. O tratamento foi realizado oral e diariamente do 21º ao 49º dia. Sinais clínicos, como a intensidade de edema, intensidade de eritema e formação de anquiloses nas articulações dos camundongos DBA/1J com CIA foram avaliados ao longo do experimento. Foram considerados no controle positivo apenas os dados dos animais com índice de artrite acima de 30 %. Média  $\pm$  D.P. (\*)  $p < 0,05$ , (†)  $p < 0,01$  e (x)  $p < 0,001$  em relação ao grupo CIA, pelo teste de Tukey.

O tratamento dos camundongos com CIA pelo EEPpg reduziu significativamente o IA em todas as doses (Figura 11A). As doses 0,01 e 0,001 mg/kg foram capazes de tratar 100% dos camundongos com CIA e inibiram 99% e 92% no 40º dia de desenvolvimento da CIA ( $p < 0,001$ ), respectivamente, porém a dose 0,1 mg/kg tratou somente 60% dos camundongos com CIA (IA inferior a 30%), inibindo em até 74% o desenvolvimento da doença ( $p < 0,01$ ). Neste grupo o pico de edema foi mais tardio, no 43º dia (IA= 60%), com uma subsequente queda suave da doença.

O início do desenvolvimento da CIA é caracterizado pelo aparecimento dos sinais clínicos, como edema e eritema. Estes se iniciaram no grupo CIA no 29º dia após a primeira imunização com CII, atingindo valor máximo ( $4,33 \pm 1,52$ ) no 40º dia após a primeira imunização (Figura 11B). Nos grupos CIA tratados com EEPpg, a severidade da doença, representada pelo escore, foi reduzida significativamente. Os camundongos tratados com as doses 0,01 e 0,001 mg/kg não mostraram sinais clínicos evidentes. A dose 0,1 mg/kg de EEPpg foi capaz de melhorar 58% da severidade da CIA ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.2 Efeito do EEPpg sobre alterações histopatológicas das patas dos camundongos com CIA

Na Figura 12 observa-se a estrutura articular típica de camundongo DBA/1J sadio com aumento de 100 x. Nota-se o tecido sinovial composto pela membrana sinovial constituída por poucos sinoviócitos, em espessura, e camada subsinovial rica em tecido adiposo e fibroso.

A Figura 13A mostra a estrutura articular sinovial de camundongo DBA/1J com CIA com aumento de 100 x. Observa-se um espessamento da membrana sinovial (ou sinovite proliferativa) devido à proliferação dos sinoviócitos, característica típica da doença, e um infiltrado de leucócitos, polimorfonucleares e principalmente leucócitos mononucleares na camada subsinovial e, conseqüentemente, formação do *pannus* sinovial que invade o espaço articular, sendo responsável pela destruição da cartilagem adjacente e erosão óssea observados. Versão amplificada (400x) do infiltrado inflamatório e do *pannus* sinovial pode ser vista nas Figuras 13B e 13C, respectivamente.



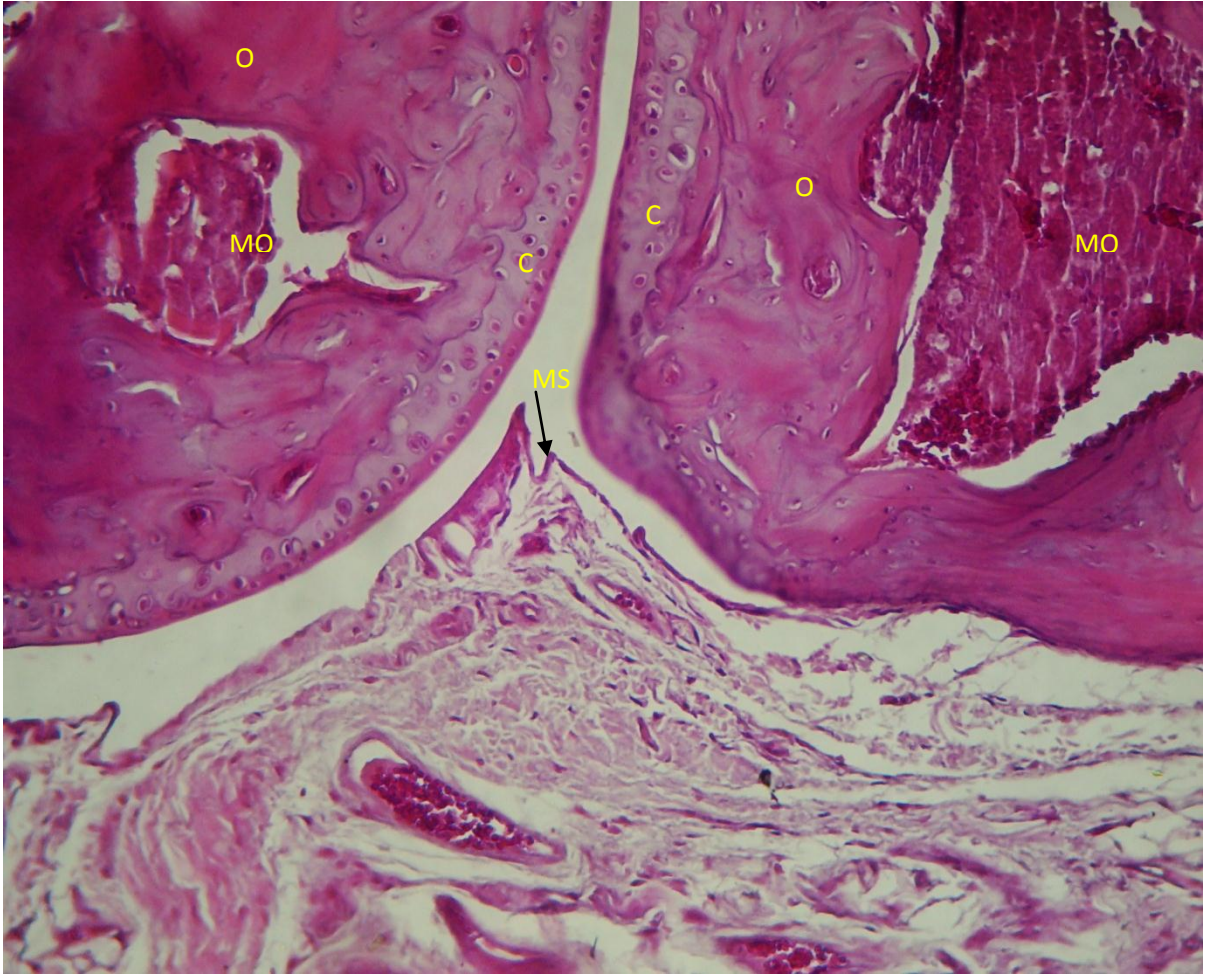


Figura 12 – Análise histológica da pata de camundongo DBA/1J sadio. Secção histológica típica da articulação de pata traseira de camundongo sadio corada com hematoxilina e eosina. Componentes da articulação sinovial são mostrados: osso (O), cartilagem (C) e membrana sinovial (MS). A membrana sinovial de espessura fina com poucas células e camada subsinovial com a presença de tecido adiposo e fibroso são características típicas da articulação da pata em condições saudáveis. MO – medula óssea. (100x).



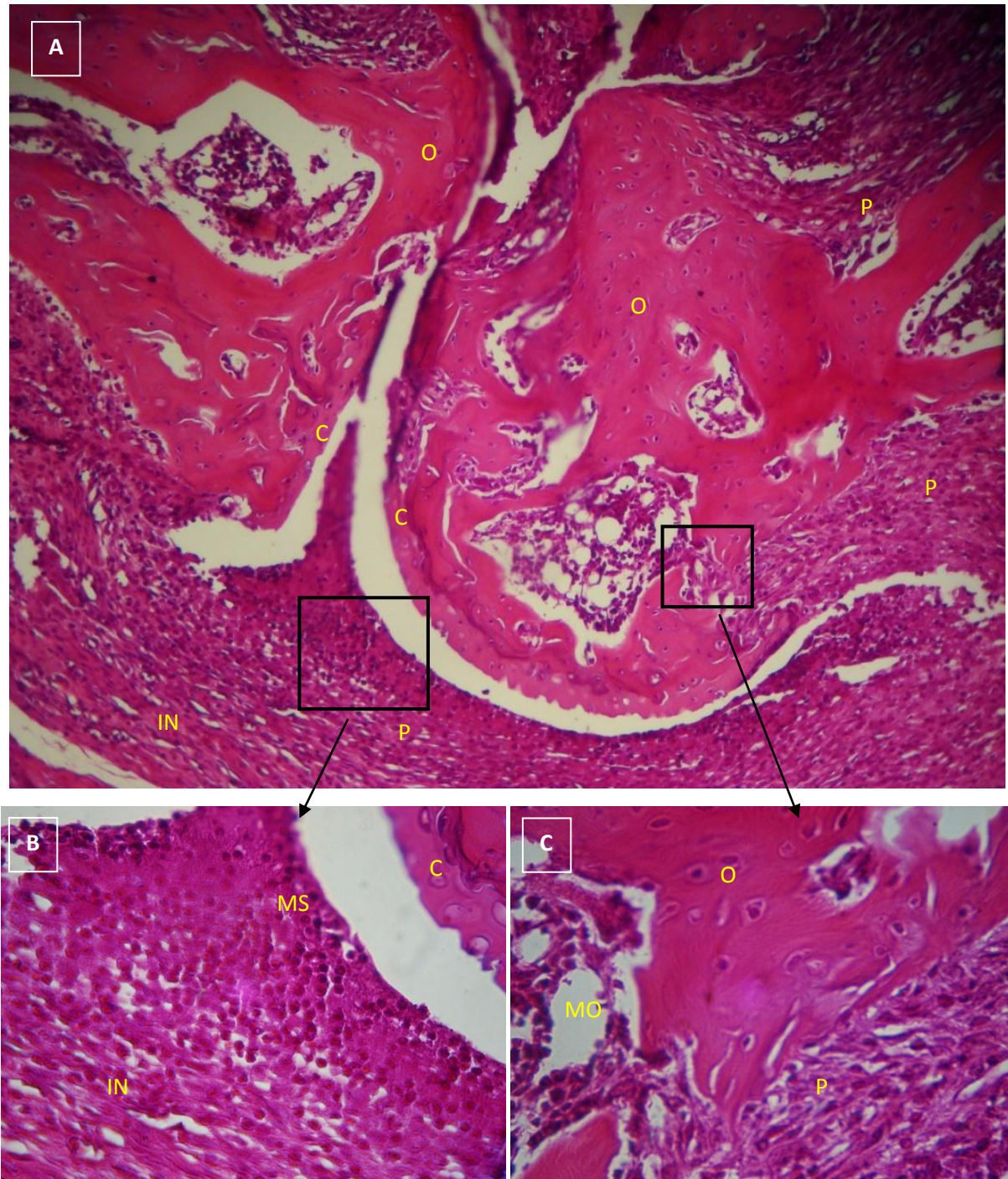


Figura 13 – Análise histopatológica da pata de camundongo com CIA. O grupo CIA recebeu apenas o veículo EtOH 15% como tratamento v.o. desde a segunda injeção com CII até o final do experimento. **A.** Secção histológica da pata traseira de camundongo com CIA, mostrando um espessamento da membrana sinovial (MS), infiltrado de leucócitos (IN) na camada subsinovial, invasão da cartilagem (C) e do osso (O) pelo *pannus* (P) e resultante destruição da estrutura articular (aumento de 100 x). **B.** Visão amplificada (aumento de 400 x) do espessamento da membrana sinovial e infiltrado celular, principalmente células mononucleares. **C.** Visão da invasão do *pannus* e destruição da matriz óssea (aumento de 400 x). MO – medula óssea.

A eficiência do EEPpg na CIA foi demonstrada pela análise histopatológica das patas dos camundongos com CIA tratados com o extrato (Figura 14, aumento de 100 x). Na Figura 14A observa-se a estrutura articular de camundongos com CIA tratados com EtOH 15% durante 28 dias após a segunda injeção com CII. Como já demonstrado na Figura 13A, também nota-se a formação do *pannus* sinovial, resultante da hiperplasia de células da membrana sinovial e pela infiltração de leucócitos, principalmente células mononucleares. O *pannus* encontra-se aderido a cartilagem promovendo a destruição desta e do osso subcondral. Os tratamentos com EEPpg nas doses de 0,01 mg/kg (Figura 14B) e 0,001 mg/kg (Figura 14C) mostram efeito protetor da articulação sinovial em relação aos não tratados, exercendo uma inibição na formação do *pannus* e infiltração celular. A membrana sinovial mostra-se delgada, e com tecido adiposo na camada subsinovial, assemelhando-se a estrutura articular típica de camundongo sadio mostrada na Figura 12. Notou-se apenas uma sinovite de baixa intensidade.

#### 4.3.3 Efeito subagudo do EEPpg sobre o peso dos órgãos de camundongos com CIA

Na Tabela 4 estão expressos os valores médios relativos e absolutos dos órgãos dos camundongos DBA/1J sadios ou com CIA, tratados com veículo ou com as diferentes doses do EEPpg relacionados ao peso corporal após 49 dias da primeira imunização com CII. No final de 49 dias, os camundongos DBA/1J dos grupos tiveram seus órgãos extirpados e pesados, a fim de avaliar se o EEPpg promoveu alterações no peso destes órgãos, que pudessem sugerir algum efeito tóxico do EEPpg. Fígado e pulmão não mostraram nenhuma diferença significativa quanto aos seus pesos absolutos e relativos entre os grupos. Entretanto, houve uma diminuição do peso médio absoluto dos rins do grupo tratado com 0,1 mg/kg e 0,01 mg/kg quando comparados ao controle sadio.

Quanto aos órgãos linfoides primários e secundários, o grupo CIA apresentou um aumento significativo do peso absoluto dos linfonodos inguinais, poplíteos e braquiais ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente) e do peso relativo dos linfonodos inguinais e poplíteos ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente). Os grupos não mostraram diferença no peso relativo do timo, porém quanto ao peso absoluto deste órgão, o grupo CIA apresentou um leve aumento ( $p < 0,05$ ). Quanto ao peso relativo do baço, os grupos também não mostraram diferença, porém houve uma pequena redução do peso absoluto médio do baço de camundongos do grupo tratado com 0,001 mg/kg do EEPpg ( $p < 0,05$ ).



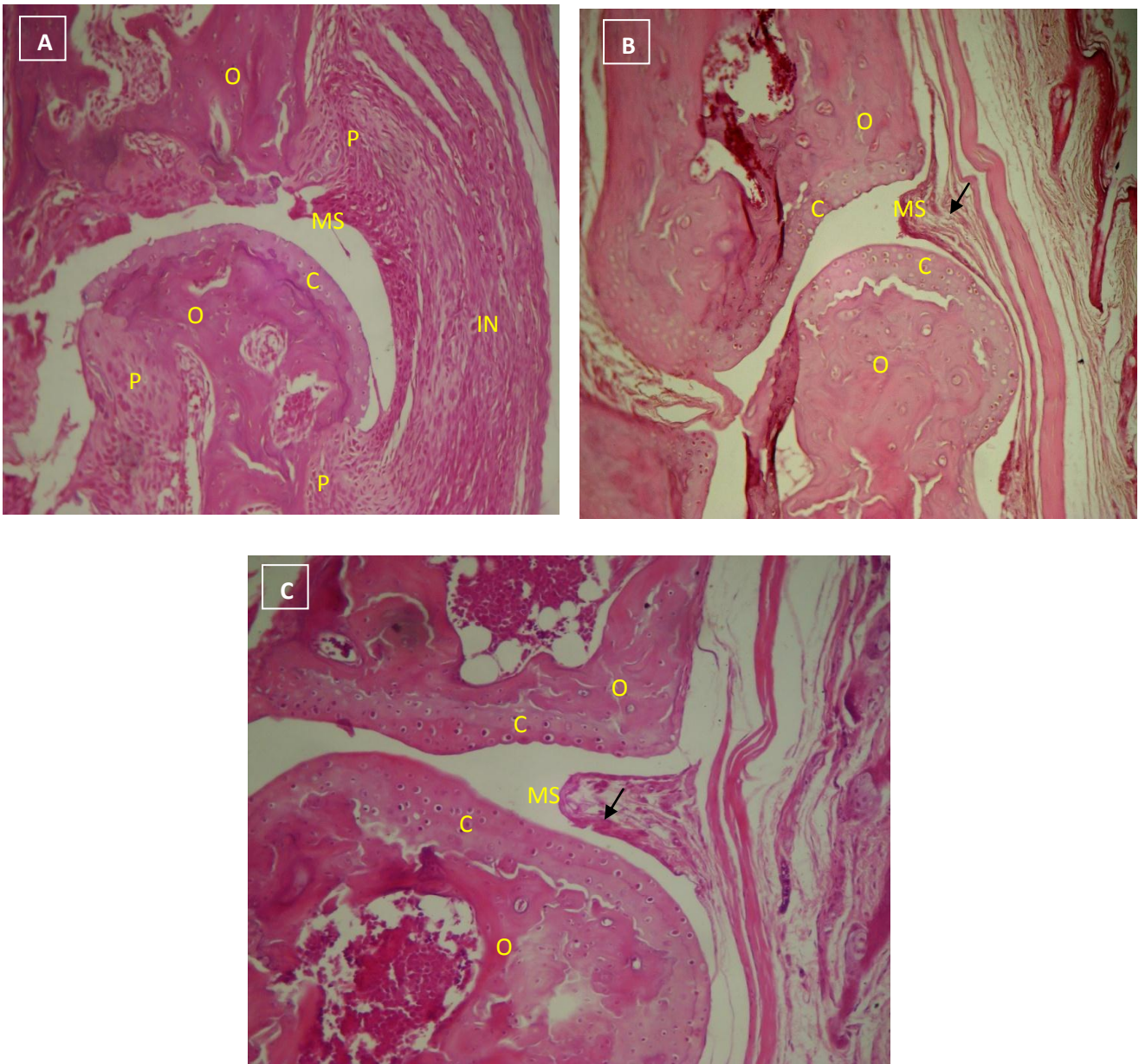


Figura 14 – Análise histológica das patas de camundongos DBA/1J com CIA tratados ou não com EEPPg. **A.** Pata traseira de camundongo com CIA tratado com EtOH 15% durante 28 dias após a segunda injeção com CII, mostrando a formação do *pannus* sinovial (P), resultante do espessamento da membrana sinovial (MS), infiltração de leucócitos (IN) e formação de novos vasos (não indicado). O *pannus* encontra-se instalado e aderido à cartilagem e promove a destruição da estrutura articular **B.** Pata traseira de camundongo com CIA tratado com 0,01 mg/kg p.c. do EEPPg. **C.** Pata traseira de camundongo com CIA tratado com 0,001 mg/kg p.c. do EEPPg. Em ambas as doses, observa-se uma semelhança com a articulação de camundongos saudáveis (Figura 12). Nota-se uma inibição da formação do *pannus*, existindo apenas uma sinovite de baixa intensidade (seta). C- cartilagem; O- osso. Cortes histológicos com aumento de 100 x.

Tabela 4 – Peso absoluto e relativo de órgãos de camundongos DBA/1J sadios, ou com CIA (após 49 dias) tratados oralmente com etanol 15% (CIA) ou com EEPpg.

