

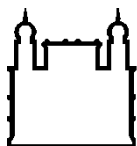
**MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Mestrado em Biologia Celular e Molecular**

**ESTUDO DO GALATO DE METILA NA ARTRITE EXPERIMENTAL:  
AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E MECANISMO DE AÇÃO**

**LUANA BARBOSA CORREA**

**Rio de Janeiro  
Agosto/2015**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**LUANA BARBOSA CORREA**

**ESTUDO DO GALATO DE METILA NA ARTRITE EXPERIMENTAL:  
AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E MECANISMO DE AÇÃO**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

**Orientadora:** Dra. Maria das Graças Müller de Oliveira Henriques

**RIO DE JANEIRO**  
2015

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

C824 Correa, Luana Barbosa

Estudo do galato de metila na artrite experimental: avaliação do efeito anti-inflamatório e mecanismo de ação / Luana Barbosa Correa. – Rio de Janeiro, 2015.

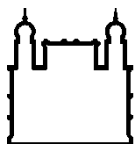
xvii,103 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.

Bibliografia: f. 65-80

1. Galato de metila. 2. Inflamação. 3. Artrite. 4. Zimosan. 5. Neutrófilos. I. Título.

CDD 616.722



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**AUTOR: LUANA BARBOSA CORREA**

**ESTUDO DO GALATO DE METILA NA ARTRITE EXPERIMENTAL:  
AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E MECANISMO DE AÇÃO**

**ORIENTADORA:** Dra. Maria das Graças Müller de Oliveira Henriques

**Aprovada em: 18/08/2015**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Clarissa M. Maya-Monteiro (IOC) - Presidente**

**Prof. Dr. Rafael Mariante Meyer (IOC) - Membro**

**Prof. Dr. Heitor Affonso de Paula Neto (UFRJ) - Membro**

**Prof. Dr. Leonardo Noboru Seito (Farmanguinhos) - Revisor e suplente**

**Prof. Dr. Fernando de Paiva Conte (Biomanguinhos) - Suplente**

Rio de Janeiro, 18 de Agosto de 2015

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre foram um exemplo de caráter e inspiração.

## AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras Dras. Maria das Graças Henriques e Elaine Cruz Rosas, obrigada pela confiança e pela dedicação. Sou muito grata por tudo e devo meu crescimento acadêmico a vocês.

À MSc. Tatiana Almeida Pádua do Laboratório de Farmacologia Aplicada pela ajuda com os experimentos e por me ensinar tantas coisas.

Ao Dr. Leonardo Noboru Seito do Laboratório de Farmacologia Aplicada pela ajuda com os experimentos de *western blot* e por toda a gentileza que teve comigo e dedicação aos meus experimentos.

Ao MSc. Thadeu Costa do Laboratório de Farmacologia Aplicada pelo importante auxílio nos experimentos. Muito obrigada pela paciência e carinho.

Ao Dr. André Candéa do Laboratório de Farmacologia Aplicada pelo auxílio nos experimentos com os neutrófilos.

À Erika Cunha do Laboratório de Farmacologia Aplicada pela realização do processamento do material de histologia e pelo auxílio com muitas outras coisas relacionadas ao laboratório.

À Dra. Helene Barbosa do Laboratório de Biologia Estrutural por me receber em seu laboratório para realização do experimento de imunofluorescência e pela dedicação na obtenção das fotos do experimento. Agradeço também à Sandra Oliveira que auxiliou diretamente na realização da imunofluorescência.

À MSc. Catarina Negreiros e ao MSc. Magaiver Andrade do laboratório de Farmacologia Aplicada, por compartilharem comigo todos os momentos dessa jornada.

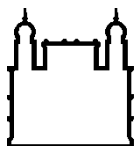
Às Dras. Carmen Penido, Simone Machado e Mariana Souza do Laboratório de Farmacologia Aplicada pelas contribuições e ensinamentos.

A toda equipe do Laboratório de Farmacologia Aplicada que também fizeram parte desse trabalho: Fátima Vergara, Maria Fernanda, Perla Vilani, Katelim Hottz, Natália Torres, Mônica Carvalho, Márcia Rami, e toda equipe do biotério, André Sales, André e Suellen. Muito obrigada, cada um de vocês contribuiu de alguma forma para o meu crescimento acadêmico.

À minha maravilhosa e amada família que me proporcionou condições para que eu alcançasse meus objetivos, apoiando e incentivando meu trabalho. Em especial, minha mãe, meu pai e minha irmã quem eu devo tudo que eu sou hoje. Obrigada!

Ao Pedro Henrique Diniz, simplesmente por tudo. Obrigada pelo carinho, companhia, força, e paciência de sempre.

Ao auxílio financeiro fornecido pelo CNPq, FAPERJ, CAPES e FIOCRUZ.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**ESTUDO DO GALATO DE METILA NA ARTRITE EXPERIMENTAL:  
AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E MECANISMO DE AÇÃO**

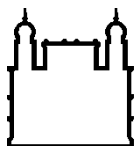
### **RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**Luana Barbosa Correa**

O galato de metila (GM) é um derivado de ácidos fenólicos encontrado em várias espécies de plantas, que apresenta efeitos biológicos dos quais se destacam sua ação antioxidante, antitumoral e antimicrobiana. Evidências indiretas sugerem um possível efeito anti-inflamatório do GM, dentre eles a redução da produção de interleucina (IL)-6 e óxido nítrico (NO) ao inibir a fosforilação de ERK1/2 em macrófagos estimuladas por LPS. No entanto, não há relatos na literatura demonstrando o efeito anti-inflamatório do GM em modelos *in vivo*. A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, inflamatória e sistêmica no qual fatores genéticos e ambientais contribuem para o seu desenvolvimento. A inflamação e o dano articular são mediados pelo influxo de leucócitos para o espaço sinovial, como neutrófilos e macrófagos. Essas células são responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios tais como citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos que contribuem para a formação de um tecido invasivo denominado de *pannus*. Diferentes modelos experimentais são utilizados para o estudo da fisiopatologia da AR, incluindo a artrite induzida por zimosan que apresenta similaridades com a doença humana. Nas últimas décadas, a AR tem sido tratada com anti-inflamatórios não esteroidais, glicocorticoides e os fármacos antirreumáticos modificadores da doença. Recentemente, agentes biológicos (anticorpos ou receptores solúveis) foram incorporados a terapia. Apesar da eficácia clínica desses medicamentos, muitos pacientes não têm uma resposta significativa ou interrompem o tratamento devido a efeitos adversos. Além disso, a disponibilidade limitada de produtos biológicos eficazes em países em desenvolvimento, a necessidade de administração parentérica, e o custo relativamente elevado destes produtos, restringem o acesso a essas terapias em muitos pacientes com AR e isso promove uma busca contínua para a identificação de novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de novos medicamentos. Produtos derivados de plantas com ação anti-inflamatória têm um potencial na luta contra a artrite. Estes incluem os flavonóides, terpenos, quinonas, catequinas, alcaloides e derivados de ácidos fenólicos. No presente trabalho, demonstramos que o GM possui efeito anti-inflamatório nos modelos de edema de pata, pleurisia e artrite induzidos por zimosan. O GM foi capaz de inibir diferentes parâmetros da artrite experimental tais como: a formação de edema articular, a migração de leucócitos para a articulação inflamada e a produção de mediadores inflamatórios tanto proteicos quanto lipídicos em dois períodos do processo inflamatório, 6 e 24 horas. Além disso, o GM foi capaz de inibir diretamente a migração e adesão dos neutrófilos e também alterou a polimerização de filamentos de actina necessários para mobilização celular. Por fim, o GM foi capaz de inibir a ativação de macrófagos induzida por zimosan e IFN- $\gamma$  através da redução da produção da citocina IL-6, NO, expressão das enzimas COX-2 e iNOS, além de diminuir o influxo de cálcio dos compartimentos intracelulares para o citosol da célula. Tomados em conjunto, os resultados demonstraram um efeito anti-inflamatório do GM em modelos de inflamação induzido pelo zimosan, principalmente na artrite experimental inibindo o acúmulo de neutrófilos e a ativação de macrófagos.





Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**METHYL GALLATE STUDY IN EXPERIMENTAL ARTHRITIS:**

**EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY EFFECT AND ACTION MECHANISM**

**ABSTRACT**

**MASTER DISSERTATION IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY**

**Luana Barbosa Correa**

Methyl Gallate (MG) is a phenolic acids derivative found in several plant species, which has biological effects with the following highlights antioxidant, antimicrobial and antitumor actions. Indirect evidences suggest a possible anti-inflammatory effect of MG, among them the reduction in the interleukin (IL)-6 and nitric oxide (NO) production by inhibiting the ERK1/2 phosphorylation in LPS-stimulated macrophages. However, there are no reports in the literature demonstrating the anti-inflammatory effect of MG in *in vivo* models. Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune, inflammatory and systemic disease, wherein genetic and environmental factors contribute to their development. Inflammation and joint damage are mediated by the leukocytes influx into the synovial space, such as neutrophils and macrophages. These cells are responsible for inflammatory mediators production such as cytokines, chemokines, and lipid mediators that contribute to the formation of an invasive tissue called pannus. Different experimental models are used to study the RA pathophysiology, including zymosan-induced arthritis which presents similarities to the human disease. In recent decades, RA has been treated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs, glucocorticoids and the disease-modifying antirheumatic drugs. Recently, biological agents (antibodies or soluble receptors) were added to the therapy. Despite the clinical efficacy of these drugs, many patients do not have a significant response or interrupt the treatment due to adverse effects. In addition, the limited availability of effective biological products in developing countries, the need of parenteral administration, and the relatively high cost of these products, restrict access to these therapies in many patients with RA and that promotes a continuous search for identification of new therapeutic targets and development of new medicines. Products derived from plants with anti-inflammatory action have a potential in combating arthritis. These include flavonoids, terpenes, quinones, catechins, alkaloids and derivatives of phenolic acids. In this study, we demonstrate that MG has anti-inflammatory effects on paw edema, pleurisy and arthritis models induced by zymosan. MG was able to inhibit different parameters of the experimental arthritis such as edema formation, leukocyte migration into the inflamed joint, and inflammatory mediators production protein and lipid mediators in two periods of the inflammatory process, 6 and 24 hours. Moreover, the MG was able to directly inhibit the neutrophil migration and adhesion and has also changed the actin filaments polymerization required for cell mobilization. Finally, the MG was able to inhibit macrophage activation induced by zymosan and IFN- $\gamma$  by reducing the cytokine IL-6 and NO production, COX-2 and iNOS expression, in addition to reduce the calcium influx of intracellular compartments into the cytosol of the cell. Taken together, the results demonstrated an anti-inflammatory effect of MG in zymosan-induced inflammation models, especially in the experimental arthritis by inhibiting the neutrophils accumulation and macrophage activation.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 INFLAMAÇÃO .....	1
1.2 INFLAMAÇÃO ARTICULAR .....	1
1.3 O PAPEL DOS MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS NA INICIAÇÃO E PROPAGAÇÃO DA ARTRITE REUMATOIDE.....	4
1.4 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA ARTRITE REUMATOIDE .....	6
1.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO ARTICULAR.....	9
1.5.1 MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR ZIMOSAN .....	10
1.6 INTERVENÇÃO MEDICAMENTOSA NA ARTRITE REUMATOIDE.....	12
1.7 GALATO DE METILA .....	15
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
2.1 OBJETIVO GERAL: .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	18
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
3.1 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> .....	19
3.1.1 ANIMAIS .....	19

3.1.2	REAGENTES .....	19
3.1.3	TRATAMENTOS .....	20
3.1.4	EDEMA DE PATA .....	20
3.1.5	PLEURISIA INDUZIDA POR ZIMOSAN .....	21
3.1.6	INDUÇÃO DA ARTRITE POR ZIMOSAN .....	21
3.1.7	CONTAGEM DOS LEUCÓCITOS .....	22
3.1.8	HISTOLOGIA .....	22
3.1.9	QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES PROTEICOS POR ELISA .....	23
3.1.10	QUANTIFICAÇÃO DE LTB <sub>4</sub> E PGE <sub>2</sub> .....	23
3.2	EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> .....	23
3.2.1	ISOLAMENTO DE POLIMORFONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS 23	
3.2.2	ANÁLISE DA VIABILIDADE DE NEUTRÓFILOS <i>IN VITRO</i> .....	24
3.2.3	ENSAIO DE QUIMIOTAXIA .....	24
3.2.4	ENSAIO DE ADESÃO CELULAR .....	25
3.2.5	MONTAGEM DE F-ACTINA (POLIMERIZAÇÃO DE ACTINA) .....	25
3.2.6	CULTIVO DE MACRÓFAGOS J774A.1 .....	26
3.2.7	ANÁLISE DA VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS J774A.1 <i>IN VITRO</i> .....	26
3.2.8	ATIVAÇÃO DOS MACRÓFAGOS E PRODUÇÃO DE IL-6 .....	26

3.2.9	DOSAGEM DE NITRITO PELO MÉTODO DE GRIESS.....	27
3.2.10	PREPARO DOS EXTRATOS CELULARES E <i>WESTERN BLOT</i> .....	27
3.2.11	MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE CÁLCIO INTRACELULAR.....	28
3.2.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
4.1	CURVA DOSE-RESPOSTA DO GALATO DE METILA NOS MODELOS DE EDEMA DE PATA E PLEURISIA INDUZIDOS POR ZIMOSAN.....	29
4.2	AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO ARTICULAR INDUZIDA POR ZIMOSAN EM DIFERENTES TEMPOS.....	32
4.3	EFEITO DO GALATO DE METILA NA FORMAÇÃO DE EDEMA E ACÚMULO CELULAR NA ARTRITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ZIMOSAN EM CAMUNDONGOS.....	34
4.4	EFEITO DO GALATO DE METILA NOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS PRESENTES NA ARTRITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ZIMOSAN.....	40
4.5	EFEITO DO GALATO DE METILA EM NEUTRÓFILOS MURINOS <i>IN VITRO</i> .....	43
4.6	EFEITO DO GALATO DE METILA EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM ZIMOSAN.....	48
<b>5</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>referências.....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>APÊNDICE A –.....</b>	<b>81</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. 1: Estrutura da articulação sinovial de um paciente saudável e um paciente com artrite reumatoide .....</b>	<b>2</b>
<b>Figura 1. 2: Modelo de reconhecimento de partículas de zimosan por uma célula do sistema imune inato. ....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 1. 3: Estrutura química da substância galato de metila. ....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 4. 1: Efeito do pré-tratamento com o GM sobre a formação de edema de pata. .</b>	<b>30</b>
<b>Figura 4. 2: Efeito do pré-tratamento com o GM na pleurisia.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 4. 3: Estudo da inflamação articular induzida por zimosan. ....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 4. 4: Efeito do pré-tratamento com o GM na formação de edema articular. ....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 4. 5: Efeito do pré-tratamento com o GM sobre a migração celular na artrite experimental.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 4. 6: Histopatologia representativa do efeito do GM sobre a inflamação articular induzida por zimosan 6 horas após o estímulo. ....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 4. 7: Histopatologia representativa do efeito do GM sobre a inflamação articular induzida por zimosan 24 horas após o estímulo. ....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 4. 8: Efeito do pré-tratamento com o GM sobre a produção de mediadores inflamatórios na artrite experimental.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 4. 9: Efeito do pré-tratamento com o GM sobre a produção de mediadores lipídicos na artrite experimental .....</b>	<b>42</b>

<b>Figura 4. 10: Efeito do GM na quimiotaxia de neutrófilos murinos.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 4. 11: Efeito do GM na adesão de neutrófilos murinos.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 4. 12: Efeito do GM na polarização dos filamentos de actina nos neutrófilos.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 4. 13: Efeito do GM na produção de IL-6 em macrófagos murinos J774A.1.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 4. 14: Efeito do GM na expressão da enzima COX-2 em macrófagos murinos J774A.1.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 4. 15: Efeito do GM na produção de NO e na expressão de iNOS em macrófagos murinos J774A.1.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 4. 16: Efeito do GM na liberação intracelular de cálcio em macrófagos murinos J774A.1.....</b>	<b>54</b>

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 4. 1: Efeito do GM na viabilidade de neutrófilos murinos .....43**

**Tabela 4. 2: Efeito do GM na viabilidade de macrófagos murinos.....48**

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AIE:</b>	Anti-inflamatório esteroidal
<b>AINE:</b>	Anti-inflamatório não esteroidal
<b>AP-1:</b>	Proteína ativadora-1
<b>AR:</b>	Artrite reumatoide
<b>BSA:</b>	Albumina sérica bovina
<b>Ca<sup>+2</sup>:</b>	Cálcio
<b>CAM:</b>	Molécula de adesão celular
<b>CCL:</b>	Ligante de quimiocinas CC
<b>CD:</b>	do inglês, <i>cluster of differentiation</i>
<b>CO<sub>2</sub>:</b>	Dióxido de carbono
<b>COX:</b>	Ciclo-oxigenase
<b>CXCL:</b>	Ligante de quimiocinas CXC
<b>d.C.:</b>	Depois de Cristo
<b>Dexa:</b>	Dexametasona
<b>DMARD:</b>	do inglês, <i>disease-modifying anti-rheumatic drug</i>
<b>DNA:</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EBV:</b>	Vírus <i>Eptein-Barr</i>
<b>EDTA:</b>	Ácido etileno diamino tetra acético
<b>EIA:</b>	do inglês: <i>Enzyme Immunoassay</i>
<b>ELISA:</b>	do inglês, <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<b>EPM:</b>	Erro padrão da média
<b>ERK:</b>	Quinase regulada por sinal extracelular
<b>F-actina:</b>	Filamentos de actina
<b>FR:</b>	Fator reumatoide
<b>G:</b>	Gauss
<b>g:</b>	Gravidade
<b>GM:</b>	Galato de metila
<b>GM-CSF:</b>	do inglês, <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>GPCR:</b>	Receptor acoplado à proteína G
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HBSS:</b>	Solução salina tamponada de Hank's
<b>HCl:</b>	Ácido clorídrico



<b>HLA:</b>	Antígeno leucocitário humano
<b>i.pl.:</b>	Intraplantar
<b>i.a.:</b>	Intra-articular
<b>i.p.:</b>	Intraperitoneal
<b>IA:</b>	Índice de adesão
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b>	Interferon- $\gamma$
<b>Ig:</b>	Imunoglobulina
<b>IL:</b>	Interleucina
<b>iNOS:</b>	Óxido nítrico sintase induzida
<b>JAM:</b>	Molécula de adesão juncional
<b>LFA-1:</b>	do inglês, <i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
<b>LT:</b>	Leucotrieno
<b>MAC-1:</b>	do inglês, <i>macrophage-1 antigen</i>
<b>MCP-1:</b>	do inglês, <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
<b>MHC:</b>	do inglês, <i>major histocompatibility complex</i>
<b>MIP-1<math>\alpha</math>:</b>	do inglês, <i>macrophage inflammatory protein-1<math>\alpha</math></i>
<b>mm:</b>	Milímetros
<b>MMP:</b>	Metaloproteinase de matriz
<b>NADPH-oxidase:</b>	do inglês, <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B:</b>	Fator nuclear- $\kappa$ B
<b>ng:</b>	Nanogramas
<b>nM:</b>	Nanomolar
<b>NO:</b>	Óxido nítrico
<b>OA:</b>	Osteoartrite
<b>PBS:</b>	Solução salina tamponada
<b>pg:</b>	Picogramas
<b>PG:</b>	Prostaglandina
<b>PI3K:</b>	do inglês, <i>phosphatidylinositol-3kinase</i>
<b>PLA:</b>	do inglês, <i>phospholipase A</i>
<b>PLC:</b>	do inglês, <i>phospholipase C</i>
<b>PMN:</b>	Polimorfonuclear
<b>ROS:</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>TLR:</b>	Receptor do tipo <i>Toll</i>
<b>TNFR:</b>	Receptor de TNF

<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
<b>ZAP-70:</b>	do inglês, <i>zeta-associated protein 70</i>
<b><math>\mu\text{g}</math>:</b>	Micrograma
<b><math>\mu\text{L}</math>:</b>	Microlitro
<b><math>\mu\text{m}</math>:</b>	Micrômetro
<b><math>\mu\text{M}</math>:</b>	Micromolar

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 INFLAMAÇÃO

A reação inflamatória é um fenômeno estereotipado, que ocorre em tecidos vascularizados em resposta a diferentes estímulos físicos, químicos ou infecciosos. (Rajakariar, Yaqoob e Gilroy, 2006). Referências à resposta inflamatória podem ser encontradas em textos médicos antigos da época medieval, mas a primeira definição dos sinais estereotipados foi feita pelo médico romano Cornelius Celsus, no século I d.C. Estes sintomas ficaram conhecidos como os quatro sinais cardinais da inflamação: rubor, calor, inchaço e dor (Medzhitov, 2010). O quinto sinal cardinal, perda da função, foi adicionado por Rudolph Virchow em 1858 (Majno e Joris, 2004).

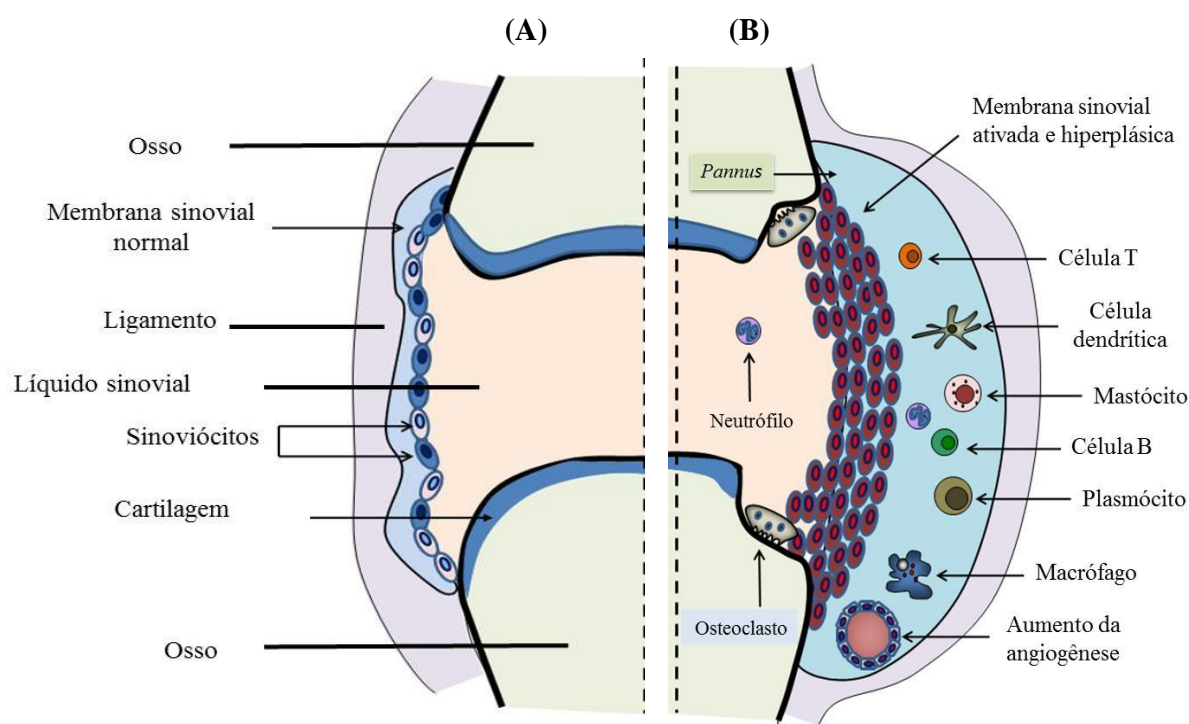
A inflamação aguda é a primeira resposta do organismo na tentativa de restringir o dano tecidual ou o sítio de infecção e em geral, exibe um rápido desenvolvimento e uma curta duração. No entanto, em algumas doenças, a ativação persistente do sistema imune, pode induzir uma inflamação crônica resultando em consequências patológicas (Nathan e Ding, 2010). Além disso, a compreensão sobre componentes inflamatórios em diversas doenças crônicas, tais como diabetes do tipo II, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, autoimunes (como artrite reumatoide) e o câncer foram marcantes nas últimas décadas (Lawrence e Gilroy, 2007).