	Sadios	CIA	EEPpg 0,1 mg/kg	EEPpg 0,01 mg/kg	EEPpg 0,001 mg/kg
<b>Peso absoluto (mg)</b>					
Peso Corporal (g)	20,64 ± 1,23	22,73 ± 1,66	20,10 ± 2,76	18,50 ± 0,83	19,20 ± 0,50
Fígado (g)	1,34 ± 0,10	1,45 ± 0,19	1,27 ± 0,16	1,18 ± 0,66	1,29 ± 0,11
Rins	245,86 ± 19,00	206,46 ± 26,84	192,60 ± 33,05 *	177,97 ± 13,84 **	220,74 ± 13,55
Pulmões	191,06 ± 33,94	174,30 ± 13,07	194,90 ± 64,82	193,30 ± 41,87	198,55 ± 62,85
Baço	146,10 ± 36,06	118,63 ± 8,67	108,25 ± 8,92	147,03 ± 19,44	90,10 ± 9,22*
Timo	11,02 ± 4,50 <sup>#</sup>	24,96 ± 10,41*	13,82 ± 3,01	10,62 ± 5,63	9,83 ± 2,61 <sup>#</sup>
Linfonodos inguinais	4,42 ± 0,99 <sup>###</sup>	14,98 ± 4,27***	7,06 ± 3,51 <sup>#</sup>	4,96 ± 2,47 <sup>##</sup>	4,92 ± 1,57 <sup>##</sup>
Linfonodos poplíteos	1,40 ± 0,27 <sup>##</sup>	4,23 ± 0,92**	2,50 ± 1,63	1,58 ± 0,64 <sup>#</sup>	1,00 ± 0,26 <sup>##</sup>
Linfonodos braquiais	3,53 ± 0,67 <sup>#</sup>	5,81 ± 1,86*	3,81 ± 0,41	2,45 ± 0,20 <sup>##</sup>	2,96 ± 0,23 <sup>##</sup>
<b>Peso relativo<sup>a</sup> (%)</b>					
Fígado	62,69 ± 1,53	63,75 ± 5,70	68,79 ± 13,18	64,44 ± 6,18	64,95 ± 1,95
Rins	11,83 ± 0,28 <sup>#</sup>	9,03 ± 0,57*	10,47 ± 2,46	9,63 ± 0,69	11,92 ± 0,66
Pulmões	10,49 ± 0,53	7,69 ± 0,52	10,33 ± 3,01	10,60 ± 2,84	8,34 ± 0,67
Baço	7,39 ± 1,91	5,29 ± 0,73	5,79 ± 0,34	7,75 ± 1,06	4,47 ± 0,33
Timo	0,51 ± 0,12	1,06 ± 0,39	0,75 ± 0,21	0,57 ± 0,30	0,59 ± 0,09
Linfonodos inguinais	0,23 ± 0,06 <sup>##</sup>	0,66 ± 0,19**	0,39 ± 0,22	0,26 ± 0,13 <sup>#</sup>	0,24 ± 0,09 <sup>#</sup>
Linfonodos poplíteos	0,07 ± 0,01 <sup>#</sup>	0,18 ± 0,03*	0,14 ± 0,10	0,09 ± 0,04	0,05 ± 0,00 <sup>#</sup>
Linfonodos braquiais	0,15 ± 0,02	0,26 ± 0,08	0,21 ± 0,03	0,13 ± 0,00 <sup>#</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>#</sup>

Sadio, n = 7; CIA, n = 3; EEPpg 0,1 mg/kg, 0,01 mg/kg e 0,001 mg/kg, n= 4. Valores representados pela média ± desvio padrão. <sup>a</sup>Peso do órgão em relação ao peso corporal. <sup>#</sup>p < 0,05, <sup>##</sup>p < 0,01, <sup>###</sup>p < 0,001, comparado com o grupo CIA pelo teste de Dunnett e \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, comparado com o grupo Sadio, após análise de variância pelo One-Way ANOVA.

#### 4.3.4 Efeito do EEPpg sobre o número de leucócitos totais no sangue de camundongos com CIA

No 49º dia de experimento, os sangues dos camundongos DBA/1J com CIA tratados com etanol 15% ou com as diferentes doses do EEPpg durante 28 dias foram coletados para determinação do número de células e ao mesmo tempo foram feitos esfregaços em lâminas para a contagem diferencial de leucócitos. A contagem das células do sangue mostrou um aumento significativo no grupo CIA em relação ao grupo sadio do número de leucócitos totais. Por sua vez, o tratamento com as doses 0,1 mg/kg, 0,01 mg/kg e 0,001 mg/kg p.c. do EEPpg reduziu significativamente ( $p < 0,001$ ) o número de leucócitos totais no sangue quando comparados ao grupo controle com CIA. Não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos tratados com as diferentes doses de EEPpg (Figura 15).

Não houve variação no percentual de monócitos, linfócitos e segmentados entre os grupos (Tabela 5), porém houve diferenças significativas no número absoluto dessas células nos esfregaços do sangue (Figura 16). O número absoluto dos segmentados, linfócitos e monócitos aumentou significativamente ( $p < 0,001$ ) no grupo CIA ( $3,7 \pm 0,6$ ;  $6,1 \pm 1,7$ ;  $0,9 \pm 0,2$  milhões, respectivamente) quando comparado ao grupo sadio ( $1,0 \pm 0,5$ ;  $0,6 \pm 0,2$ ;  $0,1 \pm 0,04$  milhões, respectivamente). O EEPpg entretanto inibiu de maneira significativa o aumento desses leucócitos no sangue, como mostrado na Figura 16.

#### 4.4 **Efeito do EEPpg sobre a proliferação *in vitro* de esplenócitos de camundongos DBA/1J machos induzida por diferentes mitógenos**

A estimulação de linfócitos por mitógenos é usada como modelo *in vitro* para avaliar a interferência de substâncias nos processos de ativação dos mesmos. A fim de avaliar os possíveis efeitos do EEPpg sobre a proliferação dos esplenócitos de camundongos da linhagem DBA/1J foi utilizado o ensaio do MTT, descrito nos Métodos. Os linfócitos foram estimulados com Con A, um mitógeno específico para linfócitos T, ou com LPS, um mitógeno específico para linfócitos B.

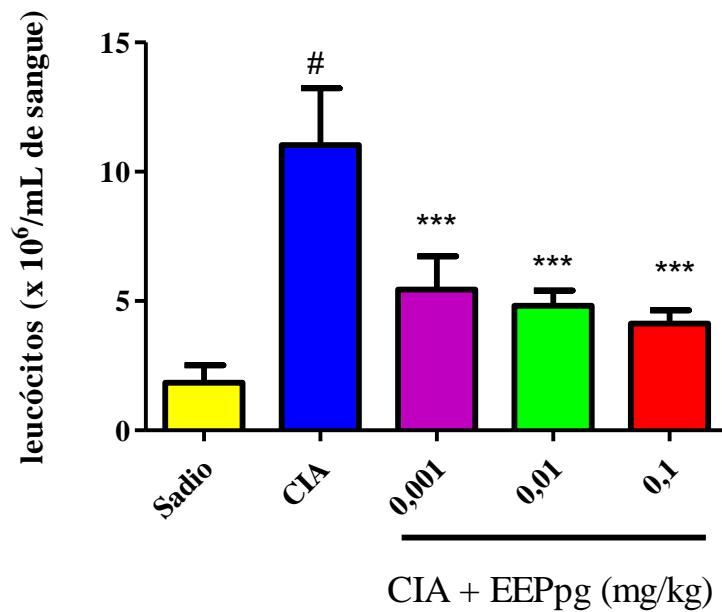


Figura 15 – Avaliação do efeito do EEPpg sobre os leucócitos totais do sangue de camundongos com CIA. O sangue foi removido, no final do experimento, por gotejamento da artéria carótida de camundongos DBA/1J com CIA tratados com etanol 15% ou com 0,1 mg/kg , 0,01 mg/kg ou 0,001 mg/kg p.c. EEPpg durante 28 dias e sadios. As células foram contadas e os dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Experimento representativo. \*\*\* $p < 0,001$ , comparado com o grupo controle CIA pelo teste de Tukey. # $p < 0,001$ , comparado ao grupo sadio pelo mesmo teste, ambos após análise de variância pelo teste One-way ANOVA.

Tabela 5 – Percentual de leucócitos no sangue dos camundongos DBA/1J sadios ou com CIA (após 50 dias) tratados com EtOH 15% ou EEPpg.

	Sadio	CIA	CIA + EEPpg 0,001 mg/kg	CIA + EEPpg 0,01 mg/kg	CIA + EEPpg 0,1 mg/kg
<b>Linfócitos (%)</b>	35,8 $\pm$ 16,2	54,6 $\pm$ 6,8	49,2 $\pm$ 7,4	36,7 $\pm$ 3,3	45,5 $\pm$ 7,5
<b>Monócitos (%)</b>	5,8 $\pm$ 1,3	8,6 $\pm$ 5,2	6,5 $\pm$ 1,3	4,7 $\pm$ 1,7	8,0 $\pm$ 2,7
<b>Segmentados (%)</b>	54,4 $\pm$ 16,1	34,0 $\pm$ 4,6	37,5 $\pm$ 6,4	52,7 $\pm$ 5,6	44,0 $\pm$ 4,5

Os valores estão expostos como médias e desvio padrão (sadio,  $n = 5$ ; CIA,  $n = 3$ ; CIA + EEPpg 0,1 mg/kg,  $n = 4$ ; CIA + EEPpg 0,01 mg/kg,  $n = 4$ ; CIA + EEPpg 0,001 mg/kg,  $n = 4$ ). Não existem diferenças significativas entre os grupos pelo teste One-way ANOVA.

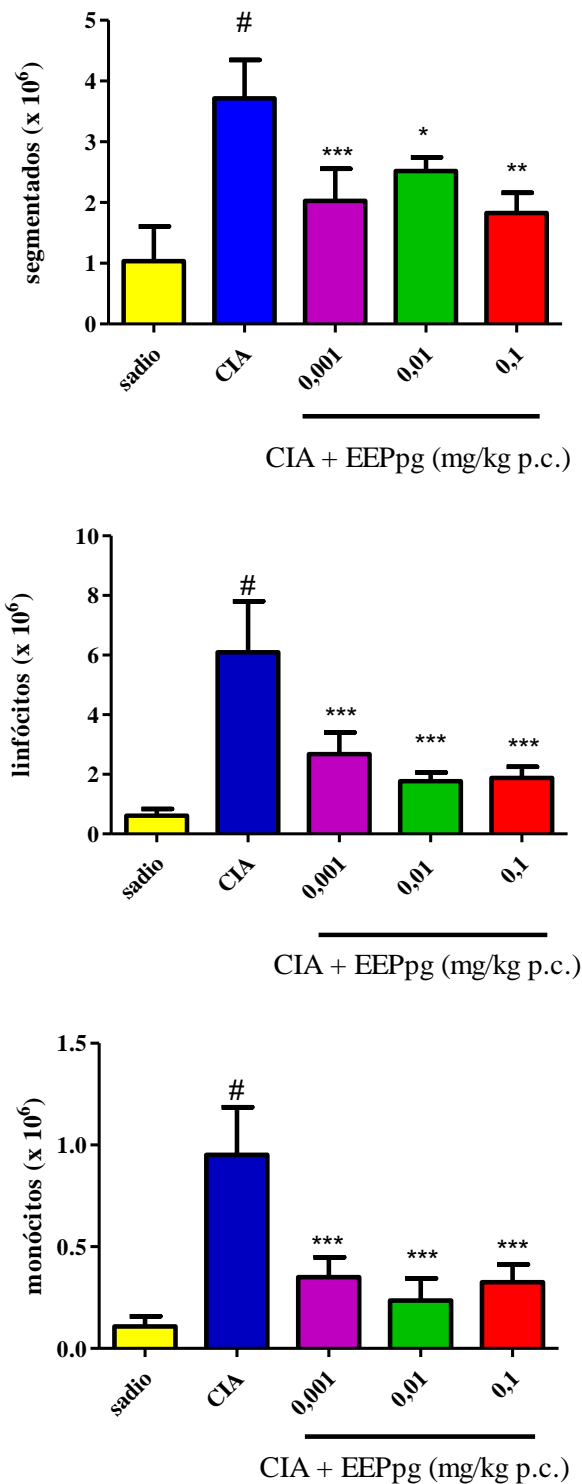


Figura 16 – Avaliação do efeito do EEPpg sobre os tipos de leucócitos do sangue de camundongos com CIA. No final do experimento foi feito um esfregaço de células do sangue de camundongos DBA/1J sadios ou com CIA tratados com etanol 15% ou com diferentes doses de EEPpg. As células foram contadas e os dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Experimento representativo. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , comparado com o grupo controle CIA pelo teste de Tukey. #  $p < 0,001$ , comparado ao grupo sadio pelo teste de Tukey, todos após análise de variância pelo teste One-way ANOVA.



O EEPpg mostrou potente efeito inibidor sobre a proliferação dos esplenócitos murinos induzida por Con A e por LPS (Figura 17). Na presença de Con A, o EEPpg reduziu em 29,7% a viabilidade dessas células na menor concentração (0,1 µg/mL) e foi ainda mais potente nas concentrações maiores, chegando a 67,3% de redução da viabilidade quando a 20 µg/mL (Figura 17B). Diferentemente, nos esplenócitos estimulados com LPS, o decréscimo da viabilidade celular foi notado somente nas concentrações a partir de 5 µg/mL (Figura 17C). Apesar disso, o efeito inibidor sobre a proliferação destas células nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL foi bastante alto (59,4%, 93,6%, 97,7%, respectivamente) comparado às células estimuladas com Con A nas mesmas concentrações.

O EEPpg também reduziu o número de células não estimuladas, nas concentrações de 5 µg/mL (Figura 17A), principalmente na concentração de 20 µg/mL (40,5% de viabilidade celular). Porém, esse percentual de morte, não foi superior nem igual ao efeito anti-proliferativo sobre os esplenócitos estimulados, sugerindo uma ação anti-proliferativa do EEPpg mais direcionada às células ativadas.

#### 4.5 Efeito do EEPpg sobre o ciclo celular

Com base na ação anti-proliferativa do EEPpg sobre linfócitos B (estimulados com LPS) e T (estimulados com Con A) do baço demonstrada no item anterior, decidiu-se avaliar o efeito EEPpg sobre o ciclo celular dos esplenócitos induzidos pela Con A por citometria de fluxo, após incubação das células com diferentes concentrações do EEPpg (5 µg/mL, 10 µg/mL e 20 µg/mL) e com Con A.

Na Figura 18, os histogramas mostram as distribuições dos núcleos de um experimento representativo em função da intensidade de fluorescência ao PI, proporcional ao conteúdo de DNA, indicando o percentual dos mesmos nas fases do ciclo celular. Na cultura controle observa-se o pico à esquerda como representativos dos núcleos com menor quantidade de DNA (menor fluorescência ao PI), correspondendo à fase G0/G1. A região intermediária e o pico à direita representam os núcleos na fase S e na fase G2/M, respectivamente (células em divisão).

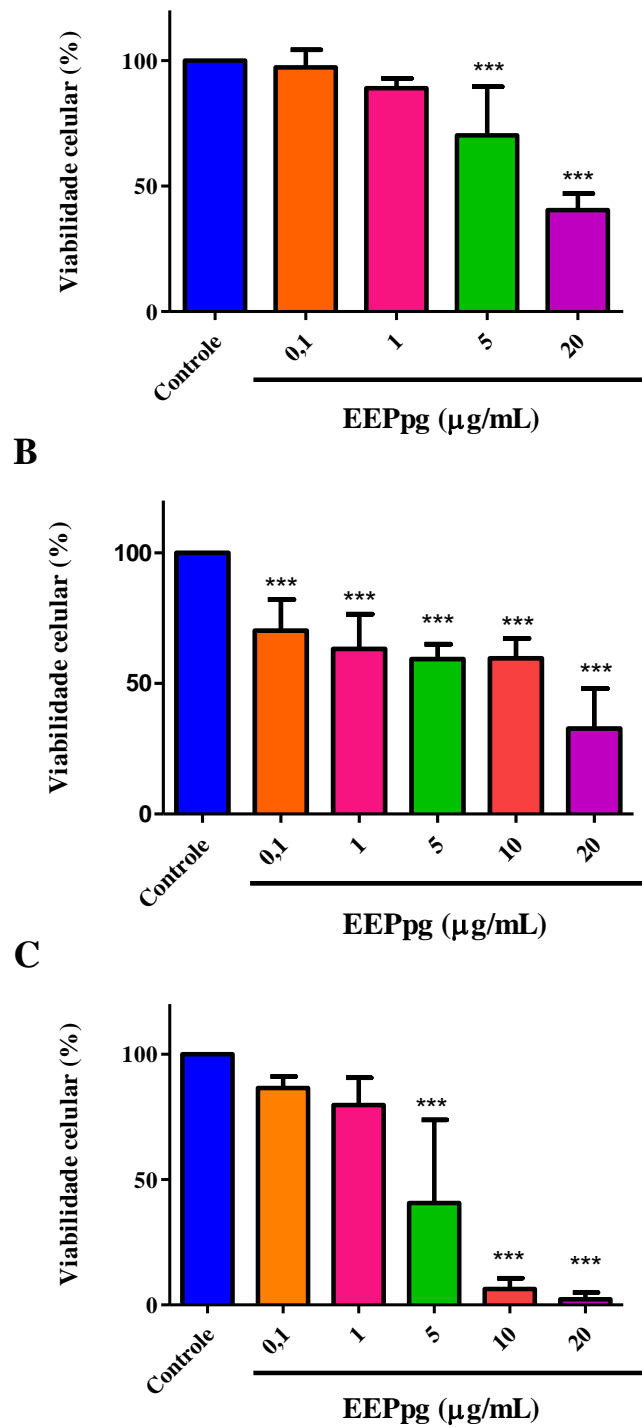


Figura 17 – Atividade anti-proliferativa do EEPpg sobre esplenócitos de camundongos DBA/1J. **A.** Células não estimuladas. **B.** Células estimuladas com Con A. **C.** Células estimuladas com LPS. Os baços de camundongos DBA/1J foram extirpados e suas células foram estimuladas com Con A ou LPS e incubadas com diferentes concentrações do EEPpg (0,1 µg/mL a 20 µg/mL). Após 48 h a viabilidade celular foi avaliada pela atividade redutora mitocondrial dos esplenócitos e os dados expressos como viabilidade celular (%). Absorvâncias dos grupos controles: sem estímulo -  $0,10 \pm 0,03$ ; com Con A -  $0,17 \pm 0,09$ ; com LPS -  $0,19 \pm 0,02$ . Média  $\pm$  D.P. de três experimentos. \*\*\* $p < 0,001$ , comparado ao controle (100%) pelo teste de Tukey, após análise de variância pelo One-Way ANOVA.

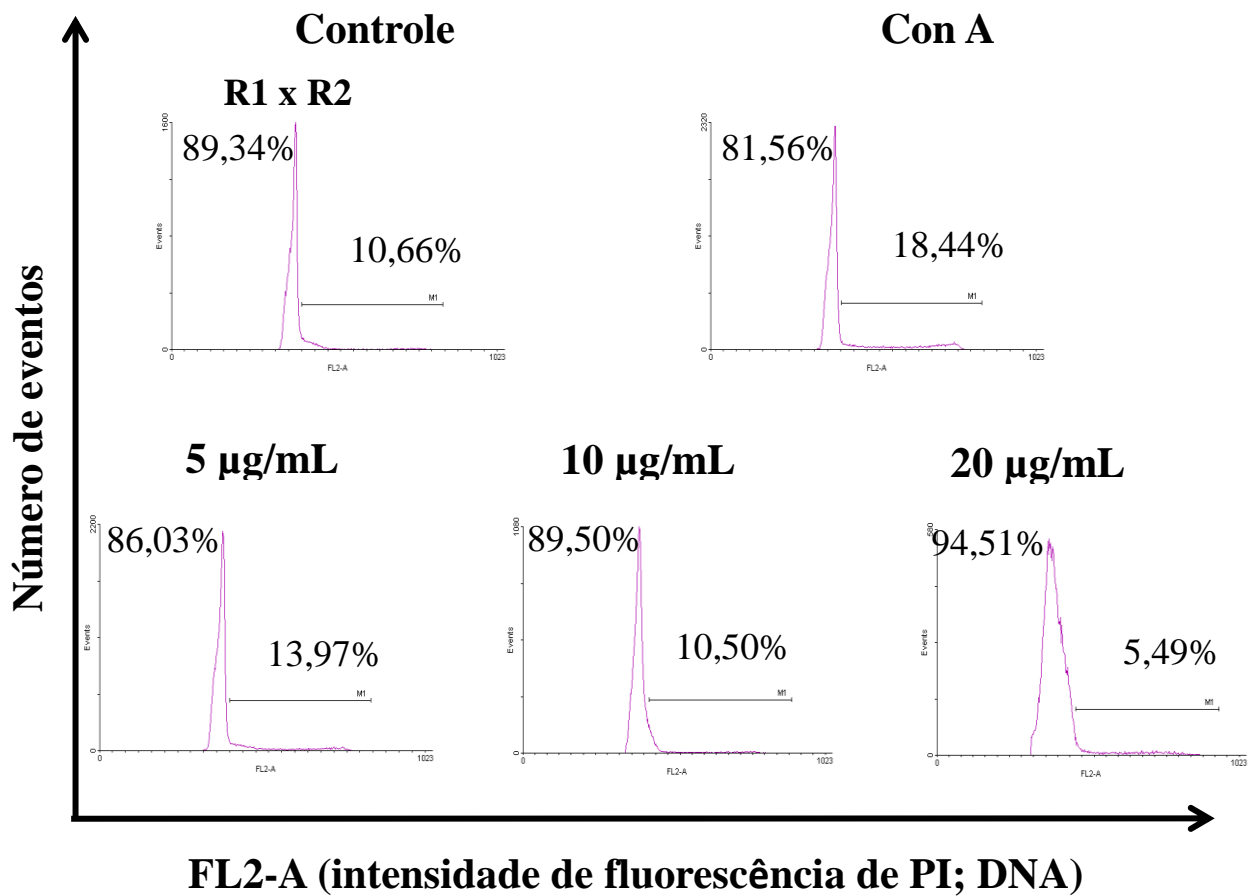


Figura 18 – Análise citofluorimétrica do ciclo celular de esplenócitos murinos estimulados com Con A na presença de EEPpg. Histogramas mostrando os percentuais de núcleos nas fases S + G2/M. As células foram incubadas na com Con A e na ausência e presença de diferentes concentrações do EEPpg por 48 h, em seguida foram tratadas com iodeto de propídeo (PI) e Triton X-100 por 15 minutos, e depois por mais 15 minutos com RNase, conforme descrito nos Métodos. A fluorescência do PI (DNA) foi detectada em FL2-A por citometria de fluxo (100.000 eventos por amostra). Resultado representativo de três experimentos independentes.