## 1.2 INFLAMAÇÃO ARTICULAR

A artrite é um processo inflamatório articular que pode ser decorrente de diferentes etiologias tais como injúria mecânica, deposição de cristais (osteoartrite) ou processos autoimunes. Algumas características inflamatórias da artrite estão relacionadas à estrutura anatômica das articulações (Cassim *et al.*, 2009).

A articulação é constituída por duas superfícies ósseas recobertas pela cartilagem articular, ligamentos e membrana sinovial que formam a cápsula articular, a qual delimita a

cavidade preenchida pelo líquido sinovial (Espanha, 2010). A membrana sinovial é constituída por sinoviócitos do tipo A (macrófagos sinoviais) e do tipo B (fibroblastos sinoviais), além de vasos sanguíneos e nervos sensoriais. Os sinoviócitos são as células responsáveis pela produção do líquido sinovial que promove a lubrificação da articulação reduzindo o atrito e facilitando o movimento (Kosinska *et al.*, 2015). A cartilagem articular é composta, predominantemente, pela matriz extracelular (colágenos, proteoglicanos e ácido hialurônico) e pelos condrócitos (Nagase e Kashiwagi, 2003). Na **Figura 1. 1 A** pode ser observado a estrutura da articulação sinovial.



**Figura 1. 1: Estrutura da articulação sinovial de um paciente saudável e um paciente com artrite reumatoide.** (A) Na articulação sinovial, as superfícies articulares dos ossos são protegidas por uma cartilagem fibrosa que forma uma bolsa onde se encontra a articulação. A área dentro dessa cápsula articular é chamada de cavidade articular e está repleta de líquido sinovial, que nutre a articulação e permite que as superfícies deslizem entre si. O líquido sinovial em condições fisiológicas é acelular. O revestimento sinovial é composto por dois tipos celulares que morfologicamente, fenotipicamente e funcionalmente podem ser subdivididos em sinoviócitos do tipo A (semelhantes a macrófagos) e do tipo B (semelhantes a fibroblastos). (B) A membrana sinovial de pacientes com AR é ativada e hiperplásica com a proliferação local dos sinoviócitos. Simultaneamente, várias células do sistema imune são recrutadas para a articulação inflamada. A membrana sinovial inflamada invade gradualmente as estruturas articulares como cartilagem e osso com a formação do *pannus* reumatoide. O aumento da celularidade da membrana sinovial requer uma oxigenação adequada que é suportada pela angiogênese. A produção de mediadores inflamatórios e enzimas que degradam a cartilagem e desregula o metabolismo ósseo, o que eventualmente leva à destruição da articulação. Modificado de (Patakas, 2011).

A artrite reumatoide (AR) é um dos distúrbios articulares mais comuns, afetando de 0,5% a 1% da população mundial sendo mais frequente na população adulta. É uma doença autoimune crônica, que acomete principalmente as pequenas articulações, manifestando-se como sinovite (inflamação da membrana sinovial) a qual promove a destruição articular, causando dor e rigidez (Scott, Wolfe e Huizinga, 2010). A taxa de incidência entre mulheres e homens é de aproximadamente 2 a 4 mulheres para cada homem (Gabriel e Michaud, 2009). O motivo para esta diferença entre os sexos é desconhecido, mas pressupõe-se estar relacionado com questões hormonais e funções imunológicas (Khurana e Berney, 2005). O gasto anual com o tratamento da AR é de aproximadamente dezesseis bilhões de dólares, incluindo os custos sócio econômicos diretos, como as despesas médicas, e custos indiretos, como a queda de produtividade e redução da qualidade de vida do paciente (Dunlop *et al.*, 2003).

A etiologia da AR é multifatorial, com componentes imunes, genéticos e ambientais que juntos levam a um distúrbio inicial da imunidade inata e adaptativa com subsequente inflamação crônica (Asquith *et al.*, 2009). Em relação ao aspecto genético tem sido observado uma frequência elevada de pacientes com AR, que expressam o antígeno leucocitário humano DR4 (HLA-DR4). A presença deste antígeno é reconhecida como um fator de predisposição genética para o desenvolvimento da doença (Lee *et al.*, 2008; Raychaudhuri, 2010). Outras pesquisas demonstram que algumas infecções são desencadeadoras da AR, por exemplo, a infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV). O vírus Epstein-Barr e o colágeno tipo II possuem epítomos comuns, e em indivíduos geneticamente susceptíveis, uma reação imunológica dirigida ao EBV pode afetar a cartilagem articular rica em colágeno tipo II (Blaschke *et al.*, 2000; Firestein, 2005).

O início da AR se dá com a ativação de linfócitos T, que por sua vez estimulam sinoviócitos a produzirem mediadores inflamatórios, como a interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6 e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Choy e Panayi, 2001). Estes linfócitos ativam as células B que proliferam e se diferenciam em plasmócitos produzindo anticorpos, tais como o anticorpo contra a porção Fc da IgG conhecido como fator reumatoide (FR). Os anticorpos formam complexos imunes que aumentam a permeabilidade vascular e promovem o acúmulo de células polimorfonucleares (Nielen *et al.*, 2004). Além disso, ocorre uma intensa proliferação das células de revestimento sinovial (sinoviócitos do tipo A e B) e uma angiogênese local (Tarner *et al.*, 2005), que levam à formação de um tecido capaz de invadir estruturas adjacentes como

cartilagem e osso denominado *pannus* reumatoide (Müller-Ladner *et al.*, 2005; Rannou *et al.*, 2006) (**Figura 1.1 B**).

### **1.3 O PAPEL DOS MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS NA INICIAÇÃO E PROPAGAÇÃO DA ARTRITE REUMATOIDE**

A imunidade inata é um mecanismo de defesa chave não só na prevenção da invasão do organismo por microrganismos, mas também na contribuição para a patogênese de doenças autoimunes e inflamatórias (Gierut, Perlman e Pope, 2010). As células efetoras da imunidade inata (tais como, macrófagos e neutrófilos) são encontradas na sinóvia reumatoide, e provas crescentes indicam que elas estão envolvidas diretamente na inflamação das articulações e na destruição da cartilagem articular (Falgarone, Jaen e Boissier, 2005).

Os macrófagos do revestimento sinovial e os do infiltrado celular desempenham um papel crucial no surgimento e na manutenção da artrite (Mulherin, Fitzgerald e Bresnihan, 1996; Hofkens *et al.*, 2013). Alguns relatos científicos corroboram com esta afirmativa, mostrando que a eliminação seletiva dos macrófagos antes da indução ou durante a artrite experimental reduz a inflamação sinovial (van Lent *et al.*, 1998; Van Lent *et al.*, 1998). Além disso, foi observado que em pacientes com AR, a quantidade dos macrófagos no revestimento sinovial está correlacionada com a progressão da doença (Kinne, Stuhlmüller e Burmester, 2007). A participação direta ou indireta dos macrófagos na destruição óssea tem sido relatada. Na AR as células monocíticas podem se diferenciar em osteoclastos maduros (Deng e Lenardo, 2006), que são células responsáveis pela destruição óssea (Boyle, Simonet e Lacey, 2003). Em adição, a diferenciação e ativação dos osteoclastos são reguladas pelo RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B), que é uma molécula da família do TNF principalmente produzida pelos macrófagos (Boyce e Xing, 2007).

Nas articulações os macrófagos podem ser ativados por vários mediadores, dentre eles o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) produzido pelos linfócitos Th1 (Drexler *et al.*, 2008). A ativação dos macrófagos também pode ser resultado do contato célula-célula com as células T adjacentes (McInnes, Leung e Liew, 2000; Burger e Dayer, 2002). Quando estimulados no tecido sinovial os macrófagos produzem níveis elevados de citocinas e quimiocinas, tais como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, o fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), proteína inflamatória de macrófago 1- $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) e proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1) (Kinne *et al.*, 2000; Firestein, 2005). Além disso, observa-se uma deficiência dos mecanismos

de morte celular na AR, (Pope, 2002) que leva ao acúmulo de macrófagos ativados que produzem uma variedade de citocinas e quimiocinas, que contribuem para a cronificação do processo inflamatório e consequente destruição das articulações afetadas (Kinne, Stuhlmüller e Burmester, 2007).

Outra célula que merece destaque na patogênese da AR é o neutrófilo. Os neutrófilos são abundantes no fluido sinovial de pacientes com AR ativa, sendo que uma articulação do joelho típica pode possuir  $2 \times 10^9$  células, das quais 90% são neutrófilos (Cross *et al.*, 2005). Durante muitos anos, foi considerada que a maior contribuição dos neutrófilos para a patologia de doenças inflamatórias, tais como a AR, era a liberação de produtos citotóxicos. De fato, de todas as células envolvidas na patologia da AR, os neutrófilos têm o maior potencial citotóxico, entretanto, atualmente estas células são reconhecidas pelo seu papel ativo na orquestração da inflamação (Firestein, 2005; Mantovani *et al.*, 2011). Esta regulação é caracterizada: pelo aumento da expressão de receptores da membrana plasmática como o MHC de classe II; por interações célula-célula; pela liberação de proteases e pela secreção de uma variedade de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-18, IL-23, TNF) e quimiocinas (CCL2, CCL4, CCL5, CXCL8), que regulam a função de outras células do sistema imunológico (Cascão *et al.*, 2010; Mantovani *et al.*, 2011; Németh e Mócsai, 2012).

O recrutamento dos neutrófilos é um evento chave para a exacerbação do processo inflamatório articular (Cross *et al.*, 2005) cuja dinâmica de migração segue a via clássica da cascata de recrutamento dos leucócitos: captura, rolamento, adesão firme e, finalmente, a transmigração.

A captura dos neutrófilos ocorre após mudanças na superfície do endotélio induzida por mediadores inflamatórios, como TNF- $\alpha$  que levam à expressão E- e P-selectinas que se ligam a L-selectina nos neutrófilos. Na AR a mobilização dos neutrófilos para a cavidade sinovial ocorre através de quimiocinas, fragmento do sistema complemento C5a e leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) (Chen *et al.*, 2006; Chou *et al.*, 2010; Sadik *et al.*, 2012). Ao rolarem pelo endotélio os neutrófilos entram em contato com as quimiocinas CXC que tem um papel importante na ativação dos neutrófilos (Sanz e Kubes, 2012). As CXC incluem CXCL-8 (também conhecida como IL-8 em humanos) e os seus análogos murinos: CXCL-1 (também conhecido como KC), CXCL-2 e CXCL-5 (também conhecido como LIX). Essas quimiocinas ligam-se ao CXCR2 nos neutrófilos e promovem sua adesão ao endotélio (Pruenster *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2011).

A ativação de receptores de quimiocinas induz alterações na conformação de integrinas na superfície dos neutrófilos, que levam ao aumento da afinidade destas moléculas (Kolaczowska e Kubes, 2013). A ligação das integrinas aos seus ligantes no endotélio ativa vias de sinalização nos neutrófilos, estabilizando a adesão e iniciando a motilidade celular (Cicchetti, Allen e Glogauer, 2002; Ley *et al.*, 2007). Este processo regula a polimerização de F-actina (filamentos de actina) que controla a migração de neutrófilos (Stillie *et al.*, 2009; Futosi, Fodor e Mócsai, 2013).

Após migrar para as articulações inflamadas, neutrófilos ativados encontram agregados de imunoglobulinas (por exemplo, o fator reumatoide, FR), tanto no fluido sinovial quanto depositados nas articulações (Wright, Moots e Edwards, 2014). Estes complexos de imunoglobulinas se ligam a receptores Fc $\gamma$  na superfície dos neutrófilos, desencadeando a degranulação ou a produção de ROS no fluido sinovial, ou diretamente sobre a superfície da articulação em um processo denominado de “fagocitose frustrada” (Pillinger e Abramson, 1995). Nos neutrófilos a fagocitose frustrada gera uma rápida produção de ROS (O $_2^-$ , HO,  $^1$ O $_2$ , e H $_2$ O $_2$ ) através da ação da enzima NADPH-oxidase, que induz o estresse oxidativo, o qual está envolvido na patologia da AR (Cedergren *et al.*, 2007). Os radicais de oxigênio causam danos no DNA, oxidação de lipídios, proteínas e lipoproteínas, e podem estar envolvidos em mutações de imunoglobulinas que levam à formação do FR (Hitchon e El-Gabalawy, 2004; Rasheed, 2008). Além disso, as enzimas provenientes da degranulação dos neutrófilos são encontradas em concentrações elevadas no fluido sinovial e podem ser responsáveis por lesões nas articulações, clivagem de pró-citocinas, inibição da proliferação de condrócitos, ativação de receptores solúveis e proliferação dos sinoviócitos (Elsaid, Jay e Chichester, 2003; Katano *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Lefrançais *et al.*, 2012). Os neutrófilos também armazenam grupos específicos de proteases, tais como metaloproteinases de matriz, MMPs (por exemplo, MMP-9), e serinas-proteases (por exemplo, elastase) que são enzimas que degradam moléculas da matriz extracelular (Kolaczowska e Kubes, 2013).

#### **1.4 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA ARTRITE REUMATOIDE**

As inflamações articulares são marcadas por uma geração importante de mediadores inflamatórios que orquestram a comunicação entre as células, resultando na atração e na ativação das mesmas induzindo a liberação de produtos que promovem a destruição dos tecidos (Arend, 2001). Um grande número de citocinas está presente nas articulações de pacientes com



AR, entretanto o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são os principais mediadores envolvidos na patogênese desta doença (Dayer, 2003; Vasanthi, Nalini e Rajasekhar, 2007).

O TNF- $\alpha$  é uma importante citocina que exerce diversos efeitos ao estimular uma grande variedade de células. É uma proteína solúvel composta por três subunidades idênticas e é produzido principalmente por monócitos e macrófagos, porém linfócitos T, B e fibroblastos também podem produzi-lo (Larché, Sacrez e Foxwell, 2005). O TNF- $\alpha$  exerce seus efeitos biológicos pela ligação aos receptores TNFR1 e TNFR2. Quando recém-sintetizado o TNF- $\alpha$  é ancorado na membrana celular sendo liberado pela clivagem do seu domínio de ancoragem por uma metaloproteinase (Black *et al.*, 1997). O TNF- $\alpha$  é capaz de promover a inflamação por ser um potente indutor de outras citocinas inflamatórias, incluindo a IL-1, IL-6, IL-8 e GM-CSF (Choy e Panayi, 2001) e também é capaz de estimular os fibroblastos a expressarem moléculas de adesão que interagem com seus respectivos ligantes na superfície dos leucócitos, resultando em um aumento no transporte de leucócitos para o sítio inflamatório, incluindo nas articulações de pacientes com AR (Lee *et al.*, 2013).

O TNF- $\alpha$  desempenha um papel crucial na artrite inflamatória. Camundongos transgênicos que expressam níveis elevados de TNF- $\alpha$  desenvolvem poliartrite espontânea e a injeção intra-articular deste mediador também induz artrite (Keffer *et al.*, 1991). Em cultura de sinoviócitos de pacientes com AR, o bloqueio de TNF- $\alpha$  com anticorpo reduz significativamente a produção de citocinas (IL-6, IL-1, GM-CSF) (Izquierdo *et al.*, 2011). E a evidência mais relevante são as constatações clínicas de que o bloqueio desta citocina reduz os sinais e sintomas da AR, além de retardar a destruição das articulações, sendo um avanço significativo no tratamento dessa doença (Feldmann e Maini, 2010).

A IL-1 $\beta$  é uma citocina principalmente produzida por monócitos e macrófagos, mas também pode ser produzida por células endoteliais, células B e linfócitos T ativados. Os sinoviócitos do tipo I são os maiores produtores de IL-1 $\beta$  na articulação, e quase metade de todos os macrófagos presentes na sinóvia com AR expressam IL-1 $\beta$  (Firestein *et al.*, 1990). Na inflamação articular, a IL-1 induz a proliferação dos fibroblastos; estimula a biossíntese de IL-6, CXCL-8 e GM-CSF pelas células sinoviais; aumenta a produção de colagenase e prostaglandinas; e estimula a liberação de metaloproteinases pelos fibroblastos e condrócitos (Dayer, 2003; Burger *et al.*, 2006). Na artrite experimental tem sido demonstrado que a IL-1 $\beta$  está altamente envolvida no dano a articulação. A injeção de IL-1 $\beta$  na articulação do joelho de coelhos resultou na degradação da cartilagem, enquanto que a injeção de anticorpos anti-IL-1

amenizou a artrite induzida por colágeno em camundongos e diminuiu o dano à cartilagem (van den Berg *et al.*, 1994; Joosten *et al.*, 1999)

IL-1 e TNF- $\alpha$  possuem várias funções similares, incluindo a habilidade de aumentar a produção de citocinas, a expressão de moléculas de adesão, a proliferação e a produção de MMPs. Na AR, IL-1 e TNF- $\alpha$  agem de maneira sinérgica (van den Berg *et al.*, 1999; Bingham, 2002; Dayer, 2003).

A IL-6 é uma proteína produzida por muitas células incluindo células T, monócitos e fibroblastos. Originalmente foi reconhecida por estimular a síntese de imunoglobulinas por linfócitos B e, além disso, a IL-6 está envolvida na diferenciação de linfócitos T citotóxicos (Kishimoto, 2005; Brennan e McInnes, 2008). Altas concentrações de IL-6 são observadas no fluido sinovial de pacientes com AR e também em culturas de células sinoviais. Embora a maioria dos macrófagos sinoviais expresse o gene da IL-6, as principais células produtoras são os sinoviócitos do tipo B (Firestein, 2005). O papel da IL-6 na AR tem sido demonstrado em estudos clínicos, onde o uso de anticorpos monoclonais anti-IL-6R desempenham respostas clínicas similares as obtidas pelos inibidores do TNF- $\alpha$  (Choy *et al.*, 2002; Nishimoto *et al.*, 2004).

As quimiocinas são pequenos peptídeos quimioatraentes estruturalmente relacionados entre si, que funcionam regulando positivamente a afinidade de integrinas e promovem a migração de leucócitos para os tecidos (Tarrant e Patel, 2006). Muitas quimiocinas têm sido identificadas na articulação reumatoide. A CXCL-8/IL-8 (análogo murino: CXCL-1/KC) caracterizada como um potente quimiotático de neutrófilos contribui de forma significativa para o grande influxo dessas células na articulação (Kraan *et al.*, 2001; Haringman, Ludikhuize e Tak, 2004). Estima-se que a CXCL-8 seja responsável por 40% do recrutamento dos neutrófilos para a cavidade sinovial. Os macrófagos são os principais produtores da CXCL-8 no compartimento sinovial, mas os fibroblastos também expressam o gene da CXCL-8 quando estimulados com TNF- $\alpha$  ou IL-1 $\beta$  (Firestein, 2005). A CXCL-8 inicia a quimiotaxia dos neutrófilos através da ligação aos receptores CXCR1 e CXCR2 que são acoplados a proteína G e estão localizados na superfície dos neutrófilos. A ativação destes receptores ativa a fosfolipase C (PLC) e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (Ferrandi *et al.*, 2007). PI3K e seus principais produtos estão envolvidos em uma variedade de processos celulares, tais como a sobrevivência celular, rearranjo do citoesqueleto, e a diferenciação celular. Entretanto, a função mais

importante de PI3K é a polarização celular que controla a direção da migração dos neutrófilos (Wu *et al.*, 2014).

Os eicosanoides são mediadores lipídicos derivadas do ácido araquidônico importantes na patogênese da AR (Shimizu, 2009). As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) são enzimas-chave na liberação do ácido araquidônico e dados da literatura demonstram que nos processos inflamatórios articulares são detectados altas concentrações de fosfolipases no fluido sinovial dos pacientes (Leistad *et al.*, 2004). Após ser liberado da membrana celular pela ação da enzima PLA<sub>2</sub>, o ácido araquidônico é convertido em prostaglandinas (PGs), prostaciclina e tromboxanos pela ação da enzima ciclooxigenase (COX)-1 ou 2, e em leucotrienos (LTs) pela ação das lipoxigenases (Hikiji *et al.*, 2008). A COX-2 é expressa na sinóvia reumatoide e catalisa a produção de altas concentrações de PGE<sub>2</sub>. A PGE<sub>2</sub> induz vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, e é um dos mediadores responsáveis pela febre e dor na inflamação (McCoy, Wicks e Audoly, 2002). Estudos *in vitro* e em modelos animais demonstraram que a PGE<sub>2</sub> induz a reabsorção óssea por osteoclastos (Lader e Flanagan, 1998), regula a síntese e degradação do colágeno tipo II e além disso, altas concentrações de PGE<sub>2</sub> estimula a liberação de MMPs que degradam a cartilagem (Bingham, 2002).

Dentre os leucotrienos o mais importante para a patogênese da AR é o LTB<sub>4</sub>, que é um potente ativador da função dos neutrófilos. LTB<sub>4</sub> é quimioatraente para neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, e também promove a agregação e aderência dos neutrófilos ao endotélio (Kim, N. D. *et al.*, 2006). Polimorfonucleares do sangue periférico de pacientes com AR possuem uma maior capacidade de produção de LTB<sub>4</sub> (Firestein, 2005). Na artrite murina induzida por colágeno, o antagonismo de LTB<sub>4</sub> diminuiu o edema de pata e a destruição articular, sugerindo um papel fundamental deste potente mediador (Mathis, Jala e Haribabu, 2007). Contudo, o bloqueio do LTB<sub>4</sub> em estudos clínicos tem sido menos impressionante.