Comparadas aos resultados das células estimuladas com Con A, o tratamento com as concentrações de 5, 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$  de EEPpg impôs uma redução significativa de 45,8%, 60,0%, 66,1%, respectivamente, nas fases S + G2/M do ciclo celular.

Na Figura 19 pode ser observado o efeito do tratamento com EEPpg através das médias dos valores relativos e absolutos de núcleos nas fases S + G2/M. Tanto o número relativo quanto absoluto de núcleos na fase S + G2/M foram reduzidos pelo tratamento com EEPpg em todas as concentrações de maneira concentração - gradual dependente, em relação às células estimuladas com Con A.

#### 4.6 Efeito do EEPpg sobre a apoptose

Com o objetivo de avaliar se a atividade anti-proliferativa do EEPpg sobre os esplenócitos, sugerida no ensaio de MTT e confirmada por análise do ciclo celular está relacionada com a indução da apoptose, a externalização da fosfatidilserina na membrana plasmática foi identificada por ligação com Anexina V e utilizada como método para identificação de células submetidas à morte por apoptose. Para isso, os esplenócitos de camundongos DBA/1J foram colocados em cultura e incubados com Con A, na presença ou ausência de EEPpg, nas concentrações de 5, 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$  e, após 48 h, marcados com Anexina-V-FITC e PI, como descrito no item Métodos. Como controle negativo, esplenócitos sem estímulo e sem tratamento com o extrato foram também cultivados.

Os citogramas (Figura 20A) mostram as distribuições das células em função da intensidade de fluorescência do PI e da Anexina-V em experimento representativo. As células foram divididas em quatro quadrantes. O quadrante inferior esquerdo refere-se ao percentual de células viáveis, O quadrante superior direito, refere-se ao percentual de células em apoptose tardia e o inferior direito, as células em apoptose inicial. Observa-se que o EEPpg aumentou de 1,2x, 2,1x e 2,2x o percentual de células apoptóticas totais (apoptose inicial + apoptose tardia) nas concentrações de 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  e 20  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, em relação às células estimuladas com Con A.

Na Figura 20B, estão representados os gráficos de células viáveis e células em apoptose total. A estimulação dos esplenócitos com Con A diminui o percentual de células em apoptose quando comparadas ao controle sem estímulo algum.

No tratamento com EEPpg as concentrações de 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$  aumentaram significativamente o percentual de morte por apoptose dos esplenócitos estimulados com Con A, com valores médios de  $80,5\% \pm 6,8\%$  e  $82,6\% \pm 4,5\%$ , respectivamente, quando

comparados ao controle apenas com Con A ( $49,1\% \pm 9,5\%$ ). A concentração de  $5 \mu\text{g/mL}$  não aumentou de maneira significativa a apoptose total dessas células.

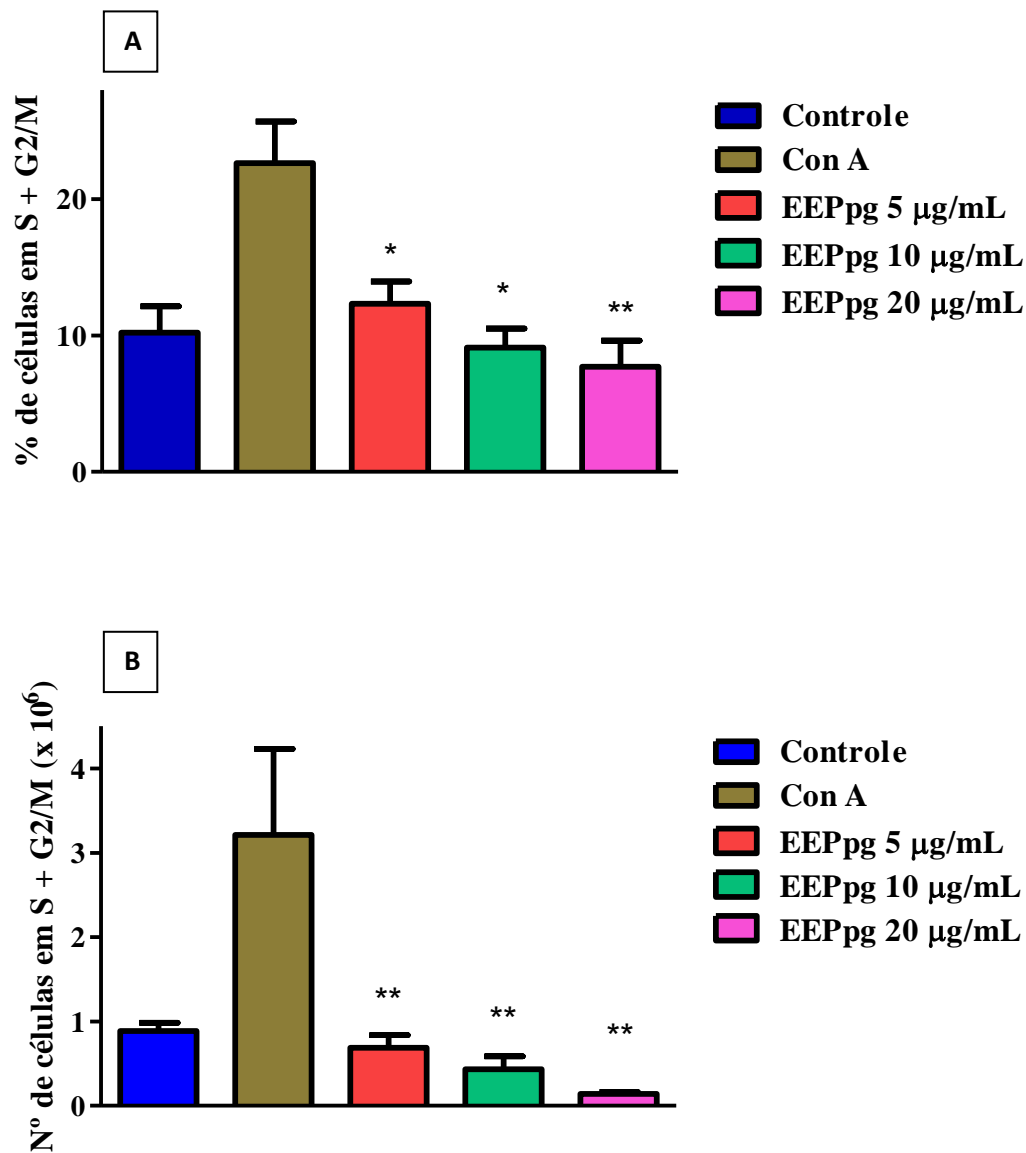


Figura 19 – Análise do número de esplenócitos de camundongos DBA/1J machos estimulados com Con A e na presença de EEPPg nas fases S+G2/M. **A:** Número relativo. **B:** Número absoluto, obtido a partir da multiplicação do nº relativo pelo nº de células viáveis. As condições de cultura e análise foram as mesmas da Figura 18. Média  $\pm$  E.P. de três experimentos. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , comparado às células estimuladas com Con A pelo teste Dunnett, após análise de variância pelo One-way ANOVA.

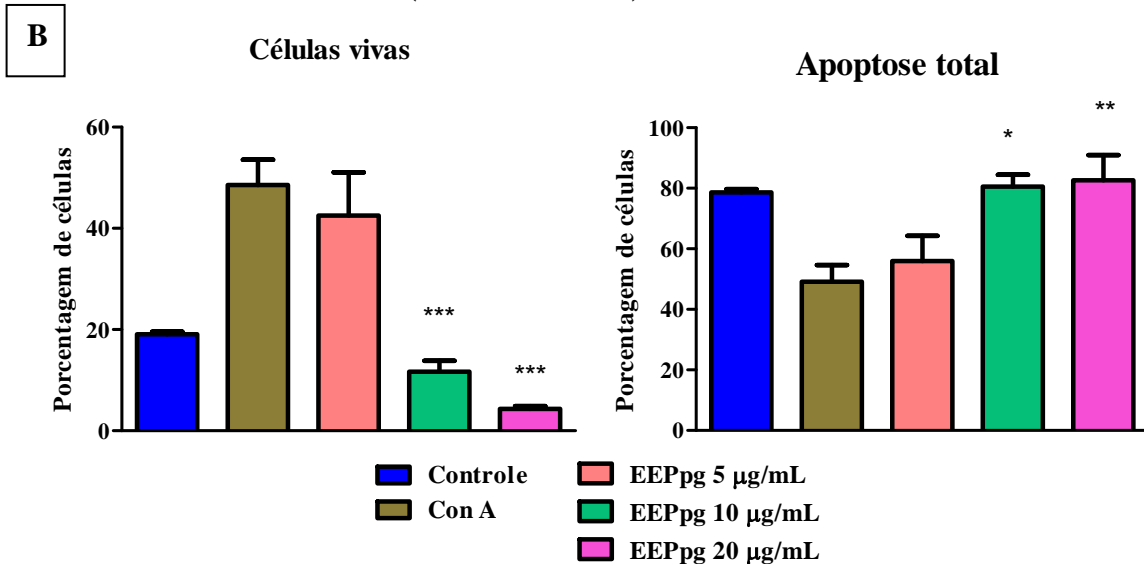
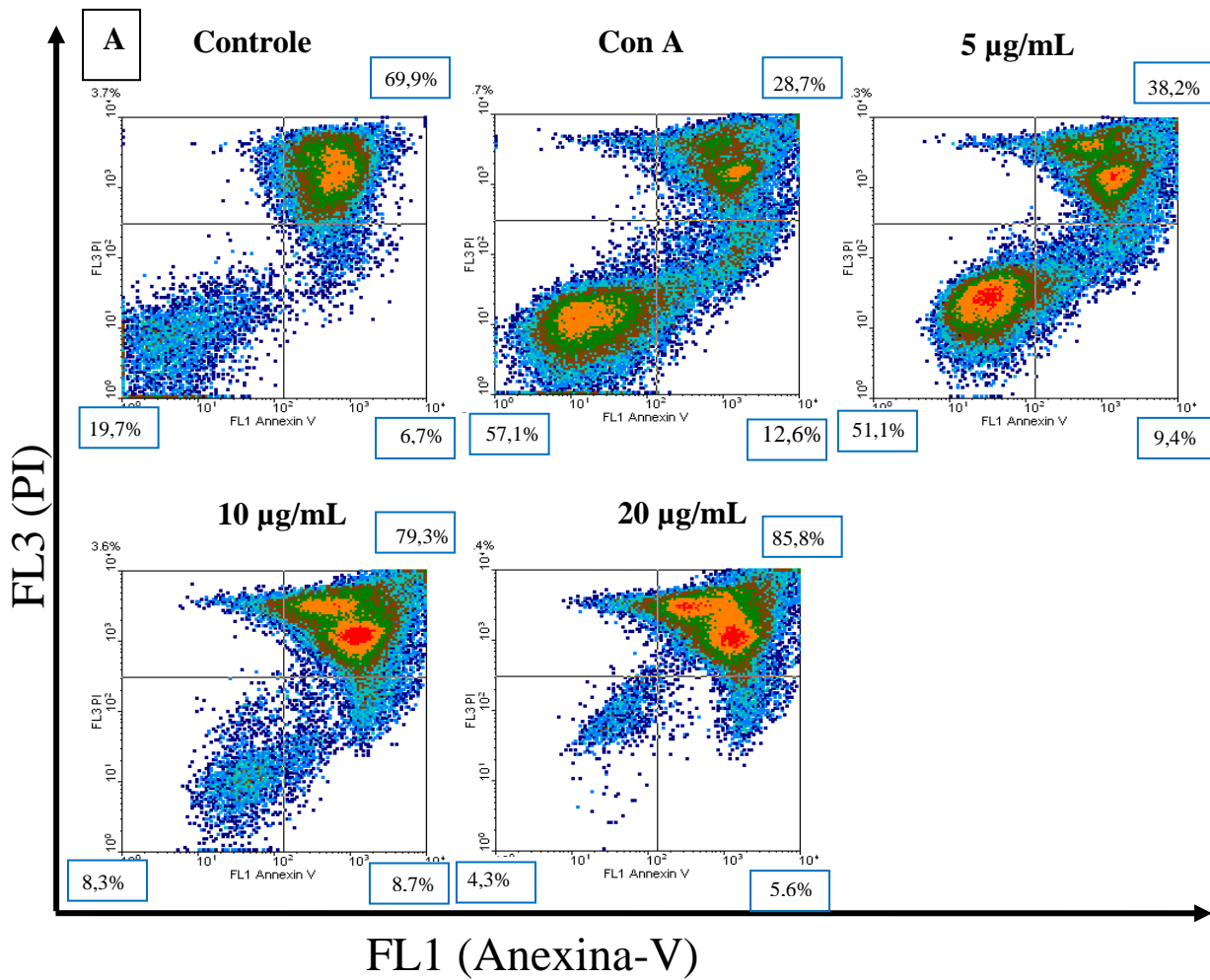


Figura 20 – Efeito do EEPpg na apoptose de esplenócitos estimulados por 48h com Con A, por marcação com anexina V- FITC e PI. **A.** Citogramas mostrando a permeabilidade da membrana ao PI (FL2) e a ligação da anexina-V à fosfatidilserina na membrana plasmática (FL1). Os percentuais de células apoptóticas estão destacados nos retângulos. Resultado representativo de três experimentos. **B.** Número relativo de células vivas e em apoptose. Média  $\pm$  E.P. de três experimentos. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  (Dunnett comparado ao Con A).

## 4.7 Efeito do EEPpg sobre o número de células Mac-1<sup>+</sup> no baço e no peritônio de camundongos DBA/1J após injeção com AFC

### 4.7.1 Modelo de mielopoiese induzida por adjuvante completo de Freund

O modelo de mielopoiese induzida por adjuvante completo de Freund foi desenvolvido em nosso laboratório (LIA-BPPN), com base em outros estudos experimentais que mostram a importância do AFC não somente como um meio de entrega do antígeno em modelos de doenças autoimunes, mas também na promoção de alterações específicas da resposta imune e também no remodelamento funcional e morfológico do sistema hematopoiético, como a expansão de células mieloides Mac-1<sup>+</sup> imaturas. Estas, por sua vez, estão associadas à regulação em vários modelos imunes (Billiau e Matthys, 2001). O modelo de mielopoiese induzida por AFC encontra-se descrito nos Métodos.

Seis dias após a injeção do AFC ou PBS i.d. no dorso dos camundongos da linhagem C57Bl/6, as células do baço foram marcadas com anticorpo anti-Mac-1-PE e analisadas por citometria de fluxo a fim de avaliar a ação do AFC sobre a mielopoiese no baço. Citogramas de experimento representativo, que relacionam o tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (Figura 21) dos esplenócitos provenientes de camundongos injetados com AFC e PBS, mostraram um aumento, no 6º dia, de uma população de células de tamanho e granulosidade maiores do que linfócitos no baço dos camundongos injetados com AFC (grupo AFC) quando comparado à população de células do baço dos camundongos injetados com PBS (controle). Esta população mostrou ser Mac-1<sup>+</sup> (Figura 22).

Apesar do aumento na população de esplenócitos induzido pelo AFC, não houve diferenças significativas no número total de esplenócitos nos baços do grupo AFC com relação ao grupo PBS (Figura 23A). Porém, o AFC foi capaz de aumentar significativamente o número relativo de células Mac-1<sup>+</sup> entre os esplenócitos dos camundongos C57Bl/6 (Figura 23C). Decorrente disso houve também um aumento, apesar de não significativo, no número absoluto de células Mac-1<sup>+</sup> no grupo AFC (Figura 23B).

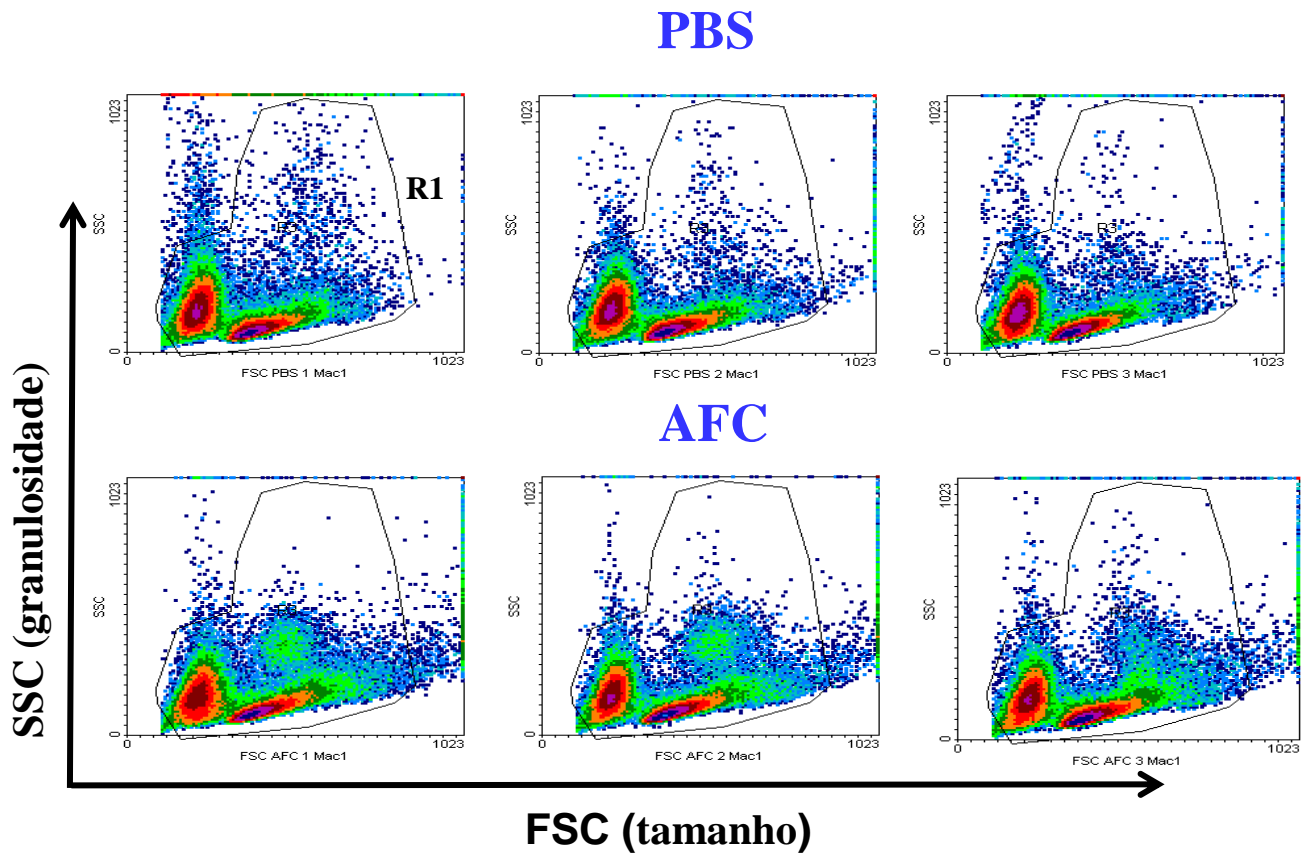


Figura 21 – Análise citofluorimétrica do tamanho e granulosidade de esplenócitos de camundongos da linhagem C57Bl/6 machos do modelo de mielopoiese induzida por AFC. Os camundongos receberam uma injeção intradermicamente do AFC ou PBS e após seis dias seus baços foram removidos e as células dispersas em meio RPMI e posteriormente marcadas com anticorpo anti-Mac-1 acoplado a PE. O tamanho foi detectado pelo parâmetro *forward scatter* (FSC) e a granulosidade pelo parâmetro *side scatter* (SSC) do aparelho. A região 1 (R1) foi usada para análise de expressão do antígeno Mac-1 da Figura 22. Experimento representativo.