## **1.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO ARTICULAR**

Modelos experimentais em animais são amplamente utilizados em estudos da patogênese da artrite reumatoide. Apesar das limitações inerentes de todos os modelos, a utilização de modelos animais para AR tem agregado conhecimento aos estudos dos mecanismos da inflamação, da destruição da cartilagem e da reabsorção óssea, contribuindo com os avanços na intervenção terapêutica dessa doença (Feldmann *et al.*, 1998; Asquith *et al.*, 2009; Bevaart, Vervoordeldonk e Tak, 2010).

Os modelos experimentais para estudo da AR são fáceis de serem executados, têm boa reprodutibilidade e são geralmente de curta duração, e a maioria é similar a doença humana (Kannan, Ortmann e Kimpel, 2005). Dentre os modelos utilizados destacam-se a artrite induzida por zimosan, antígeno, adjuvante e colágeno. Quando injetado por via intra-articular o zimosan desencadeia uma sinovite erosiva associada com o aumento da permeabilidade vascular e migração de células, seguida de uma sinovite progressiva (Keystone et al., 1989). No modelo de artrite induzida por antígeno, os animais são imunizados com uma substância catiônica, como a albumina de soro bovino metilada (m-BSA). Ao ser injetado por via intra-articular o antígeno se liga à cartilagem, que possui carga negativa, os anticorpos ao reconhecerem o antígeno formam complexos imunes que ativam localmente a resposta imune resultando na destruição articular (Bendele, 2001; Svensson *et al.*, 2013). Outros modelos também muito utilizados são: o modelo do adjuvante, que consiste em uma resposta imune adaptativa direcionada aos antígenos da micobactéria que é mediada por células T (Waksman, 2002); e o modelo de artrite induzida por colágeno, no qual a imunização com um colágeno tipo II induz a quebra da tolerância imune e a produção de autoanticorpos (Cho *et al.*, 2007; Bevaart, Vervoordeldonk e Tak, 2010).

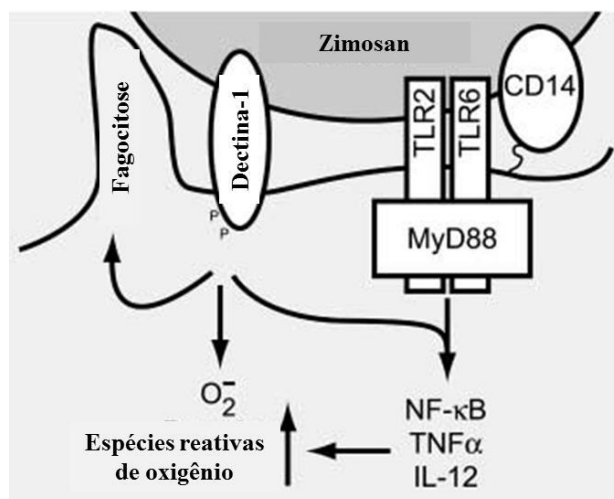
Alguns modelos experimentais utilizam ainda cepas de camundongos geneticamente modificados tomando como exemplo o camundongo SKG, que apresenta uma mutação de ponto espontânea no gene que codifica o ZAP-70, uma molécula chave na transdução de sinal de células T, provocando um quadro de poliartrite crônica espontânea (Sakaguchi *et al.*, 2003). Além disso, foi descoberto que o cruzamento de camundongos NOD com camundongos KRN gera animais que desenvolvem artrite espontânea, modelo chamado de K/BxN (Kouskoff *et al.*, 1996). E a transferência do soro dos animais K/BxN que contem autoanticorpos para animais saudáveis induz uma reação inflamatória nas articulações que mimetiza o modelo experimental dos camundongos K/BxN (Matsumoto *et al.*, 2002; Chou *et al.*, 2010). Nesse modelo observou-se que camundongos depletados de neutrófilos foram resistentes à indução da artrite quando injetados com o soro dos animais K/BxN (Wipke e Allen, 2001) confirmando a importância dessas células na patogênese da AR.

### **1.5.1 MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR ZIMOSAN**

O zimosan é um polissacarídeo da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* constituído principalmente por resíduos de  $\beta$ -glucana e  $\alpha$ -manana (Sato *et al.*, 2003). Esta

levedura é usada no estudo da resposta imune inata, por sua capacidade de estimular a produção de citocinas inflamatórias e ativar o sistema complemento na ausência de imunoglobulinas (Underhill, 2003). O zimosan é reconhecido e fagocitado, principalmente por macrófagos, monócitos, células dendríticas e neutrófilos, através de receptores celulares incluindo receptores de manose, receptores do complemento, e por receptores de  $\beta$ -glucana, sendo o principal deles o receptor dectina-1. A dectina-1 desencadeia diretamente a fagocitose e estimula a produção de ROS, contribuindo assim para morte da levedura (Taylor *et al.*, 2002; Brown, 2006).

Dectina-1 sinaliza através do ITAM (motivo de ativação do imunorreceptor baseado em tirosina), as tirosinas no interior dos ITAMs são fosforiladas por quinases da família das tirosinas quinases (Goodridge *et al.*, 2011). Na sinalização clássica ocorre a ativação da fosfolipase C (PLC), resultando na geração de inositol trisfosfato ( $IP_3$ ) e mobilização de íons cálcio intracelular para o citoplasma. Assim, a ativação da dectina-1 por zimosan induz uma resposta intracelular mediada por cálcio (Kelly, Wang e Ivashkiv, 2010). Além disso, a resposta inflamatória ao zimosan depende também, em grande parte, dos receptores do tipo *toll*, principalmente o TLR2 e TLR6 (Gantner *et al.*, 2003), conforme demonstrado na **Figura 1. 2**. O reconhecimento do zimosan pelo dímero de TLR2/TLR6 leva à ativação de fatores de transcrição tais como, o NF- $\kappa$ B, que desencadeia a produção de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-1 e ativam a expressão de enzimas como a COX-2 e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Bingham, 2002; Frasnelli *et al.*, 2005; Guerrero *et al.*, 2012).



**Figura 1. 2: Modelo de reconhecimento de partículas de zimosan por uma célula do sistema imune inato.** As partículas de zimosan são reconhecidas simultaneamente pela dectina-1 e por um dímero de receptores do tipo *toll*, TLR2/TLR6. A dectina-1 desencadeia diretamente a fagocitose e estimula a produção de ROS, contribuindo assim para morte da levedura. TLRs induzem a sinalização através de NFκB, o qual conduz à produção de citocinas inflamatórias. Essa resposta é aumentada pela dectina-1 assim como a produção de ROS é aumentada pelo TLR. Adaptado de (Gantner *et al.*, 2003).

A artrite murina induzida por zimosan foi descrita pela primeira vez por Keystone em 1977 (Keystone *et al.*, 1977). Quando injetado por via intra-articular o zimosan produz uma sinovite erosiva grave associada ao aumento da permeabilidade vascular e migração de células, principalmente de neutrófilos, seguida por uma sinovite progressiva caracterizada pelo acúmulo predominante de células mononucleares, intensa proliferação de células de revestimento sinovial, hiperalgesia, produção de mediadores inflamatórios e formação de *pannus* reumatoide característico do quadro degenerativo da sinovite crônica de pacientes com AR (Gegout *et al.*, 1994; Gegout *et al.*, 1995; van de Loo *et al.*, 1995). A formação de edema é uma das principais características do quadro patológico da artrite e alguns relatos científicos descrevem o zimosan como um potente indutor de edema articular (Nakagawa *et al.*, 2002; Bernotiene *et al.*, 2004; Conte *et al.*, 2010).

## 1.6 INTERVENÇÃO MEDICAMENTOSA NA ARTRITE REUMATOIDE

A terapia de intervenção farmacológica para a AR é dirigida a diversos elementos do sistema imune. Os medicamentos convencionais para o tratamento da AR consiste em: anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) ou glicocorticoides e os medicamentos antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs do inglês *disease-modifying anti-rheumatic drugs*).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) atuam na síntese de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos por inibir a atividade da enzima ciclooxigenase (COX). Existem duas vias para sintetizar a molécula inflamatória PGE<sub>2</sub>: pela ação da enzima COX-1 constitutiva e pela ação da enzima COX-2 induzível (Morita, 2002). Considerando que a COX-1 é responsável pelos baixos níveis de PGE<sub>2</sub> e regulam mecanismos homeostáticos na saúde, a COX-2 induz, em duas ordens de grandeza ou mais a produção de PGE<sub>2</sub> e está associada principalmente ao processo inflamatório (Dinarello, 2010). A síntese de COX-2 é regulada positivamente por citocinas tais como IL-1 e TNF- $\alpha$  em resposta a estímulos inflamatórios (Bingham, 2002).

Os inibidores específicos da COX-2 tem fornecido um grande avanço no tratamento da dor, particularmente em pacientes com AR (Stix, 2007). A maioria dos inibidores seletivos de COX-2 reduziram significativamente os efeitos secundários gastrointestinais quando comparados aos inibidores não seletivos, que inibem ambas as isoformas da enzima (Sarkar *et al.*, 2007). No entanto, a utilização crônica de alguns inibidores específicos da COX-2 tem sido associados a efeitos adversos cardiovasculares e cerebrovasculares, particularmente em pacientes com um risco elevado de trombose. Esse risco aumentado pode ser devido à redução da síntese de prostaciclina (inibidor natural da ativação das plaquetas) mediada por COX-2. Com o exposto acima, deve ser levado em consideração a necessidade de se desenvolver inibidores de COX-2 mais seguros (Vonkeman e van de Laar, 2010).

Os glicocorticoides são amplamente utilizados de forma crônica para tratar a maioria das doenças autoimunes. O tratamento com glicocorticoides de curto prazo é utilizado na gota, e injeções intra-articulares de glicocorticoides são geralmente utilizadas para tratar articulações osteoartrosas dolorosas e tendinites (Dinarello, 2010). Os glicocorticoides inibem a inflamação por vários mecanismos, um dos principais é a redução da expressão de genes induzidos por citocinas. O glicocorticoide entra na célula e se liga ao receptor de esteroides citoplasmático, este complexo é translocado para o núcleo, onde reconhece sequências de DNA específicas (Dostert e Heinzl, 2004). O principal efeito da ligação ao DNA é a supressão da transcrição, impedindo que os fatores de transcrição NF $\kappa$ B e AP-1 (do inglês, *activator protein-1*) induzam a expressão de citocinas inflamatórias (Rhen e Cidlowski, 2005). Além disso, os AIEs também suprimem a expressão de genes inflamatórios que codificam fatores de crescimento de células T, tais como IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-17. Eles também reduzem a expressão de genes responsáveis pela codificação da COX-2, da iNOS e ICAM-1 (molécula de adesão celular semelhante a imunoglobulina) (Barnes, 2010). E por fim, os glicocorticoides aumentam a expressão de genes

que codificam moléculas anti-inflamatórias, tais como a citocina IL-10 e o receptor “armadilha” de IL-1 (receptor de IL-1 $\beta$  do tipo II; *decoy*) (Barnes, 2006). Na artrite reumatoide o tratamento com glicocorticoides em curto prazo reduz a sinovite e a longo prazo, estas moléculas diminuem o dano às articulações (Kirwan *et al.*, 2007), mas implicam em riscos negativos relevantes, tais como infecções e osteoporose, e sua proporção global entre riscos e benefícios é considerado desfavorável (Ravindran, Rachapalli e Choy, 2009).