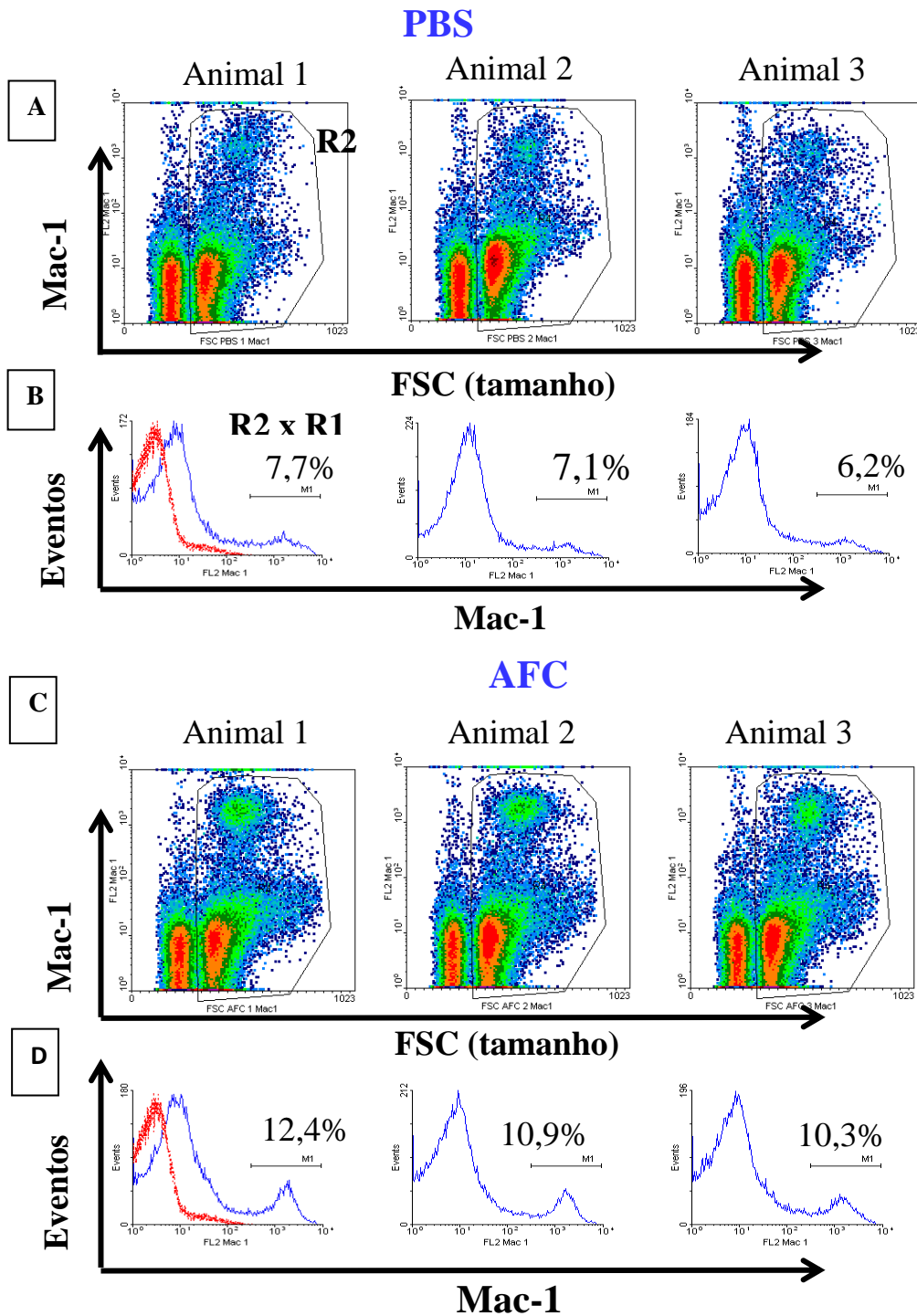


Figura 22 - análise citofluorimétrica do percentual de esplenócitos Mac-1<sup>+</sup> nos camundongos da linhagem C57Bl/6 machos do modelo de mielopoiese induzida por AFC. **A.** Citogramas do grupo PBS. **B.** Histogramas do número de células Mac-1 em função do tamanho do grupo PBS. **C.** Citogramas do grupo AFC. **D.** Histogramas do número de células Mac-1 em função do tamanho do grupo AFC. Os camundongos receberam uma injeção i.d. do PBS ou AFC e após seis dias seus baços foram removidos, as células dispersas em meio RPMI e marcadas com anticorpo anti-Mac-1 acoplado a PE, após pré-incubação com anticorpo anti-CD32/16. O tamanho foi detectado por *forward scatter* (FSC) e expressão de Mac-1 pelo detector FL2 do aparelho. Os histogramas foram obtidos pela intercessão das regiões 1 (R1, Figura 21) e 2 (R2), esta para retirada de hemácias (\*). Experimento representativo.

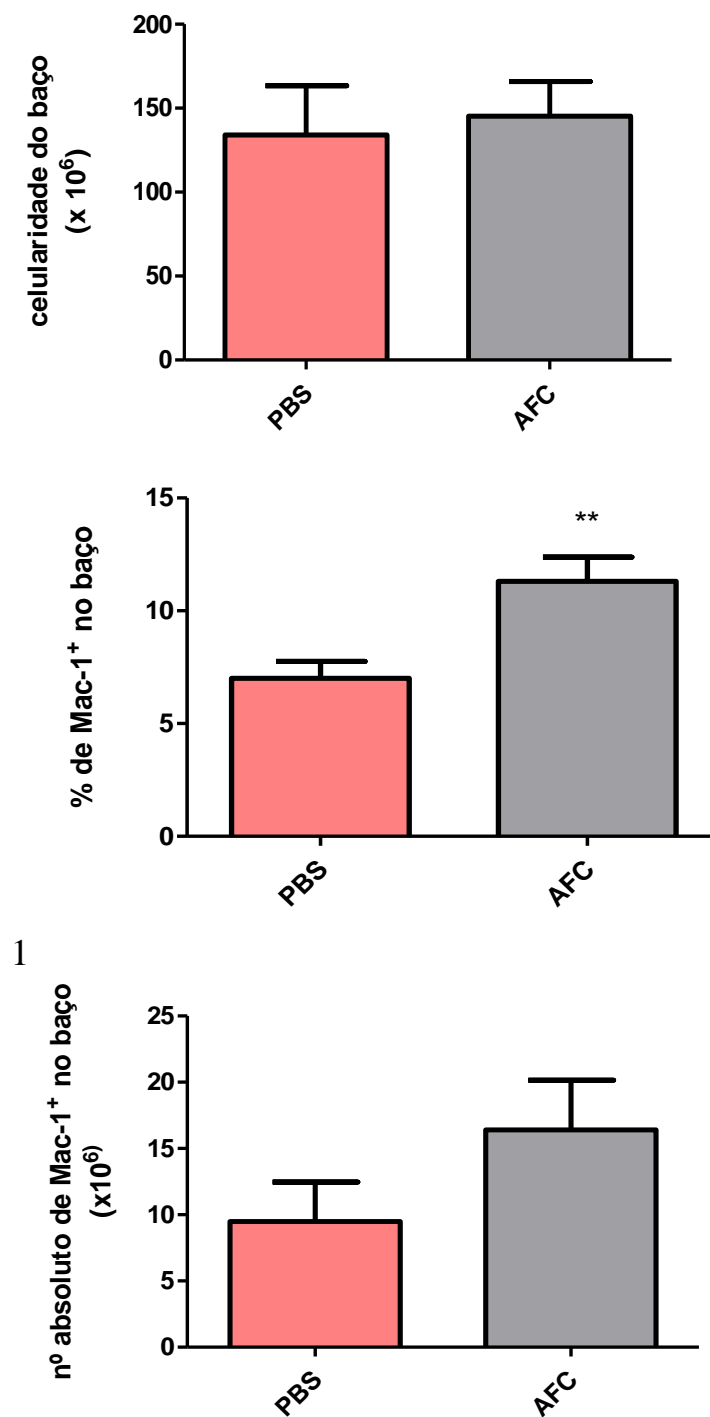


Figura 23 – Efeito do AFC na indução da mielopoiese de células Mac-1<sup>+</sup> entre os esplenócitos. **A.** Celularidade no baço. **B.** Número relativo de células Mac-1<sup>+</sup> no baço. **C.** Número absoluto de células Mac-1<sup>+</sup> no baço. Os camundongos C57Bl/6 receberam uma injeção i.d. do PBS ou AFC e após seis dias seus baços foram removidos e as células dispersas em meio RPMI e marcadas com anticorpo anti-Mac-1 acoplado a PE, após pré-incubação com anticorpo anti-CD32/16. Gráficos relativos ao experimento representativo mostrado na Figura 22. Média  $\pm$  desvio padrão de experimento representativo. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , pelo teste de *t*-student.

#### 4.7.2 Efeito do tratamento com EEPpg sobre a expansão de células Mac-1<sup>+</sup> induzida por AFC

Após mostrar que o AFC é capaz de induzir a expansão de células mieloides Mac-1<sup>+</sup> no baço dos camundongos machos da linhagem C57Bl/6, fomos avaliar o efeito do EEPpg sobre a mesma.

Neste experimento foram utilizados camundongos machos da linhagem DBA1/J que também apresentam a expansão dessas células. Os camundongos foram divididos em quatro grupos: os injetados com PBS ou AFC i.d. e que receberam oralmente o veículo de diluição da amostra (EtOH 15% + 0,05% Tween 20), denominados como PBS - veículo (PBS-V) e AFC - veículo (AFC-V), respectivamente; os injetados com AFC i.d. e tratados v.o. com 0,01 mg/kg e 0,001 mg/kg de EEPpg, denominados como AFC - EEPpg 0,01mg/kg e AFC - EEPpg 0,001 mg/kg, respectivamente.

Houve um aumento na população de esplenócitos no grupo AFC-V em relação ao controle PBS-V, porém esse aumento não foi significativo. O tratamento por sua vez, mostrou na dose 0,01 mg/kg de EEPpg uma redução significativa do número de esplenócitos ( $p < 0,05$ ) (Figura 24A). O AFC foi capaz de promover o aumento no percentual, bem como no número absoluto, de células Mac-1<sup>+</sup> no baço dos camundongos DBA/1J, como pôde ser notado ao comparar os grupos AFC-V e PBS-V. O veículo não influenciou no percentual de células Mac-1<sup>+</sup> no baço (dado não mostrado). O tratamento com 0,01 mg/kg e 0,001 mg/kg EEPpg por sua vez inibiu significativamente ( $p < 0,01$ ) o percentual e o número absoluto dessas células no baço (Figura 24B e C).

No peritônio, embora as diferenças não sejam significativas, o percentual de células Mac-1<sup>+</sup> diminuiu ligeiramente no grupo AFC-V, aumentou no grupo PBS-V. e nos grupos tratados com as duas doses do EEPpg (Figura 25).

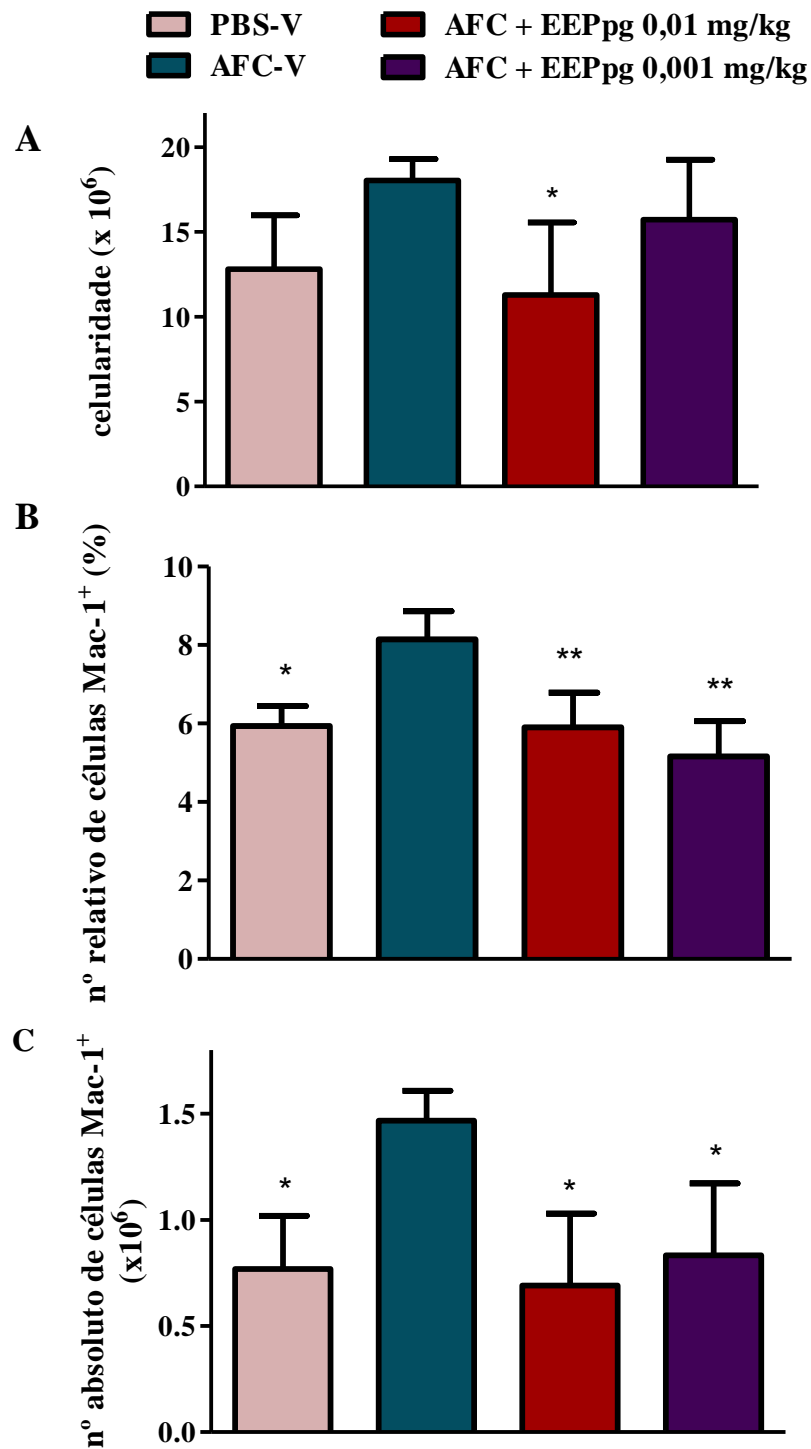


Figura 24 – Efeito do EEPpg na mielopoiese induzida por AFC no baço de camundongos DBA/1J. **A.** Celularidade no baço. **B.** Número relativo de células Mac-1<sup>+</sup> no baço. **C.** Número absoluto de células Mac-1<sup>+</sup> no baço. Os camundongos foram previamente tratados com veículo ou com as doses do EEPpg durante cinco dias. No quinto dia, os animais receberam uma injeção i.d. de AFC ou PBS e continuaram a ser tratados até o décimo dia. No décimo primeiro dia, foram sacrificados, seus baços extirpados e os esplenócitos marcados com anticorpo anti-Mac-1-PE. PBS-V, n = 3; AFC-V, n = 4; AFC – EEPpg 0,01 mg/kg, n = 3; AFC – EEPpg 0,001 mg/kg, n=3. Dados representados por média ± desvio padrão de um experimento. \*p < 0,05, \*\*p < 0,001, comparado ao grupo AFC – V pelo teste de Dunnett, após análise de variância pelo One-way ANOVA.

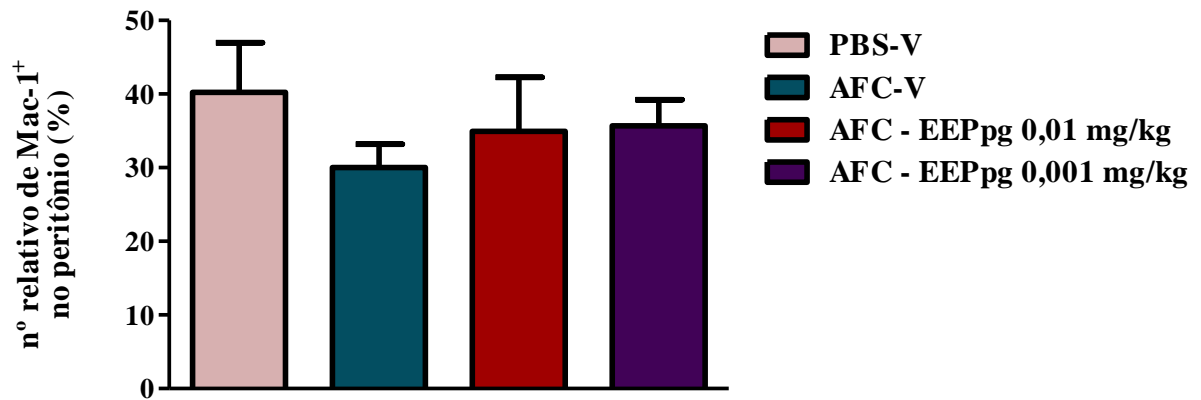


Figura 25 – Efeito do EEPpg sobre o percentual de células mieloides Mac-1<sup>+</sup> no peritônio de camundongos injetados com AFC. Camundongos DBA/1J foram tratados previamente com o veículo ou as doses de tratamento do EEPpg durante cinco dias. No quinto dia, os animais receberam uma injeção i.d. de AFC ou PBS e continuaram a ser tratados até o décimo dia. No décimo primeiro dia os camundongos foram sacrificados, e as células do lavado peritoneal marcadas com anticorpo anti-Mac-1. PBS-V, n = 3; AFC-V, n = 4; AFC – EEPpg 0,01 mg/kg, n = 4; AFC – EEPpg 0,001 mg/kg, n=3. Dados representados por média ± desvio padrão de um experimento.

## 5 DISCUSSÃO

A inflamação é uma resposta fisiológica, normalmente localizada, que ocorre em defesa do organismo a um material estranho, frequentemente de natureza microbiana, ou à injúria tecidual. Essa resposta envolve vários eventos vasculares e celulares, a fim de eliminar o patógeno o mais rapidamente possível e restabelecer a homeostasia. É orquestrada por componentes do sistema imune inato (como neutrófilos e macrófagos) e do sistema imune adaptativo (como os linfócitos), que podem atuar diretamente sobre o patógeno, produzir diversos mediadores inflamatórios e ativar outras células imunes. Porém, quando essa resposta é muito intensa ou o estímulo persistente, a resposta inflamatória fisiológica pode tornar-se patológica.

Muitas doenças caracterizadas pela inflamação são importantes causas de morbidade e mortalidade nos humanos. Por isso a inflamação tem sido objeto de diversos estudos experimentais.

A artrite reumatoide é uma doença autoimune com características inflamatórias crônicas bem proeminentes. Sua etiologia é desconhecida, porém o início da doença está relacionado à quebra da autotolerância e culmina em características clínicas aparentes como destruição da estrutura articular além de diversas outras comorbidades, fazendo da artrite reumatoide uma doença extremamente debilitante dos indivíduos por ela acometidos e de importância socioeconômica expressiva.

Muitas drogas convencionais (drogas anti-inflamatórias alopáticas) são utilizadas no tratamento da artrite reumatoide, e atualmente agentes biológicos, como antagonistas da citocina TNF- $\alpha$ , têm sido amplamente utilizados na terapia da AR, bem como em grande parte dos estudos de artrite experimental com animais. Porém, efeitos adversos severos, incluindo complicações cardiovasculares e infecções e o alto custo dessas drogas têm levado ao aumento notório no uso da medicina alternativa e complementar (CAM), principalmente o uso de plantas medicinais, por pacientes com artrite reumatoide (Venkatesha *et al.*, 2011), porém ainda existe uma carência de informações acerca da eficácia e dos mecanismos de ação dessas plantas, limitando seu uso.

A espécie *Pterodon polygalaeflorus* é uma planta conhecida popularmente como sucupira branca, pertencente ao gênero *Pterodon*. Seus frutos são preparados pela população sob a forma de extrato alcoólico e seu uso popular sugere, dentre outros diversos efeitos, o efeito antiartrítico. Neste trabalho, os experimentos foram elaborados a partir do extrato etanólico preparado após maceração dos frutos em etanol 100% e posterior evaporação do

solvente. A observação do efeito anti-inflamatório demonstrado por outras espécies do gênero, como do extrato oleoso de *P. pubescens* (Silva *et al.*, 2004), do extrato hexânico de *P. emarginatus* (Carvalho *et al.*, 1999) e da própria espécie *P. polygalaeflorus* (Almeida, 1993) e do extrato hidroalcoólico de *P. polygalaeflorus* (Leal *et al.*, 2000), bem como o efeito antiartrítico do extrato hidroalcoólico de *P. pubescens* (Sabino *et al.*, 1999a), serviram como base para o presente estudo.

A caracterização química geral do EEPpg foi realizada por análises cromatográficas. A escolha do solvente se faz extremamente importante a fim de obter uma extração satisfatória. Para isso é necessário que o solvente tenha características químicas, iguais ou semelhantes à amostra da qual se quer extrair possíveis compostos ativos. O etanol 100% utilizado na extração mostrou eficiente maceração de compostos dos frutos de *Pterodon polygalaeflorus*, dada à diversidade química de compostos observados nas análises cromatográficas. O etanol possui característica mais apolar, o que pode ter permitido uma boa extração das moléculas do óleo encontrado nos frutos da sucupira.

Na cromatografia em camada delgada, após revelação com sulfato de cério, observou-se a presença de várias bandas semelhantes ao longo da placa, permitindo uma visão geral da polaridade dos compostos. Com base nos resultados, pode-se sugerir a presença de compostos polares e apolares no EEPpg (Figura 7A). Na revelação com NP-PEG, a presença de bandas esverdeadas e alaranjadas evidenciou a presença de compostos fenólicos e flavonoides (Figura 7B). Após revelação com vanilina/ácido sulfúrico foi possível observar a presença de várias bandas com cores e valores de  $R_f$  diferentes ao longo da placa (Figura 7C e Tabela 1), o que sugere a presença de diferentes classes de terpenoides, com polaridades distintas, o que confirmam dados da literatura (Wagner e Bladt, 1996). A análise do perfil cromatográfico por HLPC-DAD e GC-MS mostrou que, apesar da presença de compostos com polaridades diferentes na amostra observados por TLC, há uma prevalência no EEPpg de compostos mais apolares, dada a presença de picos majoritários com tempos de retenção mais tardios, entre 14 e 26 min quando analisado por HLPC (Figura 8 e Tabela 2) e menos voláteis, com tempo de retenção entre 19 e 29 minutos quando analisado por GS-MS (Figura 9 e Tabela 3). O perfil do EEPpg foi melhor visualizado quando monitorado no comprimento de 220 nm por HLPC. A análise por cromatografia por fase gasosa acoplada a espectrômetro de massa permitiu identificar, por comparação com o banco de dados NIST, alguns compostos do EEPpg, como hidrocarbonetos insaturados e saturados, sesquiterpenos e farneseno (Tabela 3).

A presença de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, como o cariofileno já foi demonstrada no óleo do extrato hexânico de *Pterodon polygalaeflorus* (Campos *et al.*, 1990).

Outros compostos, como flavonoides e terpenoides foram encontrados em extratos de diferentes espécies do gênero *Pterodon*, como por exemplo, os triterpenoides lupeol e betulina e vários isoflavonoides em extratos acetônicos do alburno e do cerne de *Pterodon polygalaeflorus* (Marques *et al.*, 1998) e o diterpenoide 6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxivouacapano – 14 (17)-eno isolado do extrato etanólico dos frutos de *P. polygalaeflorus* (Campos *et al.*, 1990). Esses compostos são provenientes do metabolismo secundário dos vegetais (Peres, 2004) e estão relacionados aos mecanismos de ação e efeitos farmacológicos de muitas plantas utilizadas na medicina popular. Os efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores dos triterpenoides são atribuídos a sua habilidade em inibir a 5-lipoxigenase e a elastase leucocitária humana, e por afetar o complemento e a produção de anticorpos, respectivamente (Ríos, 2010). Os flavonoides, por sua vez, exibem um amplo espectro de ações, e suas propriedades anti-inflamatórias estão atribuídas a vários mecanismos envolvendo a modulação da sinalização inflamatória, redução da produção de moléculas inflamatórias, diminuição do recrutamento e ativação celular, regulação da função celular e propriedade antioxidante (Pan *et al.*, 2010).

A artrite induzida por colágeno é um modelo amplamente utilizado no estudo da artrite reumatoide. Isso porque a CIA divide uma série de características patológicas, genéticas e fatores imunológicos com a AR. A imunização de linhagens susceptíveis de camundongos com colágeno tipo II leva a uma artrite inflamatória e progressiva. Macroscopicamente, a artrite é caracterizada por edema e eritema, com aumento da largura da pata afetada em até 100%. Índices de escores clínicos têm sido desenvolvidos para avaliar a progressão da doença a partir da fase inflamatória a uma distorção comum e espondilite. O desenvolvimento da CIA resultou num rápido aumento nas abordagens inovadoras para o tratamento da AR (Wooley, 2004), inclusive utilizando-se plantas medicinais que têm sido consideradas como minas de ouro no tratamento da AR, devido à sua capacidade de modular respostas inflamatórias, buscando minimizar os efeitos colaterais.

Neste trabalho o potencial antiartrítico de extrato etanólico de *P. polygalaeflorus* através do modelo murino de artrite induzida por colágeno foi avaliado (Figura 11). A CIA foi desenvolvida em camundongos DBA/1J, que possuem o haplótipo H-2q, que determina elevada susceptibilidade à doença. O tratamento oral e diário foi mais eficiente nas menores doses, prevenindo o desenvolvimento e a evolução da CIA e reduzindo em até 99% o índice de artrite. Entretanto, o tratamento com a maior dose, não impediu o desenvolvimento da CIA, porém reduziu sua incidência, além de ter retardado seu início (Figura 11A). O EEPpg também reduziu significativamente as características clínicas da doença como edema, eritema



e deformidade e, portanto, a severidade da doença, que foi representada pelo escore clínico das patas com base nesses sinais e sintomas (Figura 11B). Nenhum sinal clínico de inflamação evidente foi observado nos camundongos tratados com as menores doses do EEPpg.

Os efeitos preventivo e terapêutico com extrato hidroalcoólico dos frutos da espécie *Pterodon pubescens* (EHPp) sobre o desenvolvimento da CIA, foram comparados por Sabino e colaboradores (1999a). Foi demonstrado que a resposta de camundongos cujo tratamento teve início apenas no 21º após a imunização com CII (terapêutico), difere da que ocorre com o tratamento preventivo, que é iniciado 20 dias antes da primeira imunização com CII, que impediu o desenvolvimento da CIA (Sabino *et al.*, 1999a). Neste trabalho, foi utilizado o esquema terapêutico de tratamento para o EEPpg mostrando-se um efeito antiartrítico potente em doses baixas de tratamento. O fato de observarmos o efeito antiartrítico em baixas doses em relação ao EHPp pode estar relacionado ao tipo de solvente utilizado durante a extração. Neste trabalho, o etanol 100% foi capaz de extrair maior quantidade de compostos dos frutos de *P. polygalaeiflorus* do que o extrato hidroalcoólico (etanol 15%), potencializando seus efeitos.

A característica patofisiológica marcante na AR é a inflamação do tecido sinovial, que normalmente é uma estrutura relativamente acelular com uma camada íntima estreita. Na AR, porém, o aumento significativo de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos e sinoviócitos semelhantes a macrófagos, e o infiltrado de células mononucleares tornam-se características dominantes nas articulações afetadas (Firestein, 2009). A artrite induzida por colágeno tipo II possui características histopatológicas similares a AR como: deposição de fibrina, IgG e outras proteínas plasmáticas sobre a membrana sinovial e cartilagem articular, proliferação de sinoviócitos e capilares, infiltração celular inflamatória, principalmente neutrófilos e células semelhantes a macrófagos Mac-1<sup>+</sup>, formação do *pannus*, destruição e regeneração da cartilagem articular e do osso subcondral e desenvolvimento de anquiloses (Suzuki *et al.*, 1997).

Neste trabalho, foi possível observar a presença de hiperplasia da membrana sinovial, um intenso infiltrado de células imunes, formação do *pannus* erosivo que invadiu e destruiu a cartilagem adjacente e o osso subcondral na articulação afetada de camundongo com CIA tratado apenas com o veículo (Figura 13). Segundo a literatura, o acentuado infiltrado inflamatório na pata do animal do grupo CIA está relacionado aos altos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 e quimiocinas liberadas pela ativação local dos macrófagos. O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  aumentam a expressão de P-selectinas e E-selectinas no endotélio e seus ligantes nos leucócitos,

responsáveis pelo *rolling* de leucócitos nos vasos sanguíneos, enquanto as quimiocinas aumentam a afinidade das integrinas dos leucócitos pelos ligantes, e são responsáveis pela adesão e posterior transmigração dos mesmos para os tecidos (von Andrian e MacKay, 2000).

O tratamento com EEPpg reduziu expressivamente as características histopatológicas encontradas nas articulações de camundongos com CIA (Figura 14), assumindo características próximas ao controle sadio (Figura 12), com exceção apenas de uma inflamação na sinóvia de baixa intensidade. O mesmo efeito foi demonstrado por Coelho e colaboradores (2004), com o extrato hidroalcoólico de *Pterodon pubescens* neste modelo.

Coletivamente esses resultados mostram que o tratamento com EEPpg é capaz tanto de afetar o curso e a severidade da CIA, como é capaz de modificá-la, como observado pela melhora expressiva dos caracteres histopatológicos, inibindo os processos inflamatórios e protegendo a estrutura articular da destruição, apontando, então, o EEPpg como potente agente antiartrítico. Trabalhos realizados anteriormente em nosso laboratório mostraram um potente efeito anti-inflamatório do extrato hexânico de *Pterodon polygalaeflorus* (EHPpg) nos modelos de inflamação aguda, *air pouch* e edema de pata induzido por carragenina (Vigliano, 2008) o que confirmam os efeitos anti-inflamatórios desta espécie.

As plantas medicinais podem inibir a iniciação e a progressão da artrite inflamatória ao intervir em múltiplas etapas da patogênese da doença (Venkatesha *et al.*, 2011). Estudos com *Pterodon pubescens*, espécie do mesmo gênero, demonstram uma relação de seus efeitos antiartríticos com a regulação da resposta de células T, a mudança na resposta de células B na produção de anticorpos anti-CII e a alteração da migração dos leucócitos para os tecidos (Coelho *et al.*, 2004). Partindo deste princípio, pode-se sugerir que o EEPpg interfere no desenvolvimento da CIA influenciando vias particulares de ativação do sistema imune da mesma forma que *P. pubescens*. Além disso, o EEPpg pode intervir no evolução da artrite ao interferir no balanço ou na resposta de citocinas, como ocorre com a *Tripterygium wilfordii* (Wang *et al.*, 2008) e com a *Ulmus davidiana* (Kim *et al.*, 2005). Poderia também afetar direta ou indiretamente a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas nos vasos sanguíneos ou articulações, como é observado em *Fumigant Ib* (Shen e Lu, 2009). E, com base no fato de que a erosão da cartilagem na artrite reumatoide é mediada, pelo menos em parte, por metaloproteinases de matriz e agrecanases (ADAMTs) (Sun, 2010), podemos sugerir que os efeitos protetores do EEPpg contra a destruição da cartilagem e do osso na artrite induzida por colágeno poderia também estar relacionada com uma possível intervenção sobre a produção dessas enzimas. Certamente, uma investigação mais profunda sobre os “alvos” e bases moleculares da ação anti-inflamatória do EEPpg deve ser realizada.

A avaliação do peso dos pulmões, rins e fígado dos animais com CIA, tratados ou não com veículo ou EEPpg, fez-se necessário, tendo em vista que esses órgãos são locais de biotransformação de xenobióticos. Porém, a biotransformação de drogas embora tenha como objetivo facilitar a excreção de metabólitos pode gerar metabólitos secundários ativos e que podem apresentar propriedades tóxicas (Oshima-Franco e Franco, 2003). O EEPpg não mostrou efeito sobre o peso absoluto e relativo do fígado e do pulmão. Apesar de observarmos uma diminuição no peso absoluto médio nos rins dos grupos tratados com as doses 0,1 e 0,01 mg/kg do EEPpg (Tabela 4), não se pode afirmar um efeito nefrotóxico do EEPpg. Para tal, outras análises devem ser realizadas, como por exemplo, avaliação do efeito sobre enzimas de biotransformação e níveis séricos de creatinina, bem como análise histopatológica.

Os órgãos linfoides são importantes filtradores dos antígenos fluidos corporais e locais de maturação, ativação e proliferação de células imunes, servindo como um ambiente propício para o início das respostas imunes, através da apresentação de antígeno pelas APC aos linfócitos. Variações no peso do baço, timo e linfonodos dos camundongos saudáveis e com CIA, tratados ou não com EEPpg foram observadas neste trabalho. Não houve nenhuma alteração significativa do peso do baço entre os grupos, com exceção de uma pequena redução no peso médio absoluto do baço do grupo tratado com a dose de 0,001 mg/kg (Tabela 4). Porém, isto pode estar relacionado ao peso corporal um pouco menor dos camundongos deste grupo. O aumento dos pesos do timo e dos linfonodos (inguinais, poplíteos e braquiais) observado no grupo CIA, quando comparado ao controle saudável (Tabela 4), confirma o desenvolvimento da CIA possivelmente devido ao aumento da maturação de linfócitos T no timo, bem como a migração de células apresentadoras de antígeno para os nódulos linfoides drenantes resultando no aumento da migração/ativação/proliferação de linfócitos naïve ou comprometidos e logo, um aumento na celularidade nos linfonodos do grupo CIA. O linfonodo drena a região inflamada e dessa forma os antígenos presentes nos tecidos são carregados por células fagocíticas para os órgãos linfoides secundários, onde se desenvolve uma resposta imunológica. O aumento da celularidade no linfonodo pode resultar da expansão clonal de vários tipos de linfócitos B e T antígenos específicos, como para CII (Cotran, 1999). O tratamento com EEPpg reduziu significativamente os pesos absoluto e relativo do timo e dos linfonodos, quando comparados aos do grupo CIA, sugerindo um efeito antiartrítico e/ou imunossupressor deste extrato. Estudos feitos por Coelho e colaboradores (2004) mostraram que o tratamento com o EHPp impede o aumento de células  $CD4^+CD69^+$  (isto é, ativadas) nos

nódulos linfoides. Essas observações são indicativas de que a sucupira previne a ativação e expansão de linfócitos envolvidos na CIA.

Um aumento de leucócitos totais no sangue também foi observado no grupo CIA e o tratamento com o EEPpg reduziu significativamente esse parâmetro (Figura 15). O número absoluto de linfócitos, monócitos e segmentados diminuiu significativamente nos grupos tratados com as diferentes doses do EEPpg, principalmente os linfócitos (Figura 16). Esse resultado complementa os anteriores e sustenta a hipótese do efeito do EEPpg sobre células imunes, inibindo a proliferação de linfócitos e/ou migração celular para os nódulos linfoides ou para o sítio da resposta inflamatória, como notado nas análises histológicas das patas dos camundongos tratados.

Após demonstrar o efeito antiartrítico do EEPpg na CIA, decidiu-se avaliar os possíveis mecanismos de ação do EEPpg sobre os linfócitos do baço de camundongos DBA/1J.

Os linfócitos são considerados potentes alvos terapêuticos da artrite reumatoide (Townsend *et al.*, 2010; Wehrens *et al.*, 2010). Na literatura, são relatados estudos onde compostos de plantas utilizadas na medicina popular exibem efeitos importantes sobre a proliferação de células T e na resposta mediada por essas células (Gao *et al.*, 2009). Com o intuito de avaliar os possíveis efeitos do EEPpg sobre a proliferação de células imunes, mais especificamente os linfócitos, foi realizado o ensaio de proliferação *in vitro* dos esplenócitos de camundongos DBA 1/J estimulados com Con A (mitógeno específico para linfócitos T) e com LPS (mitógeno específico para linfócitos B).

O EEPpg afetou a proliferação tanto de linfócitos T quanto de linfócitos B (Figura 17). Os linfócitos T mostraram-se mais sensíveis à ação do extrato já na concentração mais baixa (0,01 µg/mL). Os linfócitos B tiveram sua proliferação inibida em concentrações mais altas (5 µg/mL, 10 µg/mL e 20 µg/mL). A alta sensibilidade dos esplenócitos induzidos com Con A sugere que o EEPpg possa estar inibindo preferencialmente linfócitos T. Diferenças de sensibilidade aos estímulos mitogênicos de células T e B têm sido descritas para alguns flavonoides (Mookerjee *et al.*, 1993) e isso sugere que essa diferença poderia refletir a utilização de diferentes vias de ativação celular (Middleton *et al.*, 2000). Apesar da redução do percentual de células não-estimuladas nas concentrações de 5 µg/mL e 10 µg/mL, o efeito do EEPpg parece ser direcionado para células estimuladas. Cardoso e colaboradores (2008) demonstraram um efeito imunossupressor da resposta celular e humoral pelo extrato etanólico de *Pterodon pubescens* (EEPp), através do modelo imune de hipersensibilidade tardia (DTH), no qual o EEPp reduziu o edema de pata em doses baixas. Também foi demonstrada a

redução da produção de anticorpos *in vivo* e inibição da proliferação de linfócitos T e B e da produção de óxido nítrico *in vitro*. A inibição da proliferação *in vitro* de células T e B pelo EEPpg, neste trabalho, sugere que o extrato possa estar exercendo seus efeitos imunossupressores, prejudicando a função de ambas as células.

Na literatura, flavonoides encontrados em plantas têm sido relacionados fortemente aos efeitos anti-proliferativos e anti-inflamatórios de plantas medicinais (Xiao *et al.*, 2011), bem como monoterpenos e diterpenos têm mostrado efeitos sobre a proliferação de linfócitos B e T e sobre linhagens celulares de linfomas (Cerqueira *et al.*, 2004; Manuele *et al.*, 2008). Estes relatos nos leva a sugerir que flavonoides e terpenoides presentes no EEPpg podem estar associados aos seus efeitos anti-inflamatórios e anti-proliferativos. Como o ensaio do MTT é baseado na capacidade redutora das desidrogenases, presente nas mitocôndrias celulares, e isto só ocorre em células com metabolismo ativo. Os resultados observados sugerem que o efeito inibidor do EEPpg nos linfócitos *in vitro*, esteja relacionado à morte dessas células, já que a ativação de células T e B por Con A e LPS, respectivamente, não depende de APCs.

O efeito anti-proliferativo do EEPpg sobre os linfócitos T está possivelmente relacionado com a interrupção no ciclo celular destas células, como mostraram os resultados da análise por citometria de fluxo do ciclo celular de esplenócitos estimulados com Con A na presença ou não de diferentes concentrações do EEPpg (Figura 18 e 19). Houve uma redução do número de núcleos nas fases S + G2/M e um aumento na fase G0/G1 de maneira concentração-dependente atingindo níveis semelhantes ao de células não estimuladas. Esses resultados sugerem que a atividade inibidora sobre a multiplicação de linfócitos T pode estar relacionada à intervenção da replicação do DNA na fase S e/ou na regulação da mitose. Estudo com extratos de *Isodon serra*, ricos em diterpenoides, demonstrou efeito significativo destes extratos sobre o ciclo celular dos linfócitos T esplênicos murinos estimulados por Con A *in vitro*, da mesma maneira que a observada pelo EEPpg neste trabalho (Zhang *et al.*, 2005).

A atividade inibidora do EEPpg sobre a ciclo celular de linfócitos pode está relacionada à indução da morte por apoptose dessas células. Isto foi demonstrado pela análise por citometria de fluxo de esplenócitos murinos estimulados com Con A e na presença e na ausência do EEPpg marcados com anexina V, um anticorpo específico para a fosfatidilserina exposta na parte externa da membrana plasmática durante a apoptose (Figura 20).

A apoptose de células, como os linfócitos T, é importante na resolução da resposta imune, porém diversas doenças, como as autoimunes, podem resultar de um desequilíbrio

entre sobrevivência celular e apoptose (Thompson, 1995). Defeitos na morte celular programada têm sido observados em alguns tecidos e células de pacientes com doenças reumáticas. Dessa forma, a apoptose tem sido considerada como uma estratégia terapêutica importante em doenças reumáticas como a artrite reumatoide (Ramaswamy *et al.*, 2011). Nesse trabalho, foi possível observar que o EEPpg nas concentrações mais altas (10 µg/mL e 20 µg/mL) inibiu a proliferação e induziu a apoptose dos linfócitos. A concentração de 5 µg/mL apesar de ter mostrado efeito significativo sobre o ciclo celular, não mostrou efeito significativo na indução da apoptose, quando comparado ao controle de linfócitos estimulados com Con A (Figura 20).

Esses resultados indicam a presença de compostos imunomoduladores no EEPpg e sugere que seus efeitos possam estar relacionados à inibição da proliferação dos linfócitos T através da parada no ciclo celular e indução da apoptose destas células nas maiores concentrações. A presença de flavonoides e terpenoides no EEPpg podem ser responsáveis por esses efeitos do extrato. Triterpenos, saponina e diterpenos de extratos de plantas já foram relatados por terem efeitos imunossupressores significativos em linfócitos T murinos, pela intervenção no ciclo celular e indução da apoptose (Cerqueira *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2009). A inibição da ativação do fator de transcrição NF-κB tem sido relacionada com a supressão de linfócitos (Gao *et al.*, 2001). Vários terpenoides tem sido descritos como potentes inibidores da ativação do NF-κB (de las Heras *et al.*, 1999). Dessa forma, pode-se sugerir a inibição da ativação deste fator de transcrição e consequente redução de mediadores inflamatórios, como citocinas inflamatórias, como um dos mecanismos para a atividade imunossupressora do EEPpg.

Estendendo o estudo para outras células do sistema imune importantes durante o processo imuno-inflamatório da artrite reumatoide, fomos avaliar se o EEPpg está envolvido no aumento ou na redução de células mieloides Mac-1<sup>+</sup> no baço.

Células mieloides Mac-1<sup>+</sup> incluem os granulócitos, monócitos e macrófagos, todos importantes durante o processo inflamatório e na manutenção da artrite reumatoide. Essas células são importantes na AR ao produzirem citocinas e mediadores que estão envolvidos no recrutamento e ativação de outras células dentro da articulação artrítica. Evidências tem comprovado um papel importante da mielopoiese e de células Mac-1<sup>+</sup> na CIA. Por exemplo, foi mostrado que a citocina IL-12 promove a mielopoiese e promoção da CIA, e que a neutralização com anticorpo anti-IL-12, previne completamente a expansão de células Mac-1<sup>+</sup> e o desenvolvimento da CIA em camundongos nocautes para INF-γ (Matthys *et al.*, 1999). Camundongos deficientes para o fator estimulador de colônia (CSF) são protegidos contra a

artrite (Campbell *et al.*, 1998). Além disso, o estudo realizado por Matthys e colaboradores (1999) mostra que a mielopoiese de células Mac-1<sup>+</sup> é menos pronunciada quando se utiliza o adjuvante incompleto de Freund no lugar do adjuvante completo de Freund e isto está associado tanto com a redução da severidade da doença quanto com a inversão do efeito protetor para promotor da doença por INF- $\gamma$ .