Os medicamentos antirreumáticos modificadores da doença são uma coleção heterogênea de agentes agrupados por uso e convenções. Eles formam a base do tratamento para a artrite reumatoide atualmente (Donahue *et al.*, 2008). Seus diversos mecanismos de ação não são completamente compreendidos. Eles reduzem o edema e a dor nas articulações, diminuem os marcadores de fase aguda da inflamação, limitam o dano articular progressivo e melhoram a função (Scott, Wolfe e Huizinga, 2010). O metotrexato é o DMARD mais amplamente utilizado no tratamento da AR. Por vezes ocorre a utilização desses medicamentos em associação com outros da mesma classe, e algumas combinações de DMARDs têm eficácia comprovada clinicamente (Choy *et al.*, 2005). Os efeitos adversos desses medicamentos incluem efeitos mínimos (como náuseas) a efeitos graves (como toxicidade hepática, composição anormal do sangue e doença pulmonar) (Alcorn, Saunders e Madhok, 2009; Salliot e van der Heijde, 2009). Além dos sintéticos existem os DMARDs biológicos.

Os inibidores do TNF- $\alpha$  foram os primeiros agentes biológicos licenciados, seguido por Abatacept (medicamento modulador da co-estimulação, que atua sobre linfócitos T), Rituximabe (anticorpo monoclonal quimérico dirigido contra a proteína de superfície celular CD20, encontrada principalmente em linfócitos B) e Tocilizumabe (anticorpo monoclonal humanizado que atua bloqueando os receptores de IL-6), todos eles são altamente eficazes (Alonso-Ruiz *et al.*, 2008; An *et al.*, 2010; Maxwell e Singh, 2010; Mok, 2014). A eficácia desses agentes biológicos é mais evidente em estudos de curto prazo e na fase final da doença, onde a resposta ao placebo é mais baixa. No entanto, no início da doença sua eficácia é pouco definida, pois os medicamentos tradicionais alcançam melhores resultados. Os efeitos destes agentes podem ser especialmente marcantes em pacientes tratados inadequadamente ou não responsivos a outros medicamentos (Scott, Wolfe e Huizinga, 2010). Inicialmente, os agentes biológicos foram combinados com o metotrexato, para reduzir a formação dos autoanticorpos (Svenson *et al.*, 2007), a observação dos pacientes tratados demonstrou que esta combinação aumenta potencialmente a eficácia desses medicamentos (Strangfeld, Hierse, *et al.*, 2009). Os riscos do uso de agentes biológicos a longo prazo têm sido estudados por meta-análise

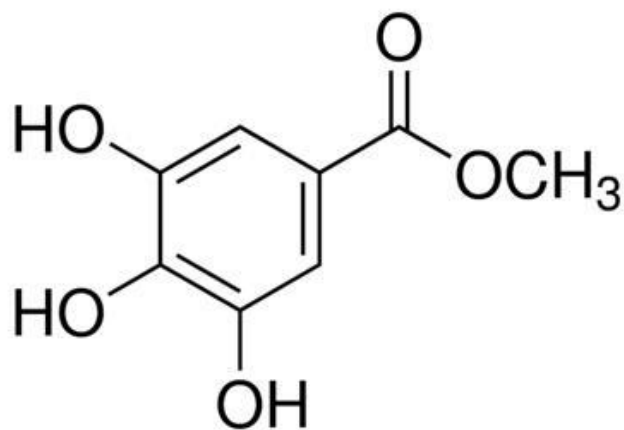


de ensaios e registros de rotina (Leombruno, Einarson e Keystone, 2009). A infecção é a principal preocupação, o risco abrange infecções bacterianas, fúngicas e virais (Strangfeld, Listing, *et al.*, 2009) alguns relatos indicaram o aumento do risco de tuberculose pelos inibidores de TNF- $\alpha$  (Dixon *et al.*, 2010). Outras preocupações levantadas estão relacionadas à desmielinização e câncer, sendo que o aparecimento de linfomas está sendo investigado em detalhes (Strangfeld *et al.*, 2010).

Apesar da eficácia clínica dessas terapias, muitos pacientes não têm uma resposta significativa ou interrompem o tratamento devido aos efeitos adversos. Além disso, a disponibilidade limitada de produtos biológicos eficazes em países em desenvolvimento, a necessidade de administração parentérica desses produtos, e o custo elevado restringe o acesso a essas terapias em muitos pacientes com AR em todo o mundo e isso promove uma busca contínua para a identificação de novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de novos medicamentos (Yen, 2006). Tendo em vista estas limitações, há um crescente interesse em utilizar tratamentos alternativos nos pacientes com artrite (Kikuchi *et al.*, 2009; Marcus, 2009). As substâncias derivadas de plantas que podem modular sinais pró-inflamatórios têm claramente um potencial contra doenças inflamatórias, tais como artrite (Khanna *et al.*, 2007). No entanto, é necessário comprovar cientificamente o valor medicinal desses agentes.

## 1.7 GALATO DE METILA

O galato de metila (GM) (**Figura 1. 3**) é um polifenol conhecido principalmente por seu efeito antioxidante (Westenburg *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2003). Ele é encontrado em várias espécies de plantas, incluindo a *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Rosa rugosa* e *Galla rhois* (Cavalher-Machado *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2009). Além da sua ação antioxidante, o GM tem uma série de efeitos biológicos descritos, tais como atividade antitumoral e antimicrobiana (Whang *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2009). Como antioxidante o GM protege o DNA do dano causado pelo estresse oxidativo e possui propriedades benéficas contra o dano induzido por peróxido de hidrogênio na viabilidade celular (Hsieh *et al.*, 2004; Crispo *et al.*, 2010).



**Figura 1. 3: Estrutura química da substância galato de metila.**

Alguns estudos sugerem um possível efeito anti-inflamatório para o GM (Kim, S. J. *et al.*, 2006; Chae *et al.*, 2010), dentre esses efeitos destacam-se a eliminação de radicais livres, e a inibição da expressão e da atividade de mediadores inflamatórios. Chae e colaboradores (2010) relataram que o GM extraído da espécie vegetal *Galla Rhois* foi capaz de inibir a produção de IL-6 e óxido nítrico (NO) através da redução da fosforilação da proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK) em macrófagos. Embora, os polifenóis tenham efeitos anti-tumoral, em doenças cardiovasculares e em reações inflamatórias *in vitro* (Crispo *et al.*, 2010), não há relatos científicos demonstrando que o GM possua ação anti-inflamatória em modelos *in vivo*.

Neste trabalho, nós avaliamos o potencial efeito anti-inflamatórias do GM em modelos de inflamação induzida pelo zimosan, dando ênfase a artrite experimental.

A artrite induzida por zimosan é um modelo experimental animal que possui diversas similaridades com a AR em humanos, no entanto, não depende da resposta imune mediada por linfócitos. Já foi previamente demonstrado que a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  bem como o influxo de neutrófilos, monócitos/macrófagos são indispensáveis na artrite induzida por zimosan, assim como na AR (Van de Loo, 1998; Pettipher & Salt, 1996).

Neste estudo nós utilizamos o modelo de artrite induzida por zimosan como ferramenta para estudar o efeito farmacológico do GM sobre o influxo celular, a formação de edema e a produção de mediadores induzida por este modelo murino. Além disso, aprofundamos nossos estudos buscando compreender e elucidar o mecanismo de ação deste derivado de polifenóis tão amplamente difundido na natureza, objetivando assim comprovar cientificamente o valor

medicinal do GM e destacar a importância dessa substância como uma candidata com potencial anti-inflamatório para o controle da artrite.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL:**

Avaliar a ação do galato de metila (GM) nas reações inflamatórias induzidas por zimosan destacando a resposta inflamatória articular aguda no modelo murino de artrite experimental.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

Avaliar o efeito do GM:

1. No edema de pata e pleurisia induzidos pelo zimosan.
2. Na artrite experimental induzida pelo zimosan avaliando: a) formação de edema articular, b) influxo de células para a cavidade sinovial, c) avaliação histopatológica do tecido.
3. Na produção de mediadores inflamatórios, tais como as citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos.
4. Na migração e ativação de neutrófilos, avaliando sua ação na quimiotaxia, na adesão celular e na capacidade de formação de filamentos de actina.
5. Na ativação de macrófagos murinos, investigando seu efeito na: a) produção de citocinas e óxido nítrico, b) expressão de enzimas envolvidas no processo como COX-2 e iNOS, c) mobilização de cálcio dos compartimentos intracelulares.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

#### 3.1.1 ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados camundongos machos da linhagem isogênica C57BL/6, com peso médio variando entre 18-25 g, oriundos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL-FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Os camundongos foram mantidos no biotério experimental do laboratório de Farmacologia Aplicada (Farmanguinhos/FIOCRUZ) com temperatura controlada de 23° C ± 2° C e ciclo claro-escuro constante de 12/12 horas com livre acesso à água e ração até o momento do uso.

Os experimentos envolvendo animais foram conduzidos de acordo com as normas éticas internacionais, sendo o projeto devidamente aprovado no Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz sob a licença de número LW-43/14 e de acordo com as recomendações da *International Association for the Study of Pain* (Zimmerman, 1983).

#### 3.1.2 REAGENTES

Galato de metila (98% de pureza) foi adquirido da Fluka (EUA). Zimosan A, Ácido etileno diamino-tetra acético (EDTA), ácido clorídrico (HCl), acrilamida, azul de bromofenol, bisacrilamida, coquetel de inibidores de protease, cloreto de sódio (NaCl), cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), cloreto de potássio (KCl), dexametasona, fucoidina, orofenilenodiamina (OPD), ditioeritrol (DTT), dodecil sulfato de sódio (SDS), fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF), glicerol, ácido N-(2-hidroxiethyl) piperazina-N'-etanosulfônico (HEPES), 2-mercaptoetanol, nitrito de sódio, persulfato de amônio (APS), RPMI 1640, percoll, piruvato de sódio, probenecida, reagente de *Bradford*, reagente de *Griess* modificado, salina tamponada com

fosfato (PBS), albumina de soro bovino (BSA), tampão fosfato-citrato com perborato de sódio (tampão perborato), tetrametiletilenodiamina (TEMED), trisaminometano (Tris, Trizma®) e Tween 20 foram adquiridos da *Sigma Aldrich* (St. Louis, MO, EUA). Os corantes May-Grünwald e Giemsa foram adquiridos da *Merck* (Alemanha). Soro fetal bovino (SFB) e gentamicina foram adquiridos da *Gibco/Life Technologies* (EUA). *Hyperfilm*, membrana de PVDF Hybound™ e reagente ECL® Plus (*Enhanced chemiluminescence, Pierce*) foram adquiridas da *Amersham Biosciences* (Reino Unido). Leite em pó desnatado foi adquirido da *Molico* (Brasil). Pentobarbital sódico a 3 % (*Hypnol®*) foi adquirido da *Syntec* (Brasil).

### 3.1.3 TRATAMENTOS

Após 12 horas de jejum, os animais receberam o galato de metila (GM) por via oral (v.o), diluído em água filtrada, em doses que variaram de 1 a 50 mg/kg em um volume final de 200 µL, 1 hora antes da indução da inflamação por zimosan. A dexametasona foi utilizada como inibidor de referência e foi administrada por via intraperitoneal (i.p.) 1 hora antes do estímulo na dose de 10 mg/kg em um volume final de 100 µL. Os animais do grupo controle receberam 200 µL de água filtrada por via oral.

### 3.1.4 EDEMA DE PATA

O edema de pata foi induzido como descrito por Henriques e colaboradores (Henriques *et al.*, 1987). Camundongos C57BL/6 receberam injeção intraplantar (i.pl.) de zimosan (100 µg/pata; 50 µL) na pata traseira esquerda 1 hora após o pré-tratamento oral com o GM em diferentes doses (1 mg/kg até 50 mg/kg). Como controle da reação, a pata traseira direita recebeu injeção com o mesmo volume (50 µL) de salina estéril.