Estudos cada vez mais mostram a importância do adjuvante completo de Freund em alterações específicas da resposta imune. Eventos iniciais incluem rápida absorção dos componentes do adjuvante pelas células dendríticas, aumento da fagocitose, secreção de citocinas por fagócitos mononucleares, ativação transiente e proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Componentes micobacterianos do AFC sinalizam os linfócitos T para assumir um perfil T<sub>H</sub>1 e estão envolvidos na drástica expansão de células mieloides imaturas Mac-1<sup>+</sup>. A ativação do compartimento imune inato medida pelo AFC é importante não somente pela regulação da fase de indução inicial, mas também por fornecer um excesso de células efetoras e reguladoras na fase tardia (Billiau e Matthys, 2001).

Com base nessas evidências, o primeiro objetivo foi mostrar que o adjuvante completo de Freund realmente promovia a expansão de células Mac-1<sup>+</sup> no baço (Figura 21 e 22). O modelo de mielopoiese induzida por AFC tem a vantagem de ser mais curto (dias) que o modelo de CIA, e permitir, de forma complementar, estudar possíveis os mecanismos da CIA, e também da artrite reumatoide, no início e nas recaídas da doença. Pode ser desenvolvido utilizando-se as linhagens DBA/1J e C57Bl/6. Esta última era previamente considerada como resistente ao desenvolvimento de CIA, devido à ausência do haplótipo H-2q que garante a susceptibilidade à doença nos camundongos da linhagem DBA/1J. No entanto, foi demonstrado por Campbell e colaboradores (2000) que a linhagem C57Bl/6 também é susceptível a CIA, ao utilizar o mesmo protocolo de imunização com CII em AFC, porém com altas doses de *Mycobacterium tuberculosis*. Este parece ter papel crítico na maturação de células dendríticas para a indução da CIA nesta linhagem (Kai *et al.*, 2006). Além disso, esta linhagem, diferentemente da DBA/1J, é mais fácil de criar e possui uma grande variedade de animais nocaute e transgênicos que podem ser úteis para estudar os mecanismos pelo qual o EEPpg pode estar atuando.

O AFC foi capaz de induzir a expansão de células mieloides Mac-1<sup>+</sup> no baço em um curto período de tempo (Figura 21 e 22). Pode-se sugerir que o aumento dessas células no baço possa resultar no aumento de migração destas células ao local da inflamação, constituindo uma fonte de células efetoras.

Em seguida, foi avaliado se o EEPpg seria capaz de reduzir a expansão das células Mac-1<sup>+</sup> no baço e também no peritônio de camundongos DBA1/J, estimulados com AFC. Os resultados mostraram que o EEPpg reduziu os números relativos bem como os números absolutos de células Mac-1<sup>+</sup> nos baços de camundongos DBA1/J após 10 dias de tratamento. (Figura 24). O EEPpg pode está impedindo a geração ou induzindo a morte desta células. Logo, seria interessante avaliar o estado de apoptose das células Mac-1<sup>+</sup> do baço de camundongos injetados com AFC tratados ou não com EEPpg, o que será realizado futuramente.

No peritônio, apesar de não significativo, a redução no percentual de células Mac-1<sup>+</sup> no lavado peritoneal do grupo AFC-V, poderia estar relacionado não à geração, mas à migração dessas células.

A mielopoiese tem sido sugerida como um fator relativamente importante na patogênese da AR (Hamilton, 2001) e logo torna-se interessante como um possível alvo para intervenção terapêutica. O EEPpg, por sua vez, dentre seus outros efeitos descritos neste trabalho, deve também ser capaz de interferir sobre a mielopoiese.



## 6 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- O tratamento com EEPpg mostrou possuir um potente efeito antiartrítico, ao ser capaz de inibir o desenvolvimento e a progressão da artrite experimental em doses baixas do mesmo.
- O efeito antiartrítico do EEPpg pode estar relacionado à inibição da migração de leucócitos para o sítio inflamatório, mais especificamente para o tecido sinovial das articulações, além de inibição da destruição da cartilagem e do osso adjacente, como verificado por melhora nas características histopatológicas.
- O efeito do tratamento com EEPpg sobre o peso dos linfonodos e do timo sugere uma ação direta sobre esses órgãos, ou mais especificamente sobre as células (como os linfócitos) e ou eventos celulares nesses locais.
- A inibição pelo o tratamento com EEPpg reduziu o infiltrado celular nas articulações, assim como o número de neutrófilos, monócitos e linfócitos, no sangue, as quais são importantes no desenvolvimento da AR e encontradas em grande quantidade nas articulações artríticas.
- O efeito antiproliferativo do EEPpg sobre linfócitos ativados foi verificado de forma potente em todas as concentrações testadas, quando estimulados com Con A, e apenas nas mais altas quando estimulados com LPS, o que foi corroborado pelo análise sobre do ciclo celular
- O EEPpg induziu a apoptose dos linfócitos ativados com Con A apenas nas concentrações de 10 e 20 µg/mL. A concentração de 5 µg/mL pode ter um efeito mais citoestático do que indutor de apoptose dessas células.
- O modelo de mielopoiese induzida por adjuvante de Freund mostrou ser reprodutivo em duas linhagens (DBA/1J e C57Bl/6) utilizadas para o estudo de artrite experimental, sendo um modelo eficiente e relativamente rápido para estudo de efeito de plantas medicinais neste processo.
- O EEPpg reduziu a expansão de células Mac-1<sup>+</sup> no baço no modelo de mielopoiese induzida por AFC.

- A presença de flavonóides e uma variedade de terpenóides demonstrada por TLC e por HPLC e GC-MS, sugere uma riqueza um possível envolvimento destes compostos com os efeitos do EEPpg observados neste trabalho.

Por fim, o trabalho demonstrou pela primeira vez um efeito anti-inflamatório crônico, agudo e imunossupressor de *Pterodon polygalaeiflorus* até então nunca estudado. O que nos evoca a necessidade de continuação do trabalho com esta espécie no intuito de aprofundar seus mecanismos de ação, além de fracionar e caracterizar seus compostos ativos.

## REFERÊNCIAS

- Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S.. Cellular and Molecular Immunology. 6<sup>th</sup> ed. Saunders 2007.
- Adrain, C., Martin, S.J.. The mitochondrial apoptosome: A killer unleashed by the cytochrome seas. Trends Biochem. Sci. 26: 390, 2001.
- Afzali ,B., Lombardi, G., Lechler, R.I. and Lord, G. M.. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. Clin. Exp. Immunol. 148: 32-46, 2007.
- Almeida, E.R.. Plantas medicinais brasileiras. Conhecimentos populares e científicos. HEMUS 321-322, 1993.
- Alves, D.L., de Fátima, A.. Synthesis, antiproliferative activity in cancer cells and theoretical studies of novel 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxyvouacapan-17 $\beta$ -oic acid Mannich base derivatives. Bioorg. Medic. Chem. 18: 8172-8177, 2010.
- Arriaga, A.M.C., Castro, M.A.B., Silveira, E.R., Braz-Filho, R.. Further diterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeiflorus*. J. Braz. Chem. Soc. 11: 187-190, 2000.
- Balunas, M.J., Kinghorn, A.D.. Drug discovery from medicinal plants. Life Sci. 78: 431-441, 2005.
- Barton, G.M.. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. J. Clin. Invest. 118: 413-420, 2008.
- Bartok, B., Firestein, G.S.. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. Immunol. Rev. **233**: 233-255, 2010.
- Bayir H., Kagan, V.E.. Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis—there is nothing more practical than a good theory. Crit. Care 12: 206, 2008
- Becker, R.C.. Cell-Based Models of Coagulation: A Paradigm in Evolution. J. Thromb. Thrombolysis. 20: 65-8, 2005.
- Beller, D.I., Springer, T.A., Schreiber, R.D.. Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. J. Exp. Med. 156: 1000-1009, 1982.
- Belinelo, V.J., Reis, G.T., Stefani, G.M., Ferreira-Alves, D.L., Piló-Veloso, D.. Synthesis of 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxyvouacapan-17 $\beta$ -oic acid derivatives. Part IV. Mannich base derivatives and its activities on the electrically stimulated guinea-pig ileum preparation. J. Braz. Chem. Soc. 13: 830-837, 2002.
- Billiau, A., Matthys, P.. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. J. Leukoc. Biol. 70: 849-60, 2001.
- Boismenu, R., Chen, Y.. Insights from mouse models of colitis. J. Leukoc. Biol. 67:267-78, 2000.
- Blumenthal, M., Brusse, W.R., Goldberg, A., Gruenwald, J., Hall, T., Riggins, C.W., Rister, R.S.. The Complete German Commission E Monographs. Therapeutic Guide to Herbal Medicines. The American Botanical Council, Austin, TX, USA, 1998.
- Blumenthal, M.. Herb industry sees mergers, acquisitions, and entry by pharmaceutical giants in 1998. HerbalGram 45: 67-68, 1999.

- Blumenthal, M.. Harvard study estimates consumers spend \$5.1 billion on herbal products? *HerbalGram* 45: 68, 1999.
- Bouillet, P. and O'Reilly, L.. CD95, BIM and T cell homeostasis, *Nat. Rev Immunol* 9: 514-519, 2009.
- Brand, D.D., Kang, A.H., Rosloniec, E.F.. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin. Immunopathol.* 25: 3-18, 2003.
- Brasil. Congresso Nacional. Lei no. 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. DOU. Poder Legislativo, Brasília, DF, 27 jan. 1999.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápico junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004<sup>a</sup>.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução no. 88 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre a Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004<sup>b</sup>.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução no. 89 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre a Lista de registro simplificado de fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004<sup>c</sup>.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução no. 90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004<sup>d</sup>.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução no. 91 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamento pós-registro de fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004<sup>e</sup>.
- Braz-Filho, R., Gottlieb, O.R.. The isoflavones from *Pterodon pubescens*. *Phytochem.* 10: 2835-2836, 1971.
- Brevoort, P.. The U.S. botanical market. An overview. *HerbalGram* 36: 49-59, 1995.
- Brevoort, P.. Botanical (herbal) medicine in the United States. *Pharmac. News* 3: 26-28, 1996.
- Brown, E.C., Newman, D.J.. The US National Cancer Institute's natural products repository; origins and utility. *J. Environ. Monit.* 8: 800-805, 2006.
- Burek, C.L, Talor, M.V.. Environmental triggers of autoimmune thyroiditis. *J. Autoimmun.* 33: 183-189, 2009.
- Calder, P.C., Albers, R., Antoine, J.-M., Blum, S., Bourdet-Sicard, R., Ferns, G.A., Folkerts, G., Friedmann, P.S., Frost, G.S., Guarner, F., Løvik, M., Macfarlane, S., Meze, P. D., Rabe, L. M't, Serafini, M., van Eden, W., van Loo, J., Vas Dias, W., Vidry, S., Winklhofer-Roob, B.M. and Zhao, J.. Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition. *Br. J. Nutr.* 101 (Suppl) 1: S1-45, 2009.
- Calixto, J.B.. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. *J. Ethnopharm.* 100: 131-134, 2005.

- Calixto, J.B., Siqueira Júnior, J.M.. O desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. *Gazeta Médica da Bahia* 78 (Supl. 1): 98-106, 2008.
- Campbell, I.K., Hamilton, J.A., Wicks, I.P.. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis, *Eur. J. Immunol.* 30: 1568-1575, 2000.
- Campos, A.M., Craveiro, A.A., Teixeira, T.C.. Óleo essencial das sementes de *Pterodon polygalaeflorus* Benth. In: Resumos da Reunião da Sociedade Brasileira de Química, PN-004, 1990.
- Campos, A.M., Silveira, E.R., Braz-Filho, R., Teixeira, T.C.. Diterpenoids from *Pterodon polygalaeflorus*. *Phytochem.* 36: 403-406, 1994.
- Cardoso, C.C., Pinto, A.C., Marques, P.R., Gayer, C.R., Afel, M.I., Coelho, M.G., Sabino, K.C.. Suppression of T and B cell responses by *Pterodon pubescens* seeds ethanolic extract. *Pak. J. Biol. Sci.* 1: 2308-2313, 2008.
- Carvalho, A.C.B., Balbino, E.E., Maciel, A., Perfeito, J.P.S.. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. Gerência de Medicamentos Específicos, Fitoterápicos e Homeopáticos, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Trecho 5, Área Especial 57, 71205-050. Brasília-DF, Brasil, 2008.
- Carvalho, J.C.T., Sertie, J.A.A., Barbosa, M.V.J., Patricio, K.C.M., Caputo, L.R.G., Sarti, S.J., Ferreira, L.P., Bastos, J.K. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the frutis of *Pterodon emarginatus* Vog. *J. Ethnopharmacol.* 64: 127-133, 1999.
- Carraway, M.S., Welty-Wolf, K.E., Miller, D.L., Ortel, T.L., Idell, S., Ghio, A.J., Petersen, L.C., Piantadosi, C.A.. Blockade of tissue factor: treatment for organ injury in established sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167: 1200-1209, 2003.
- Cechinel Filho, V., Yunes, R.A., Pedrosa, R.C.. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento de indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Quím. Nova* 24: 147-152, 2001.
- Cerqueira, F., Cordeiro-Da-Silva, A., Gaspar-Marques, C., Simões, F., Pinto, M.M., Nascimento, M.S.. Effect of abietane diterpenes from *Plectranthus grandidentatus* on T- and B-lymphocyte proliferation. *Bioorg. Med. Chem.* 12: 217-223, 2004.
- Chaplin, D.D.. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2 Suppl. 2): S3-23, 2010.
- Chen, S.. Natural Products Triggering Biological Targets - A Review of the Anti Inflammatory Phytochemicals Targeting the Arachidonic Acid Pathway in Allergy Asthma and Rheumatoid Arthritis. *Curr. Drug Targets* 18: Epub ahead of print, 2010.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., Dixit, V.M.. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81: 505-512, 1995.
- Cho, Y.G., Cho, M.L., Min, S.Y., Kim, H.Y.. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 7: 65-70, 2007.
- Choy, E.H., Smith, C., Doré, C.J., Scott, D.L.. A meta-analysis of the efficacy and toxicity of combining disease-modifying anti-rheumatic drugs in rheumatoid arthritis based on patient withdrawal. *Rheumatol.* 44: 1414-1421, 2005.

- Coelho, L.P., Reis, P.A., de Castro, F.L., Gayer, C.R.M., Lopes, C.S., Silva, M.C.C., Sabino, K.C.C., Todeschini, A.R., Coelho, M.G.P.. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. Seeds. *J. Ethnopharmacol.* 98: 109-116, 2005.
- Coelho, M.G.P., Sabino, K.C.C., Dalmau, S.R.. Immunomodulatory effects of Sucupira (*Pterodon pubescens*) seed infusion on collagen-induced arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 22: 213-218, 2004.
- Coimbra, R.. Notas de Fitoterapia. Catálogo dos dados principais sobre plantas utilizadas em medicina e farmácia. Edição de Carlos Silva Araújo. pp. 222, 1942.
- Corrêa, A.D., Batista, R.S., Quintas, L.E.M.. Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica, Editora Vozes, 6ªEd., Petrópolis- RJ, 2003.
- Corthay, A., Johansson, A., Vestberg, M., Holmdahl, R.. Collagen-induced arthritis development requires alphabeta T cells but not gammadelta T cells: studies with T cell-deficient (TCR mutant) mice. *Int. Immunol.* 11: 1065-1073, 1999.
- Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T.. Pathologic basis of disease. Sixth edition. USA W.B. Saunders Company pp. 50-88, 1999.
- Clardy, J., Walsh, C.. Lessons from natural molecules. *Nature*, 432: 729-837, 2004.
- Claridge, T.D.W.. High-Resolution NMR techniques in Organic Chemistry. Pergamon, New York, 1999.
- Croasmun, W.R., Carlson, R.M.K.. Two-dimensional NMR Spectroscopy: Applications for Chemists and Biochemists, second ed. Wiley-VCH, 1994.
- Cruvinel, W.M., Mesquita, D.J., Araújo, J.A., Catelan, T.T., de Souza, A.W., da Silva, N.P., Andrade, L.E.. Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Rev. Bras. Reumatol.* 50: 434-461, 2010.
- Cruz, G.L.. Livro verde das plantas Mediciniais e industriais do Brasil. Belo Horizonte, M.G. 2: 779-780, 1965.
- Cyster, J.G.. Chemokines and Cell Migration in Secondary Lymphoid Organs. *Science* 286: 2098-2102, 1999.
- Dahlen, S.E.. Treatment of asthma with antileukotrienes: first line or last resort therapy? *Eur. J. Pharmacol.* 533: 40-56, 2006.
- Dalmau, S.R., Freitas, C.S., Savino, W.. Upregulated expression of fibronectin receptors underlines the adhesive capability of thymocytes to thymic epithelial cells during the early stages of differentiation: Lessons from sublethally irradiated mice. *Blood* 93: 974-990, 1999.
- Dalmau S.R., Sabino, K.C.C., Gayer, C.R.M., Silva, M.C.C., Guerra, A.C.O., Coelho, M.G.P.. Cytofluorometric analysis of activated lymph node (LN) T cells from mice treated for collagen induced arthritis (CIA) with sucupira (*P. pubescens*). Anais da XIV Reunião Annual da FESBE, pág.229, Res 26-007, Caxambu, MG, 1999.
- Danen, E.H., Sonnenberg, A.. Integrins in regulation of tissue development and function. *J. Pathol.* 200: 471-480, 2003.
- Dangerfield, J., Larbi, K.Y., Huang, M. T., Dewar, A. & Nourshargh, S. PECAM-1 (CD31) hemophilic interaction up-regulates  $\alpha 6 \beta 1$  on transmigrated neutrophils *in vivo* and plays a functional role in the ability of  $\alpha 6$  integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. *J. Exp. Med.* 196: 1201-1211, 2002.

- Daridon, C., Burmester, G.R., Dörner, T.. Anticytokine therapy impacting on B cells in autoimmune diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.* 21: 205 - 210, 2009.
- Davidson, A., Diamond, B.. Autoimmune diseases. *N. Engl. J. Med.* 345: 340-350, 2001.
- Davie, E.W., Ratnoff, O.D.. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 145: 1310-1312, 1964.
- Davies, D.E., Wicks, J., Powell, R.M., Puddicombe, S.M., Holgate, S.T.. Airway remodeling in asthma: new insights. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111: 215-225, 2003.
- de las Heras, B., Navarro, A., Díaz-Guerra, M.J., Bermejo, P., Castrillo, A., Boscá, L., Villar, A.. Inhibition of NOS-2 expression in macrophages through the inactivation of NF-kappa B by andalusol. *Br. J. Pharmacol.* 128: 605-612, 1999.
- Delves, P.J., Roitt, I.M.. The immune system. First of two parts. *N. England. J. Med.* 343: 108-117, 2000.
- Demuner, A.J., Barbosa, L.C.A., Piló-Veloso, D., Ferreira-Alves, D.L., Howarth, O.W.. Structure and plant growth regulatory activity of new diterpenes from *Pterodon polygalaeflorus*. *J. Nat. Prod.* 59: 110-112, 1996.
- Dedeoglu, F.. Drug-induced autoimmunity. *Curr. Opin. Rheumatol.* 21: 547-51, 2009.
- De Omena, M.C., Bento, E.S., De Paula, J.E., Sant'Ana, A.E.. Larvicidal diterpenes from *Pterodon polygalaeflorus*. *Vector Borne Zoonotic Dis. Summer* 6: 216-222, 2006.
- Deng, G., Sanyal, G.. Applications of mass spectrometry in early stages of target based drug discovery. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40: 528-538, 2006.
- Denzlinger, C., Rapp, S., Hagmann, W., Keppler, D.. Leukotrienes as mediators in tissue trauma. *Science* 230: 330-332, 1985.
- Deighton, C.M., Walker, D.J., Griffiths, I.D., Roberts, D.F.. The contribution of HLA to Rheumatoid arthritis. *Clin. Genet.* 36:178-182, 1989.
- De Smet, P.A.G.M.. The role of plant derived drugs and herbal medicines in healthcare. *Drugs* 54: 801-840, 1997.
- Diamond, M.S., Staunton, D.E., de Fougerolles, A.R., Stacker, S.A., Garcia-Aguilar, J., Hibbs, M.L., Springer, T.A.. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1. *J. Cell Biol.* 111: 3129-3139, 1990.
- Di Gennaro, A., Kenne, E., Wan, M., Soehnlein, O., Lindbom, L., Haeggström, J.Z.. Leukotriene B4-induced changes in vascular permeability are mediated by neutrophil release of heparin-binding protein (HBP/CAP37/azurocidin). *FASEB J.* 23: 1750-1757, 2009.
- Donahue, K.E., Gartlehner, G., Jonas, D.E., Lux, L.J., Thieda, P., Jonas, B.L., Hansen, R.A., Morgan, L.C., Lohr, K.N.. Systematic review: comparative effectiveness and harms of disease-modifying medications for rheumatoid arthritis. *Ann. Intern. Med.* 148: 124-134, 2008.
- Duarte, I.D.G., Ferreira Alves, D.L., Nakamura-Craig, M.. Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia induced by vouacapan. *Life Sci.* 50: 891-897, 1992.
- Duarte, I.D.G., Ferreira-Alves, D.L., Veloso, P.D., Nakamura-Craig, M.. Evidence of the involvement of biogenic amines in the antinociceptive effect of a vouacapan extracted from *Pterodon polygalaeflorus* Benth. *J. Ethnopharmacol.* 55: 13-18, 1996.