O edema de pata foi avaliado por pletismografia (*Ugo Basile Pletismometer 7140*) 4 horas após o estímulo com zimosan. Os volumes das patas estimuladas e das patas controle de cada animal foram medidos pelo volume de água deslocada em uma cuba pletismográfica após a imersão da pata. Os valores do edema foram expressos como a diferença ( $\Delta$ ; em µL) entre a pata estimulada e a pata controle de cada animal.

### **3.1.5 PLEURISIA INDUZIDA POR ZIMOSAN**

Primeiramente, foi realizado o pré-tratamento oral com o GM em diferentes doses (1 mg/kg até 50 mg/kg) antes da indução da pleurisia.

A pleurisia foi induzida como descrito por Henriques e colaboradores (Henriques *et al.*, 1990). A técnica adaptada de Spector (Spector, 1956) utiliza um cursor que permite a introdução de uma agulha (13x5 G) de aproximadamente 2 milímetros (mm) no interior do lado direito da cavidade torácica dos camundongos. Foram inoculados 100 µL de zimosan (100 µg/cavidade). Como controle, os animais foram injetados com o mesmo volume (100 µL) de salina estéril.

Os camundongos foram submetidos à eutanásia com excesso de anestésico (pentobarbital sódico 3% - Hypnol) 4 horas após o estímulo, sendo posteriormente suas cavidades pleurais expostas e o lavado pleural recolhido com 1 mL de solução salina tamponada (PBS) contendo EDTA (10 mM), com auxílio de pipeta automática (1000 µL; *Eppendorf*; Alemanha). A partir do lavado foi realizada a contagem total e diferencial dos leucócitos presentes. O lavado pleural livre de células foi utilizado para a quantificação do extravasamento proteico através da solução de Bradford como recomendado pelo fabricante.

### **3.1.6 INDUÇÃO DA ARTRITE POR ZIMOSAN**

A artrite foi induzida em camundongos C57BL/6 através da injeção intra-articular (i.a.) de zimosan (500 µg/cavidade em 25 µL de salina estéril) no ligamento suprapatelar da articulação fêmuro-tibial do joelho esquerdo de acordo com os protocolos de Penido e colaboradores (Penido *et al.*, 2006) e Conte e colaboradores (Conte *et al.*, 2010), visando acessar o interior da cavidade articular 1 hora após o tratamento oral com o GM (7 mg/kg) ou i.p. com a dexametasona (10 mg/kg). Os animais controle receberam injeção intra-articular com o mesmo volume (25 µL) de salina estéril no ligamento contralateral.

#### **▪ AVALIAÇÃO DO EDEMA ARTICULAR**

O edema da articulação do joelho foi avaliado pela medida do diâmetro transverso da articulação fêmuro-tibial, com o auxílio de um paquímetro digital (*Digmatic caliper, Mitutoyo Corp. Kanagawa, Japão*), antes e depois do estímulo i.a. Os valores dos edemas são expressos pela diferença ( $\Delta$ ) entre os diâmetros medidos antes (basal) e após a indução da inflamação articular e foram expressos em milímetros (mm).

#### ▪ **COLETA DO LÍQUIDO SINOVIAL**

Os camundongos foram submetidos à eutanásia com excesso de anestésico (pentobarbital sódico 3% - Hypnol) 1 a 96 horas após a injeção intra-articular de zimosan. A cavidade sinovial foi lavada com auxílio de uma seringa acoplada a uma agulha de 21G contendo 300 µL de PBS/EDTA (10 mM). A agulha foi introduzida através do ligamento suprapatelar do joelho de camundongos, permitindo o acesso, a lavagem e a aspiração do líquido presente no interior da cavidade articular. Foi realizada a contagem total e diferencial dos leucócitos presentes no lavado sinovial. O lavado sinovial foi centrifugado a 400 x g por 10 minutos para recolhimento do sobrenadante para análises posteriores.

### **3.1.7 CONTAGEM DOS LEUCÓCITOS**

#### ▪ **CONTAGEM DE LEUCÓCITOS TOTAIS**

A contagem do número total de leucócitos presentes no lavado pleural e sinovial foi realizada através da diluição de uma alíquota (50 µL) dos lavados em isotom (1:100), e a análise foi realizada através de um contador automático de micropartículas (Z1; *Beckman-Coulter*, EUA).

#### ▪ **CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS**

Para a contagem diferencial, alíquotas das suspensões celulares foram centrifugadas em lâminas de vidro utilizando-se citocentrífuga (Cytospin 3, Shandon Inc., - EUA, 450 RPM, 5 min). A coloração foi realizada pelo método de May-Grunwald-Giemsa. De acordo com este método, as lâminas ficam imersas em May-Grunwald por 5 minutos, para fixação e coloração de grânulos celulares, 3 minutos em água para retirada do excesso de corante e 15 minutos em Giemsa, para corar o núcleo. A contagem das células foi feita em microscópio óptico com objetiva de imersão em óleo, com aumento de 100x.

### **3.1.8 HISTOLOGIA**

A articulação fêmuro-tibial de camundongos C57BL/6, 6 e 24 horas após o estímulo i.a. com zimosan (500 µg/cavidade), foi removida, dissecada e fixada por 48 horas em formalina a 10%. Logo após, a articulação foi descalcificada em solução tampão fosfato (0,1 M) / EDTA



10% durante aproximadamente 2 semanas, com trocas diárias do tampão, sendo posteriormente processada para histologia convencional, sofrendo inclusão em parafina. Com o auxílio de um micrótomo (Shandon), os blocos contendo as peças foram seccionados em uma espessura de 5 µm e colocados em uma lâmina de vidro para posterior coloração pela técnica de hematoxilina e eosina. As lâminas foram submetidas à desparafinização (realizada pelo xilol), hidratação (com soluções hidroalcoólicas de concentração decrescente), coloração pela hematoxilina e eosina, desidratação (com soluções hidroalcoólicas de concentração crescente) e clarificação (pelo xilol). As lâminas foram montadas com lamínulas de vidro em meio próprio e analisadas em microscópio óptico (*Olympus BX41*, Japão).

### **3.1.9 QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES PROTEICOS POR ELISA**

As concentrações das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 e da quimiocina CXCL1/KC presente nos sobrenadantes dos lavados da articulação fêmuro-tibial foram avaliados pelo método de ELISA sanduíche, utilizando pares de anticorpos específicos de acordo com as instruções do fabricante R&D *Systems* (Minneapolis, EUA). A absorbância foi determinada a 490 nm em espectrofotômetro (Softmax). Os resultados foram expressos como picogramas de cada citocina ou quimiocina por mililitro (pg/mL).

### **3.1.10 QUANTIFICAÇÃO DE LTB<sub>4</sub> E PGE<sub>2</sub>**

A concentração do leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e da prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) foram avaliados dos lavados sinoviais livres de células recuperados de camundongos C57BL/6 estimulados com zimosan (500 µg/cavidade) após 6 e 24 horas de estímulo. As concentrações de LTB<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub> foram avaliadas por ensaio imunoenzimático (EIA), de acordo com o protocolo do fabricante (Cayman *Chemical*, MI, EUA). Os resultados foram expressos como picogramas de cada mediador lipídico por mililitro (pg/mL).

## **3.2 EXPERIMENTOS *IN VITRO***

### **3.2.1 ISOLAMENTO DE POLIMORFONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS**

Os camundongos foram submetidos à eutanásia com excesso de anestésico (pentobarbital sódico 3% - Hypnol) em seguida, seus fêmures e tíbias de ambas as patas traseiras foram dissecados e removidos. A extremidade distal do osso foi removida e cada fêmur

e cada tibia foram lavados com 2 mL de Hank's livre de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ . A suspensão de células obtidas foi centrifugada a 400 x g durante 15 min a 22° C em seguida, as células foram ressuspensas em 2 mL de Hank's livre de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ . Os polimorfonucleares foram obtidos por meio de separação em gradiente constituídos por soluções a 72 e 65% de Percoll. Para isso, as células foram centrifugadas a 1200 x g durante 35 min com ACC/DEC 0 em temperatura ambiente. A camada de mononucleares, sobre a solução de 65% foi descartada e a camada de polimorfonucleares, sobre a solução de 72% foi recuperada. A contagem do número de células foi realizada em câmara de Neubauer e a pureza dos neutrófilos foi feita a partir de citoesfregaço em lâminas de vidro após a coloração com May-Grunwald-Giemsa (>90% de pureza).

### **3.2.2 ANÁLISE DA VIABILIDADE DE NEUTRÓFILOS *IN VITRO***

A viabilidade dos neutrófilos na presença ou ausência do GM foi determinada utilizando o *kit* para ensaio toxicológico *in vitro* baseado na detecção de lactato desidrogenase (*Sigma Aldrich*). Após o isolamento, os neutrófilos foram plaqueados em placas de 96 poços em uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço. Em seguida, as células foram incubadas por 2 horas com diferentes concentrações de GM (0,01  $\mu\text{M}$  – 100  $\mu\text{M}$ ). Como controle negativo foram utilizados poços que receberam somente RPMI-1640 e como controle de citotoxicidade foram utilizados poços que receberam RPMI com *Tween-20* (3%). O experimento foi realizado em quadruplicata em um volume final de 200  $\mu\text{L}$ /poço. Após 2 horas de incubação, a placa foi centrifugada a 250 x g durante 4 min para sedimentar as células. Em seguida, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram transferidas para placas limpas de fundo plano e foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  da mistura do ensaio de lactato desidrogenase por poço, a placa foi coberta com um material opaco para proteger da luz e incubada a temperatura ambiente durante 20-30 min. A reação foi interrompida pela adição de HCl 1N. A absorbância foi mensurada usando SpectraMax 190 (Molecular Devices) no comprimento de onda de 490 nm. A absorbância do background foi mensurada a 690 nm e esse valor foi subtraído da medição do comprimento de onda principal (490 nm) conforme as especificações do fabricante.

### **3.2.3 ENSAIO DE QUIMIOTAXIA**

Os neutrófilos isolados a partir da medula óssea de camundongos foram plaqueados em microcâmara de quimiotaxia 48 poços (Neuroprobe Inc., EUA). Os poços inferiores foram preenchidos com 29  $\mu\text{L}$  de um estímulo quimioatraente, CXCL-1/KC (250 nM) ou meio RPMI-

1640 (controle), e os poços superiores foram preenchidos com neutrófilos ( $10^5$  células/poço; 50  $\mu$ L) que foram previamente tratados com GM (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M) ou dexametasona (50 nM). Os poços foram separados por um filtro de policarbonato de 5  $\mu$ m (Nuclepore, *Sigma Aldrich*, EUA). A câmara foi incubada em uma estufa umidificada com uma atmosfera controlada de 37° C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 60 minutos. Em seguida, o filtro de policarbonato foi corado com May-Grunwald-Giemsa. As células que migraram completamente através do filtro foram contadas por microscopia de luz (aumento de 100x). A quimiotaxia dos neutrófilos foi calculada e expressa como a média do número de células que migraram em quinze campos aleatórios por poço (em quadruplicata).