- Dutra, R.C., Leite, M.N., Barbosa, N.R.. Quantification of Phenolic Constituents and Antioxidant Activity of *Pterodon emarginatus* Vogel Seeds. *Int. J. Mol. Sci.* 9: 606-614, 2008.
- Dutra, R.C., Fava, M.B., Alves, C.C., Ferreira, A.P., Barbosa, N.R.. Antiulcerogenic and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds. *J. Pharm. Pharmacol.* 61: 243-250, 2009.
- Editorial: Pharmaceuticals from plants: great potential, few funds. *Lancet* 343: 1513-1515, 1994.
- Eisenberg, D.M., Kessler, R.C., Foster, C., Norlock, F.E., Calkins, D.R., Delbanco, T.L. Unconventional medicine in the United States. Prevalence, costs, and patterns of use. *N. Engl. J. Med.* 328: 246-252, 1993.
- Emery, P.. Treatment of rheumatoid arthritis. *Bras. Med. J.* 332: 152-155, 2006.
- Euzébio, F.P.G., dos Santos, F.J.L., Piló-Veloso, D., Ruiz, A.L.T.G., Carvalho, J.E., Ferreira-Alves, D.L., de Fátima, A.. Effect of 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxyvouacapan-17 $\beta$ -oic acid and its lactone derivatives on the growth of human cancer cells. *Bioorg. Chem.* 37: 96-100, 2009.
- Euzébio, F.P.G., dos Santos, F.J.L., Piló-Veloso, D., Ruiz, A.L.T.G., Carvalho, J.E., Ferreira-Alves, D.L., de Fátima, A.. Synthesis, antiproliferative activity in cancer cells and theoretical studies of novel 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxyvouacapan-17 $\beta$ -oic acid Mannich base derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 18: 8172-8177, 2010.
- Ethuin, F., Gérard, B., Benna, J.E., Boutten, A., Gougereot-Pocidallo, M.A., Jacob, L., Chollet-Martin, S.. Human neutrophils produce interferon- $\gamma$  upon stimulation by interleukin-12. *Lab. Invest.* 84: 1363-1371, 2004.
- Evangelista, G.L., Coelho-de-Souza, A.N., Santos, C.F., Cardoso, J.H.L., Lopes, E.A.B., Santos, M.V., Lahlou, S., Magalhães, P.J.C. Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* inhibits eletromechanical coupling on rat isolated trachea. *J. Ethnopharmacol.* 109: 515-522, 2007.
- Fagerholm, S.C., Varis, M., Stefanidakis, M., Hilden, T.J., Gahmberg, C.G.. alpha-Chain phosphorylation of the human leukocyte CD11b/CD18 (Mac-1) integrin is pivotal for integrin activation to bind ICAMs and leukocyte extravasation. *Blood* 108: 3379-3386, 2006.
- Fal, A.M., Kopeć, A.. Status of leukotrienes in the pathophysiology of asthma. Necessity for antileukotrienes treatment. *Pneum. Alergol. Pol.* 78: 68-73, 2010.
- Fascio, M., Gilbert, B., Mors, W.B., Nishida, T.. Two new diterpenes from *Pterodon pubescens*. *An. Acad. Brasil. Ciênc.* 42: 97-101, 1970.
- Fascio, M., Mors, W.B., Santos Filho, D., Vichonewski, W.. Diterpenoid furans from *Pterodon species*. *Phytochem.* 15: 201-203, 1976.
- Feghali, C.A., Wright, T.M.. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front. Biosci.* 2: 12-26, 1997.
- Fleming, S.D., Tsokos, G.C.. Complement, natural antibodies, autoantibodies and tissue injury. *Autoimmun. Rev.* 5: 89-92, 2006.
- Friedl, H.P., Till, G.O., Trentz, O., Ward, P.A.. Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin. *Am. J. Pathol.* 135: 203-217, 1989.
- Fisher, P., Ward, A.. Complementary medicine in Europe. *Bras. Med. J.* 309: 107-111, 1994.
- Firestein, G.S.. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423: 356-361, 2003.



- Firestein, G.S.. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Firestein, G.S., Budd, R.C., Harris, T., McInnes, I.B., Ruddy, S., Sargent, J.S. eds. *Kelly's Textbook of Rheumatology*. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, pp.1035-1086, 2009.
- Foucault, A.P. (Ed.). *Centrifugal Partition Chromatography*. Chromatographic Science Series, vol. 68. Marcel Dekker, Inc., New York, 1995.
- Fournier, C.. Where do T cells stand in rheumatoid arthritis? *Joint Bone Spine* 72: 527-532, 2005.
- Fugger, L., Rothbard, J.B., Sonderstrup-McDevitt, G.. Specificity of an HLA-DRB1\*0401-restricted T cell response to type II collagen. *Eur. J. Immunol.* 26: 928-933, 1996.
- Franco, R.F.. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina, Ribeirão Preto* 34: 229-237, 2001.
- Fullbeck, M., Michalsky, E., Dunkel, M., Preissner, R.. Natural products: sources and databases. *Nat. Prod. Rep.* 23: 347-356, 2006.
- Funk, C.D.. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871-1875, 2001.
- Funk, C.D.. Leukotriene modifiers as potential therapeutics for cardiovascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4: 664-672, 2005.
- Gahmberg, C.G.. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 643-650, 1997.
- Gallina, G., Dolcetti, L., Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Colombo, M.P., Basso, G., Brombacher, F., Borrello, I., Zanovello, P., Biccato, S., Bronte, V.. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J. Clin. Invest.* 116: 2777-2790, 2006.
- Gao, Y.. The multiple actions of NO. *Eur. J. Physiol.* 459: 829-839, 2010.
- Gao, X., Deeb, D., Liu, Y., Gautam, S., Dulchavsky, S.A., Gautam, S.C.. Immunomodulatory activity of xanthohumol: inhibition of T cell proliferation, cell-mediated cytotoxicity and Th1 cytokine production through suppression of NF- $\kappa$ B. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 31: 477-484, 2009.
- Gao, X., Xu, Y.X., Janakiraman, N., Chapman, R.A., Gautam, S.C.. Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochem. Pharmacol.* 62: 1299-1308, 2001.
- Garrod, T., Lee, L., Pitzalis, C.. Molecular mechanisms of cell recruitment to inflammatory sites: general and tissue-specific pathways. *Rheumatol.* 45: 250-260, 2006.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K.. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327: 656-661, 2010.
- Gelderman, K.A., Hultqvist, M., Olsson, L.M., Bauer, K., Pizzolla, A., Olofsson, P., Holmdahl, R.. Rheumatoid arthritis: the role of reactive oxygen species in disease development and therapeutic strategies. *Antioxid. Redox Signal.* 9: 1541-1567, 2007.
- Gibbons, L.J., Hyrich, K.L.. Biologic therapy for rheumatoid arthritis: clinical efficacy and predictors of response. *BioDrugs.* 23: 111-124, 2009.
- Gomord, V., Chamberlain, P., Jefferis, R., Faye, L. Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *Trends Biotechnol.* 23: 559-565, 2005.

- Gordon, S. and Taylor, P. R., Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 953-964, 2005.
- Goronzy, J.J., Zettl, A., Weyand, C.M.. T cell receptor repertoire in rheumatoid arthritis. *Int. Rev. Immunol.* 17: 339 -363, 1998.
- Gosselin, E.J., Wardwell, K., Rigby, W.F., Guyre, P.M.. Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma, and IL-3. *J. Immunol.* 151: 1482-1490, 1993.
- Gierut, A., Perlman, H., Pope, R.M.. Innate immunity and rheumatoid arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 36: 271-96, 2010.
- Grivicich, I., Regner, A., da Rocha, A.B.. Apoptosis: Programmed Cell Death. *Rev. Brasil. Canc.* 53: 335-343, 2007.
- Grünwald, J.. The European phytomedicines market: figures, trends, analysis. *HerbalGram* 34: 60-65, 1995.
- Guerra, P.M., Nodari, O.R.. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, M.O. *et al.* *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 3. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC. pp.15, 2001.
- Gurib-Fakim, A.. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.* 27: 1-93, 2006.
- Haeggström, J.Z., Rinaldo-Matthis, A., Wheelock, C.E., Wetterholm, A.. Advances in eicosanoid research, novel therapeutic implications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396: 135-139, 2010.
- Hafstrom, I., Palmblad, J., Malmsten, C.L., Radmark, O., Samuelsson, B.. Leukotriene B4 – a stereospecific stimulator for release of lysosomal enzymes from neutrophils. *FEBS Lett.* 130: 146-148, 198.
- Harris, E.D. Jr.. Prednisolone in early rheumatoid arthritis: an antiinvasive effect. *Arthritis Rheum.* 52: 3324-3325, 2005.
- Hall, J.M., Morton, I.K.M.. The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors. In: Farmer SG, editor. *The handbook of immunopharmacology: the kinin system*, London: Acad. Press: 9-43, 1997.
- Hamilton, J.A.. Rheumatoid arthritis: opposing actions of haemopoietic growth factors and slow-acting anti-rheumatic drugs. *Lancet* 342: 536-539, 1993.
- Hamilton, T.A. Molecular basis of macrophage activation: from gene expression to phenotypic diversity. In *The Macrophage* (Bourke, B. and Lewis, C. eds), pp. 73-102, 2002.
- Harris, E.D.J., Budd, R.C., Firestein, G.S., *et al.* *Kelley's textbook of rheumatology.* 7<sup>th</sup> edition. Elsevier Saunders pp. 996, 2005.
- Harris, N. L., Rochese, F. The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol. Cell. Biol.* 77: 304-311, 1999.
- Hecker, G., Ney, P., Schror, K.. Cytotoxic enzyme release and oxygen centered radical formation in human neutrophils are selectively inhibited by E-type prostaglandins but not by PGI<sub>2</sub>. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 341: 308-315, 1990.
- Hengartner, MO.. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776, 2000.

- Hersberger, M.. Potential role of the lipoxygenase derived lipid mediators in atherosclerosis: leukotrienes, lipoxins and resolvins. *Clin. Chem. Lab. Med.* 48: 1063-1073, 2010.
- Hill, J.A., Southwood, S., Sette, A., Jevnikar, A.M., Bell, D.A., Cairns, E.. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1\*0401 MHC class II molecule. *J. Immunol.* 171: 538-541, 2003.
- Holmdahl, R., Bockermann, R., Bäcklund, J., Yamada, H.. The molecular pathogenesis of collagen-induced arthritis in mice--a model for rheumatoid arthritis. *Ageing Res. Rev.* 1: 135-147, 2002.
- Holmdahl, R., Jansson, L., Gullberg, D., Rubin, K., Forsberg, P.O., Klareskog, L.. Incidence of arthritis and autoreactivity of anti-collagen antibodies after immunization of DBA/1 mice with heterologous and autologous collagen II. *Clin. Exp. Immunol.* 62: 639-646, 1985.
- Holtzman, M.J., Green, J.M., Jayaraman, S. and Arch, R.H.. Regulation of T cell apoptosis. *Apoptosis*; 5: 459-471, 2000
- Huang, Q.Q., Pope, R.M.. The role of toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 11: 357-364, 2009.
- Huerta, S., Goulet, E.J., Huerta-Yepe, S., Livingston, E.H. Screening and detection of apoptosis. *Surg. Res.* 139: 143-156, 2007.
- Humby, F., Bombardieri, M., Manzo, A., Kelly, S., Blades, M.C., Kirkham, B., Spencer, J., Pitzalis, C.. Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. *PLoS Med.* 6: (1)e1, 2009.
- Hurley, J.V.. *Acute inflammation*. Edinburgh, London: Churchill Livingstone, 1972.
- Imhof, B.A., Aurrand-Lions, M., Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nature Rev. Immunol.* 4: 432-444, 2004.
- Janeway, C.A., Jr., Medzhitov, R.. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197-216, 2002.
- Jenkins, M.K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D.L., McSorley, S.J., Reinhardt, R.L., Itano, A., Pape, K.A. *In vivo* activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 23-45, 2001.
- Jansson, L., Holmdahl, R.. Enhancement of collagen-induced arthritis in female mice by estrogen receptor blockage. *Arthr. Rheum.* 44: 2168-2175, 2001.
- Kai, H., Shibuya, K., Wang, Y., Kameta, H., Kameyama, T., Tahara-Hanaoka, S., Miyamoto, A., Honda, S., Matsumoto, I., Koyama, A., Sumida, T., Shibuya, A.. Critical role of *M. tuberculosis* for dendritic cell maturation to induce collagen-induced arthritis in H-2b background of C57BL/6 mice. *Immunology* 118: 233-239, 2006.
- Kaiser, R.. Incidence of lymphoma in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature. *Clin. Lymph. Myel.* 8: 87-93, 2008.
- Kannan, K., Ortmann, R.A., Kimpel, D.. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology* 12: 167-181, 2005.
- Kamradt, T., Frey, O.. Arthritis: where are the T cells? *Arthritis Res, Ther.* 12: 122, 2010.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R.. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257, 1972.

- Kim, K.-S., Lee, S.-D., Kim, K.-H., Kil, S.-Y., Chung, K.-H., and Kim, C.-H.. Suppressive effects of a water extract of *Ulmus davidiana* Planch (Ulmaceae) on collagen-induced arthritis in mice. *J. Ethnopharmacol.* 97: 65-71, 2005.
- Kinashi, T.. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nature Rev. Immunol.* 5: 546-559, 2005.
- Kirwan, J.R., Bijlsma, J.W., Boers, M., Shea, B.J.. Effects of glucocorticoids on radiological progression in rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 1: CD006356, 2007.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I, Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E.. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95) - associated proteins form a deathinducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14: 5579–5588, 1995.
- Kochi, Y., Suzuki, A., Yamada, R., Yamamoto, K.. J. Genetics of rheumatoid arthritis: underlying evidence of ethnic differences. *Autoimm.* 32: 158-162, 2009.
- Krammer, P.H.. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789, 2000.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., and Mitchell, M.. Robbins basic pathology. W.B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, USA, pp. 960, 2007.
- Kunkel, E.J., Butcher, E.C.. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* 16: 1-4, 2002.
- Laudanna, C., Kim, J. Y., Constantin, G. & Butcher, E. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol. Rev.*, 186, 37–46, 2002.
- Laufer, T.M.. Inflammatory arthritis - an exciting confluence of human and animal research. *Immunological Reviews* 233: 5–8, 2010.
- Lawrence, G.H.M.. *The Taxonomy of Vascular Plants*. The Macmillan Company, New York, 1951.
- Lawrence, T., Gilroy, DW.. Chronic inflammation: a failure of resolution? *Int. J. Exp. Pathol.* 88: 85-94, 2007.
- Leal, L.K.A.M., Ferreira, A.A.G., Bezerra, G.A., Matos, F.J.A., Viana, G.S.B. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilatador activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *J Ethnopharmacol.* 70: 151-159, 2000.
- Lee, D.M., Schur, P.H.. Clinical utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 62: 870, 2003.
- Lee, D.M., Weinblatt, M.E.. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 358: 903-911, 2001.
- Levi, M., van der Poll, T.. Two way interactions between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc. Med.* 15: 254-259, 2005.
- Lewinsohn, T. M.; Prado, P. I. Quantas espécies há no Brasil? *Megadiversidade*, v. 1, n.1, p. 36-42, 2005.
- Ley K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S.. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade update. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 678-689, 2007.
- Libby, P.. Inflammatory Mechanisms: the molecular Basis of inflammation and disease. *Nutr. Rev.* 65: S140-146, 2007.
- Liew, F.Y.. The role of innate cytokines in inflammatory response. *Imunol. Lett.* 85: 131-134, 2003.

- Littleton, J., Rogers, T., Falcone, D.. Novel approaches to plant drug discovery based on high throughput pharmacological screening and genetic manipulation. *Life Sci.* 78: 467-475, 2005.
- Lleo, A., Invernizzi, P., Gao, B., Podda, M., Gershwin, M.E.. Definition of human autoimmunity-autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.* 9: A259-266. Epub 2009 Dec 4, 2010.
- Locati, M., Bonocchi R., and Corsi, M.. Chemokines and Their Receptors Roles in Specific Clinical Conditions and Measurement in the Clinical Laboratory Pathology Patterns Reviews, 2005.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A.. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Instituto Plantarum, São Paulo, pp. 544, 2002.
- Lorenzo, M. Rheumatoid arthritis. *Foot Ankle Clin.*12: 525-37, vii, 2007.
- Lubberts, E..Th17 cytokines and arthritis *Semin Immunopathol* 32: 43-53, 2010.
- Lubberts, E., Koenders, M.I., van den Berg, W.B.. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res. Ther.* 7: 29-37, 2005.
- Macfarlane, R.G.. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 202: 498-499, 1964.
- MacGregor, A.J., Snieder, H., Rigby, A.S., Koskenvuo, M., Kaprio, J., Aho, K., Silman, A.J.. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthr. Rheum.* 43: 30-37, 2000.
- Mahjan, J.R., Monteiro, M.B.. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus*. *An. Acad. Brasil. Ciênc.* 42: 103-107, 1970.
- Mahjan, J.R., Monteiro, M.B.. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus*. *J. Chem. Soc. Perkintrans* 1: 520-525, 1973.
- Majeti, R., Xu, Z., Parslow, T.G., Olson, J.L., Daikh, D.I., Killeen, N., Weiss, A.. An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity. *Cell* 103: 1059-1070, 2000.
- Manuele, M.G., Ferraro, G., Anesini, C.. Effect of *Tilia x viridis* flower extract on the proliferation of a lymphoma cell line and on normal murine lymphocytes: contribution of monoterpenes, especially limonene. *Phytother. Res.* 22: 1520-1526, 2008.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M.. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25: 677-686, 2004.
- Mantovani, A., Sica, A., Locati, M.. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur. J. Immunol.* 37:14-16, 2007.
- Manzo, A., Bombardieri, M., Humby, F., Pitzalis, C.. Secondary and ectopic lymphoid tissue responses in rheumatoid arthritis: from inflammation to autoimmunity and tissue damage/remodeling. *Immunol. Rev.* 233: 267-285, 2010.
- Marceau, F., Hess, J.F., Bachvarov, D.R.. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Ver* 50: 357-386, 1998.
- Marques, D.D., Machado, M.I.L., Carvalho, M.G., Meleira, L.A.C., Braz-Filho, R.. Isoflavonoids and triterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. *J. Braz. Chem. Soc.* 9: 295-301, 1998.

- Marsden ,V.S.and Strasser, A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-Only Proteins and More. *Annu. Rev. Immunol.* 21:71-105, 2003.
- Marston, B., Palanichamy, A., Anolik, J.H.. B cells in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 22: 307-315, 2010.
- Matthys, P., Vermeire, K., Mitera, T., Heremans, H., Huang, J., Schols, D., Dewolf-Peeters, C., Billiau, A.. Enhanced autoimmune arthritis in IFN-g receptor- deficient mice is conditioned by mycobacteria in Freund's adjuvant and by increased expansion of Mac-11 myeloid cells. *J. Immunol.* 163: 3503-3510, 1999.
- McChesney, J.D., Venkataraman, S.K., Henri, J.T.. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytoch.* 68: 2015-2022, 2007.
- McInnes, I. B., O'Dell, J. R.. State-of-the-art: rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 69: 1898-1906, 2010.
- McInnes, I.B., Schett, G.. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 429-442, 2007.
- McKay, D.L., Blumberg, J.B.. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytother. Res.* 20: 619-633, 2006.
- Medzhitov, R., Janeway, C., Jr.. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 343: 338-344, 2000.
- Medzhitov, R.. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454: 428-435, 2008.
- Medzhitov, R.. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449: 819-826, 2007.
- Mesquita-Júnior, D., Araújo, J.A.P., Catelan, T.T.T., de Souza, A.W.S., Cruvinel W.M., Andrade L.E.C., da Silva, N.P.. Immune System – part II. Basis of immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Bras. J. Rheumatol.* 50: 552-580, 2010.
- Middleton, E.Jr., Kandaswami, C., Theoharides, T.C.. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52: 673-751, 2000.
- Mookerjee, B.K., Lee, T.P., Logue, G.P., Lippe, H.A., Middleton, E. In: *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structural-activity Relationships*, Cody, V. *et al.*; Alan R. Liss, NewYork, pp. 511, 1986.
- Mosser, D.M., Edwards, J.P.. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 958-969, 2008.
- Moser, M., Leo, O.. Key concepts in immunology. *Vaccine.* 3(Suppl.): C2-13, 2010.
- Mors, W.B., Pellegrino, J., Santos Filho, M.F. Ação profilática do óleo de frutos da Sucupira Branca, *Pterodon pubescens* Benth., contra a infecção pelo *S. mansoni*. *An. Acad. Brasil. Ciênc.* 38 (Suppl.): 325-330, 1966.
- Mors, W.B., Santos Filho, M.F., Monteiro, H.J., Guilbert, B., Chemoprophylactic agent in schistosomiasis: 14, 15-Epoxygeranylgeraniol. *Science* 157: 950-951, 1967.
- Mössner, R., Lesch, K.P.. Role of serotonin in the immune system and neuroimmune interactions. *Brain Behav. Immun.* 12: 249-271, 1998.
- Muller, W.A.. Leukocyte–endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 24: 327-334, 2003.

- Muppidi, J.R., Tschopp, J., Siegel, R.M.. Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity* 21:461-465, 2004.
- Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355–365,1997.
- Nagata, S.. Apoptosis and autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1209: 10-16, 2010.
- Nandakumar, K.S., Holmdahl, R.. Antibody-induced arthritis: disease mechanisms and genes involved at the effector phase of arthritis. *Arthr. Res. Ther.* 8: 223, 2006.
- Narumiya, S.J. Prostanoids and inflammation: a new concept arising from receptor knockout mice. *Mol. Med.* 87: 1015-1022, 2009.
- Nathan, C.. Points of control in inflammation. *Nature* 420: 846-852, 2002.
- Neto, J.J.. Contribuição ao Estudo Farmacognóstico dos Frutos de *Pterodon pubescens* Benth. Tese de Doutorado. pp. 56, 1973.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M.. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66: 1022-1037, 2003.
- Nunan, E.A., Carvalho, M.G., Piló-Veloso, D., Turchetti-Maia, R.M.M., Ferreira- Alves, D.L.. Furane diterpenes with anti- and proinflammatory activity. *Rev. Brasil. Pesq. Méd. Biol.* 15: 450, 1982.
- Ortmann, R.A., Shevach, E.M.. Susceptibility to collagen-induced arthritis: cytokine-mediated regulation, *Clin. Immunol.* 98: 109-118, 2001.
- Oestergaard, S., Rasmussen, K.E., Doyle, N., Varela, A., Chouinard, L., Smith, S.Y., Qvist, P., Karsdal, M.A.. Evaluation of cartilage and bone degradation in a murine collagen antibody-induced arthritis model. *Scand. J. Immunol.* 67: 304-12, 2008.
- Pan, M. H., Lai, C.S., Ho, C.T.. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Funct.* 1: 15-31, 2010.
- Paula, F.B.A., Gouvêa, C.M.C.P., Alfredo, P.P., Salgado, I.. Protective action of a hexanic crude extract of *Pterodon emarginatus* fruits against oxidative and nitrosative stress induced by acute exercise in rats. *BMC Complem. Alternat. Med.* 5: 17, 2005.
- Ponta, H., Sherman, L., Herrlich, P.A.. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 33-45, 2003.
- Pena, M.. Dicionário brasileiro de plantas medicinais. 2º Ed. Editora livraria Kosmos. pp. 64-65, 1946.
- Pedersoli, J.L.. Contribuição ao conhecimento do gênero *Pterodon* Benth. P. *apparicioi* Pedersoli, n.sp.. *Acad. Brasil. Ciênc.* 42 (Suplem): 391-395, 1970.
- Pereira, M.F., Simão, T.A., Dalmau, S.R., Albano, R.M., Coelho, M.G.P., Sabino, K.C.C. *Pterodon pubescens* seed extract induces the cell cycle arrest of leukemic cells by deregulating cyclin D1 and E2 mRNA levels. *Oncol. Letters* 1: 533-536, 2010.
- Pereira, M.F., Martino, T., Dalmau, S.R., Albano, R.M., Férézou, J-P., Costa, S.S., Coelho, M.G.P., Sabino, K.C.C.. Terpenic subfraction of *Pterodon pubescens* induces apoptosis of K562 leukemic cells by modulating gene expression. *Oncol. Rep.* 1: 215-221, 2011.
- Peres, L.E.P.. *Metabolismo Secundário*. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP 1-10, 2004.
- Phillipson, D.J.. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochem.* 56: 237-243, 2001.

- Piggot, A.M.. Quality, not quantity: the role of natural products and chemical proteomics in modern drug discovery. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 7: 607-630, 2004.
- Pinheiro, S.F., Nizet, V.. Cell death during sepsis: integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. *Apoptosis* 14: 509-521, 2009.
- Pio Corrêa, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Vol. III. Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Rio de Janeiro, 1984.
- Pollard, J.W.. Trophic macrophages in development and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 259-270, 2009.
- Potterat, O.. Natural products in drug discovery – concepts and approaches for tracking bioactivity. *Curr. Org. Chem.* 10, 899-920, 2006.
- Prance, G.T. Floristic inventory of the tropics: where do we stand? *Ann. Missouri. Bot. Gard.* 64: 559-684, 1977.
- O'Garra, A., Steinman, L., Gijbels, K.. CD4+ T-cell subsets in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 872-883, 1997.
- Oshima-Franco, Y., Franco, L.M. Biotransformation: importance and toxicity. *Saúde Rev. Piracicaba* 5: 69-76, 2003.
- Rae, S.A., Smith, M.J.. The stimulation of lysosomal enzyme secretion from human polymorphonuclear leucocytes by leukotriene B4. *J. Pharm. Pharmacol.* 33:616-617, 1981.
- Ramadan, G., Al-Kahtani, M.A., El-Sayed, W.M.. Anti-inflammatory and Anti-oxidant Properties of *Curcuma longa* (Turmeric) Versus *Zingiber officinale* (Ginger) Rhizomes in Rat Adjuvant-Induced Arthritis. *Inflammation* 1: Epub ahead of print, 2010.
- Ramaswamy, M., Deng, M., Siegel, R.M.. Harnessing programmed cell death as a therapeutic strategy in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* Epub ahead of print, 2011.
- Rates, S.M.K.. Plants as source of drugs. *Toxicon.* 39: 603-613, 2001.
- Ravindran, V., Rachapalli, S., Choy, E.H.. Safety of medium- to long-term glucocorticoid therapy in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)* 48: 807-811, 2009.
- Raza, K., Falciani, F., Curnow, S.J., Ross, E.J., Lee, C.Y., Akbar, A.N., Lord, J.M., Gordon, C., Buckley, C.D., Salmon, M.. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Res. Ther.* 7: 784- 795, 2005.
- Raza, K., Breese, M., Nightingale, P., Kumar, K., Potter, T., Carruthers, D.M., Situnayake, D., Gordon, C., Buckley, C.D., Salmon, M., Kitas, G.D.. Predictive value of antibodies to cyclic citrullinated peptide in patients with very early inflammatory arthritis. *J. Rheumatol.* 32: 231-238, 2005.
- Raza, K., Scheel-Toellner, D., Lee, C.Y., Pilling, D., Curnow, S.J., Falciani, F., Trevino, V., Kumar, K., Assi, L.K., Lord, J.M., Gordon, C., Buckley, C.D., Salmon, M.. Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 8: R120, 2006.
- Roberts, J.E., Tyler, V.E.. *Tyler's Herbs of Choice. The Therapeutic Use of Phytochemicals.* The Haworth Press, Inc., New York, 1998.
- Rollinger, J.M., Langer, T., Stuppner, H.. Strategies for efficient lead structure discovery from natural products. *Curr. Med. Chem.* 13: 1491-1507, 2006.



- Rosloniec, E.F., Brand, D.D., Myers, L.K., Whittington, K.B., Gumanovskaya, M., Zaller, D.M., Woods, A., Altmann, D.M., Stuart, J.M., Kang, A.H.. An HLA-DR1 transgene confers susceptibility to collagen-induced arthritis elicited with human type II collagen. *J. Exp. Med.* 185: 1113-1122, 1997.
- Rossi, D., Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 217-242, 2000.
- Ríos, J.L.. Effects of triterpenes on the immune system. *J. Ethnopharmacol.* 128: 1-14, 2010.
- Sabino, K.C.C. Estudo do efeito do óleo de semente de sucupira (*Pterodon pubescens*) na proliferação de células mononucleares de sangue periférico humano. Tese (Mestrado em Ciências) - UERJ, 1995.
- Sabino, K.C.C., Castro, F.A., Oliveira, J.C.R., Dalmau, S.R.A., Coelho, M.G.P. Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice with hydroalcohol extract of seeds of *Pterodon pubescens*. *Phytother. Res.*, 13: 613-615, 1999(a).
- Sabino, K.C.C., Gayer, C.R.M., Vaz, L.C.A., Santos, L.R.L., Felzeszwab, I., Coelho, M.G.P. *In vitro* and *in vivo* toxicological studies of the *Pterodon pubescens* seed oil. *Toxicol. Lett.* 108: 27-35, 1999(b).
- Salliot, C., van der Heijde, D.. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. *Ann. Rheum. Dis.* 68: 1100-1104, 2009.
- Savill, J., Fadok, V.. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407: 784-88, 2000.
- Scapini, P., Carletto, A., Nardelli, B., Calzetti, F., Roschke, V., Merigo, F., Tamassia, N., Pieropan, S., Biasi, D., Sbarbati, A., Sozzani, S., Bambara, L., Cassatella, M.A.. Proinflammatory mediators elicit secretion of the intracellular B- lymphocyte stimulator pool (BLyS) that is stored in activated neutrophils: implications for inflammatory diseases. *Blood* 105: 830-837, 2005.
- Schmidt, S., Friedl, P.. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell Tissue Res.* 339: 83-92, 2010.
- Schulz, V., Hänsel, R., Tyler, V.E.. Rational Phytotherapy. A Physicians' Guide to Herbal Medicine. 3<sup>rd</sup> ed. Springer-Verlag, Berlin, 1996.
- Scott, D.L., Wolfe, F., Huizinga, T.W.J.. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 376: 1094-1108, 2010.
- Scivo, R., Di Franco, M., Spadaro, A., Valesini, G.. The immunology of rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 1108: 312-322, 2007.
- Seldin, M.F., Amos, C.I., Ward, R., Gregersen, P.K.. The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 42: 1071-1079, 1999.
- Segal, B.H., Leto, T.L., Gallin, J.I., Malech, H.L., and Holland, S.M.. Genetic, biochemical and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine*, 79: 170-200, 2000.
- Selmi, C., Mayo, M.J., Bach, N., Ishibashi, H., Invernizzi, P., Gish, R.G., Gordon, S.C., Wright, H.I., Zweiban, B., Podda, M., Gershwin, M.E.. Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment. *Gastroenterology* 127: 485-492, 2004.
- Selmi, C., Gershwin, M.E.. The role of environmental factors in primary biliary cirrhosis. *Trends. Immunol.* 30: 415-420, 2009.

- Serhan, C.N., Chiang, N., Van Dyke, T.E.. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 349-612, 2008.
- Shen, Y., Lu, J.-D.. Treatment of adjuvant arthritis in rats with Chinese herbal fumigation: efficacy and mechanism. *J. Chin. Integrat. Med.* 7: 157-162, 2009.
- Sherwood, E.R, Toliver-Kinsky, T.. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 18: 385-405, 2004.
- Silva, M.C., Gayer, C.R., Lopes, C.S., Calixto, N.O., Reis, P.A., Passaes, C.P., Paes, M.C., Dalmau, S.R., Sabino, K.C., Todeschini, A.R., Coelho, M.G. Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. *J. Pharm. Pharmacol.* 56: 135-141, 2004.
- Sidiropoulos, P.I., Goulielmos, G., Voloudakis, G.K., Petraki, E., Boumpas, D.T.. Inflammasomes and rheumatic diseases: evolving concepts. *Ann. Rheum. Dis.* 67: 1382-1389, 2008.
- Sixt, M., Engelhardt, B., Pausch, F., Hallmann, R., Wendler, O., Sorokin, L.M.. Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Cell Biol.* 153: 933-946, 2001.
- Smith, W.L., Dewitt, D.L., Garavito, R.M.. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology, *Annu. Rev. Biochem.* 69: 145-182, 2000.
- Splettstoesser, W.D., Schuff-Werner, P.. Oxidative stress in phagocytes—"the enemy within". *Microsc. Res. and Tech.* 57: 441-455, 2002.
- Spindola, H.M., Servat, L., Denny, C., Rodrigues, R.A.F., Eberlin, M.N., Cabral, E., Sousa, I.M.O., Tamashiro, J.Y., Carvalho, J.E. Foglio, M.A.. Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxyvouacapane-17 $\beta$ -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth. *BMC Pharmacol.* 10: 1, 2010.
- Springer, T.A.. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425-434, 1990.
- Stefanidakis, M., Ruohtula, T., Borregaard, N., Gahmberg, C.G., Koivunen, E.. Identification of a negatively charged peptide motif within the catalytic domain of progelatinases that mediates binding to leukocyte beta 2 integrins. *J. Biol. Chem.* 278: 34674-34684, 2003.
- Strasser, A., Jost, P. J. & Nagata, S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30: 180–192, 2009.
- Sun, Y., Cai, T.T., Zhou, X.B., Xu, Q.. Saikosaponin a inhibits the proliferation and activation of T cells through cell cycle arrest and induction of apoptosis. *Int. Immunopharmacol.* 9: 978-983, 2009.
- Sun, H.B.. Mechanical loading, cartilage degradation, and arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1211: 37-50, 2010.
- Suzuki, M., Uetsuka, K., Suzuki, M., Shinozuka, J., Nakayama, H., Doi, K.. Immunohistochemical study on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. *Exp. Anim.* 46: 259-267, 1997.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17: 1-14, 2005.
- Taneja, V., David, C.S.. Role of HLA class II genes in susceptibility/resistance to inflammatory arthritis: studies with humanized mice. *Immunol. Rev.* 233: 62-78, 2010.

- Taylor, P.C., Sivakumar, B.. Hypoxia and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 17: 293-298, 2005.
- Thompson, C.B.. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462, 1995.
- Torrenegra, R., Bauerei, P., Achenbach, H.. Homoormosanine-type alkaloids from *Bowdichia virgiloides*. *Phytochem.* 28: 2219-2221, 1989.
- Toussirot, E., Streit, G., Wendling, D.. The contribution of adipose tissue and adipokines to inflammation in joint diseases. *Curr. Med. Chem.* 14: 1095-1100, 2007.
- Townsend, M.J., Monroe, J.G., Chan, A.C.. B-cell targeted therapies in human autoimmune diseases: an updated perspective. *Immunol. Rev.* 237: 264-283, 2010.
- Trentham, D.E., Townes, A.S., Kang, A.H.. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J. Exp. Med.* 146: 857-868, 1977.
- Ueno, A., Oh-ishi, S.. Roles for the kallikrein-kinin system in inflammatory exudation and pain: lessons from studies on kininogen-deficient rats. *J. Pharmacol. Sci.* 93: 1-20, 2003.
- Vallance P., Chan N.. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart Brit. Card. Soc.* 85: 342-350, 2001.
- van der Woude, D., Houwing-Duistermaat, J.J., Toes, R.E., Huizinga, T.W., Thomson, W., Worthington, J., van der Helm-van Mil, A.H., de Vries, R.R.. Quantitative heritability of anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 60: 916-923, 2009.
- Van Gaalen, F.A., Linn-Rasker, S.P., van Venrooij, W.J., de Jong, B.A., Breedveld, F.C., Verweij, C.L., Toes, R.E., Huizinga, T.W.. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predicts progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis. *Arthritis Rheum.* 50: 709, 2004.
- Vaux, D.L., Strasser, A.. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2239-2244, 1996.
- Venkatesha, S.H., Rajaiah, R., Berma, B.M., Moudgil, K.D. Immunomodulation of autoimmune arthritis by herbal CAM. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* ID986797, 2011.
- Verreck, F.A., de Boer, T., Langenberg, D.M., Hoeve, M.A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., de Waal-Malefyt, R., Ottenhoff, T.H.. Human IL-23-producing type-1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 4560-4565, 2004.
- Vieira, C.R., Marques, M.F., Soares, P.R., Matuda, L., de Oliveira, C.M.A., Kato, L., da Silva, C.C., Guillo, L.A.. Antiproliferative activity of *Pterodon pubescens* Benth. seed oil and its active principle on human melanoma cells. *Phytomedicine* 15: 528-532, 2008.
- Viegas Jr., C., Bolzani, V.S.. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova* 29: 326-337, 2006.
- Vignali, D.A.A., Collison, L. W. & Workman, C.J.. How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology* 8: 523-532, 2008.
- Viola, A., Luster, A.D.. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48: 171-179, 2008.
- Vuorela, P.. Natural products in the process of finding new drug candidates. *Curr. Med. Chem.* 11: 1375-389, 2004.

Walzog, B., Schuppan, D., Heimpel, C., Hafezi-Moghadam, A., Gaehtgens, P., Ley, K.. The leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) contributes to binding of human granulocytes to collagen. *Exp. Cell Res.* 218: 28-38, 1995.

Wagner, H., Bladt, S.. *Plant Drug Analysis*. Springer, Berlin, pp. 195-197, 1996.

Wang, S., Dangerfield, J.P., Young, R.E., Nourshargh, S.. PECAM-1,  $\alpha 6$  integrins and neutrophil elastase cooperate in mediating neutrophil transmigration. *J. Cell Sci.* 118: 2067-2076, 2005.

Wang, Y., Jia, L., Wu, C.-Y.. Triptolide inhibits the differentiation of Th17 cells and suppresses collagen-induced arthritis. *Scand. J. Immunol.* 68: 383-390, 2008.

Weissmann, G. The pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases* 64, 2006.

Wang, S., Voisin, M.B., Larbi, K.Y., Dangerfield, J., Scheiermann, C., Tran, M., Maxwell, P.H., Sorokin, L., Nourshargh, S.. Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *J. Exp. Med.* 203: 1519-1532, 2006.

Wehrens, E.J., van Wijk, F., Roord, S.T., Albani, S., Prakken, B.J.. Treating arthritis by immunomodulation: is there a role for regulatory T cells? *Rheumatol.* 49: 1632-1644, 2010.

Weyand, C.M.. New insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatol.* 39: 3-8, 2000.

WHO – World Health Organization: <http://www.who.int/en/1998>.

WHO – World Health Organization. *Traditional and Alternative Medicine, Fact Sheet # 271*. World Health Organization, Geneva, 2002. von Andrian, U.H., Mackay, C.R.. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N. Engl. J. Med.* 343: 1020-1034, 2000.

Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L.. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* 2000, 80: 617-653.

Wooley, P.H.. Immunotherapy in collagen-induced arthritis: past, present and future. *Am. J. Med Sci.* 327: 217-226, 2004.

Wooley, P.H., Luthra, H.S., Stuart, J.M., David, C.S. Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I Region) linkage and antibody correlates. *J. Exp. Med.* 154: 688-700, 1981.

Wright SD. Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity. *J. Exp. Med.* 189: 605-609, 1999.

Wright, S.D., Weitz, J.I., Huang, A.J., Levin, S.M., Silverstein, S.C., Loike, J.D.. Complement receptor type 3 (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 7734-7738, 1988.

Wright, H.L., Moots, R.J., Bucknall, R.C., Edwards, S.W.. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology* 49: 1618-1631, 2010.

Xiao, Z.P., Peng, Z.Y., Peng, M.J., Yan, W.B., Ouyang, Y.Z., Zhu, H.L.. Flavonoids Health Benefits and Their Molecular Mechanism. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2011. [Epub ahead of print]

Xie, J., Li, R., Kotovuori, P., Vermot-Desroches, C., Wijdenes, J., Arnaout, M.A., Nortamo, P., Gahmberg, C.G.. Intercellular adhesion molecule 2 (CD102) binds to the leukocyte integrin CD11b/CD18 through the A domain. *J. Immunol.* 155: 3619-3628, 1995.

Yost, C.C., Weyrich, A.S., Zimmerman, G.A.. The platelet activating factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses. *Biochimie.* 92: 692-697. Epub 2010 Feb 16, 2010.

Yunes, R.A., Calisto, J.B.. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. *Argos* 1<sup>Ed</sup>, 19-46, 2001.

Zhang, Y., Liu, J., Jia, W., Zhao, A., Li, T.. Distinct immunosuppressive effect by *Isodon serra* extracts. *Int. Immunopharmacol.* 5: 1957-1965, 2005.

Zeng, X., Ai, M., Tian, X., Gan, X., Shi, Y., Song, Q., and Tang, F.. Diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 30:1451, 2003.

Zipfel, P.F.. Complement and immune defense: from innate immunity to human diseases. *Immunol. Lett.* 126: 1-7, 2009.