### 3.2.4 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR

Para os ensaios de adesão celular foi utilizado a linhagem celular murina de endotelioma tímico (tEnd.1) que foi cultivada em RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB contendo 25  $\mu$ g/mL de gentamicina. As células tEnd.1 foram plaqueadas em câmaras de cultura de 4 poços ( $10^4$  células/poço) (*Lab-Tek® chambers, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Inc.*, EUA) por 24 horas a 37° C em uma estufa umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Antes de cada experimento, as células tEnd.1 foram estimuladas com TNF- $\alpha$  recombinante murino (10 ng/mL) durante 4 horas. Os neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos foram pré-tratados com fucoidina (25  $\mu$ g/mL; polissacarídeo que se liga a L- e P- selectinas e consequentemente inibe o rolamento e a subsequente adesão dos leucócitos) ou GM (0,1  $\mu$ M) durante 1 hora e então foram colocados sobre as células tEnd.1 (50 neutrófilos/tEnd.1) por 1 hora a 37° C sob agitação. As células que não aderiram foram gentilmente retiradas por lavagem com PBS, e as células aderidas foram fixadas e coradas com Giemsa e visualizadas em microscópio de luz (*Olympus BX41*, Japão). O número de neutrófilos aderidos por célula tEnd.1 foi determinado por contagem direta. Os dados foram expressos como um índice de adesão (IA), calculado como se segue:  $IA = (\text{tEnd.1 com neutrófilos ligados}) / (\text{número total de células tEnd.1}) \times (\text{neutrófilos ligados as células tEnd.1}) / (\text{número de tEnd.1 totais} \times 100)$ , como descrito anteriormente por Ferraris e colaboradores (Ferraris *et al.*, 2012).

### 3.2.5 MONTAGEM DE F-ACTINA (POLIMERIZAÇÃO DE ACTINA)

Para avaliar o efeito do pré-tratamento com o GM sobre os filamentos de actina que compõem o citoesqueleto celular, neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos foram

pré-incubados ou não com o GM (0,1  $\mu$ M) por 1 hora. Em seguida, as células foram estimuladas com a quimiocina CXCL-1/KC (100 nM) a 37° C por 5 minutos. A reação foi interrompida com a adição de paraformaldeído 2% seguida pela fixação em lâminas de vidro pela centrifugação em citocentrífuga (Cytospin 3, Shandon Inc., - EUA, 450 RPM, 5 min). Após a centrifugação, as células foram novamente fixadas durante 20 min com paraformaldeído 4%. Em seguida, as células foram permeabilizadas com 0,25% de Triton X-100 em PBS por 3 vezes de 10 minutos. Após a permeabilização as células foram marcadas com Faloidina-TRITC (*Sigma Aldrich*; 4  $\mu$ g/mL; 30 minutos), sendo a contra-coloração nuclear feita pela utilização de DAPI. As lamínulas foram seladas em lâminas de microscopia com esmalte incolor. O material foi observado em microscópio Zeiss Axioplan equipado com epifluorescência.

### **3.2.6 CULTIVO DE MACRÓFAGOS J774A.1**

As células foram descongeladas em banho Maria a 37° C, e posteriormente adicionadas a RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, gentamicina 25  $\mu$ g/mL e solução de vitamina, e cultivada por 7 dias, em garrafas de 25 cm<sup>3</sup>, mantidas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C. A troca do meio ocorreu a cada 48 horas.

### **3.2.7 ANÁLISE DA VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS J774A.1 IN VITRO**

A viabilidade celular na ausência ou presença do GM foi determinada utilizando o ensaio de *Alamar Blue* (Invitrogen). Macrófagos da linhagem murina J774A.1 foram plaqueados em uma densidade 2.5 x 10<sup>5</sup> células/poço em placa de 96 poços de fundo plano preta. Após 24 horas de incubação em atmosfera controlada (5% de CO<sub>2</sub>, 37° C), as células receberam meio RPMI com ou sem *Tween-20* (3%) ou GM (0,01  $\mu$ M – 100  $\mu$ M) em quadruplicata. Após 20 horas de incubação, foi acrescido aos poços 20  $\mu$ L da solução de *Alamar blue* e, após 4 horas foi realizado a leitura da fluorescência utilizando o leitor de microplacas SpectraMax M5/M5e (Molecular Devices;  $\lambda_{exc}$  = 555 nm,  $\lambda_{em}$  = 585 nm).

### **3.2.8 ATIVAÇÃO DOS MACRÓFAGOS E PRODUÇÃO DE IL-6**

Macrófagos murinos da linhagem J774A.1 foram plaqueados em placas de cultura de fundo plano 96 poços (10<sup>5</sup> células/poço), em meio RPMI-1640 suplementado. A placa permaneceu incubada por 24 horas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C. Em seguida, as células

foram incubadas em um volume de 200  $\mu\text{L}$  por poço com diferentes concentrações do GM (0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ ) ou dexametasona (1  $\mu\text{M}$ ) durante 1 hora. As células foram estimuladas somente com zimosan (10  $\mu\text{g}/10^5$  células), somente com IFN- $\gamma$  (25 U/mL) ou com zimosan e IFN- $\gamma$  por 24 horas. Após esse período, o sobrenadante foi recolhido e a quantidade de IL-6 foi avaliada por ELISA sanduíche, como descrito anteriormente. Os resultados foram expressos como picogramas de IL-6 por mililitro (pg/mL).

### **3.2.9 DOSAGEM DE NITRITO PELO MÉTODO DE GRIESS**

O sobrenadante recolhido dos macrófagos J774A.1 que foram pré-tratados com diferentes concentrações do GM (0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ ) ou dexametasona (1  $\mu\text{M}$ ) e estimulados com zimosan e/ou IFN- $\gamma$  (conforme descrito anteriormente) foi utilizado para a dosagem da produção de óxido nítrico. Foi feita uma curva padrão, utilizando nitrito sódico em diluição seriada com oito pontos, onde o primeiro ponto foi de 100  $\mu\text{M}$ , o penúltimo 1,56  $\mu\text{M}$  e o último o branco. Na placa de 96 poços foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra e então foram adicionados a todos os poços 100  $\mu\text{L}$  de solução de Griess (solução 1:1 de sulfonilamida 1% em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  5% e  $\alpha$ -Naftiletilenodiamina 0,1% em água) para desenvolvimento de reação colorimétrica. A absorbância foi determinada a 540 nm em espectrofotômetro (Softmax).

### **3.2.10 PREPARO DOS EXTRATOS CELULARES E WESTERN BLOT**

Os extratos celulares foram obtidos a partir de macrófagos J774A.1 ( $10^6$  células/poço) previamente tratados com GM (0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ ) ou dexametasona (1  $\mu\text{M}$ ) por 1 hora a 37°C e estimulados com zimosan (10  $\mu\text{g}/10^5$  células) e/ou IFN- $\gamma$  (25 U/mL) por 24 horas, como descrito anteriormente. Os lisados celulares totais foram obtidos com tampão de lise (Tris 20 mM, NaCl 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, 0,5% de NP-40, PMSF 1 mM e inibidores de proteases). As proteínas foram coletadas do sobrenadante (após centrifugação a 14000 RPM, 4° C, 10 min). A concentração de proteínas contidas no extrato total foi determinada pelo método de Bradford. Os lisados celulares foram desnaturados em tampão de amostra *Laemmli* (50 mM de Tris-HCL, pH 6,8, 1% de sódio dodecil sulfato (SDS); 5% 2-mercaptoetanol; 10% de glicerol e 0,001% de azul de bromofenol) a 90° C durante 5 min. As amostras de proteína (30  $\mu\text{g}$  de proteínas) foram submetidas a corrida no gel de eletroforese SDS-poliacrilamida 7.5% (PAGE) e as proteínas foram transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno. As membranas foram bloqueadas com TBS-*Tween* (TBST - do inglês *tris buffered saline tween*;

0,1% de *Tween-20*) contendo 5% de leite desnatado e receberam os anticorpos monoclonais primários específicos anti-COX-2, anti-iNOS e anti- $\alpha$ -tubulina (Santa Cruz *Biotechnology*) *overnight* a 4° C. Após extensa lavagem em TBS-*Tween*, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários  $\alpha$ -cabra,  $\alpha$ -rato ou  $\alpha$ -camundongo, respectivamente, conjugados a peroxidase (HRP) (Santa Cruz *Biotechnology*) durante 1 hora em temperatura ambiente. A detecção foi feita usando o sistema ECL (*Enhanced Chemiluminescence, Pierce*) e as membranas expostas a filme de autorradiografia. As bandas foram quantificadas por densitometria usando o *software Image J* (domínio público).

### 3.2.11 MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE CÁLCIO INTRACELULAR

Para a quantificação dos níveis de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular foi utilizado o *kit FLIPR Calcium Assay* (Molecular Devices), de acordo com as instruções do fabricante. Macrófagos J774A.1 foram plaqueados em placa de 96 poços de fundo plano preta na densidade de  $5 \times 10^4$  células/poço. Após 24 horas de incubação em atmosfera controlada (37° C, 5% de  $\text{CO}_2$ ), os macrófagos foram incubados com probenecida (inibidor da proteína de permuta aniônica) 2,5 mM, em um volume final de 100  $\mu\text{L}$ . Em seguida, as células foram incubadas com HBSS ou GM (1  $\mu\text{M}$ ) diluídos em *loading buffer* contido no *kit*, para a marcação do cálcio intracelular a 37° C e 5% de  $\text{CO}_2$  por 1 hora. Após o tempo de incubação, os macrófagos foram ou não estimulados com zimosan (10  $\mu\text{g}/10^5$  células) e IFN- $\gamma$  (25 U/mL). A medição dos níveis de cálcio foi monitorada durante 10 minutos com leitura realizada a cada 7 segundos. Os dados foram analisados utilizando *Softmax Pro* (Softmax Dispositivos Moleculares-Pro190).

### 3.2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

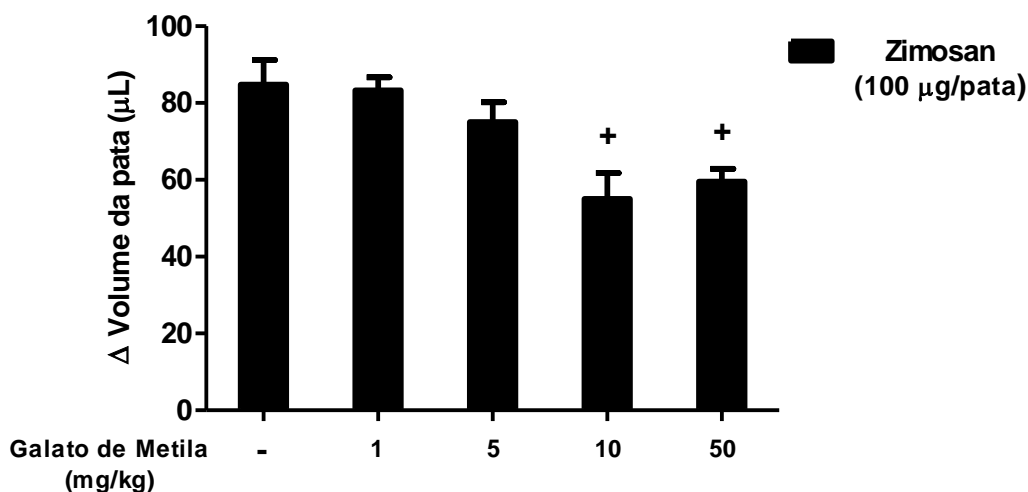
Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e analisado estatisticamente através do teste de análise da variância (ANOVA), seguido pelo teste de *Newman-Keuls-Student*. Para a comparação entre dois grupos experimentais foi utilizado o teste “t” de *Student*. Valores de *p* inferiores ou iguais ( $\leq$ ) a 0,05 foram considerados significativos (\*,+).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CURVA DOSE-RESPOSTA DO GALATO DE METILA NOS MODELOS DE EDEMA DE PATA E PLEURISIA INDUZIDOS POR ZIMOSAN

Inicialmente, foi avaliado o efeito anti-inflamatório do GM nos modelos de edema de pata e pleurisia induzidos por zimosan.

Na **Figura 4. 1**, observa-se que a injeção intraplantar de zimosan (100 µg/pata; 50 µL) induziu um aumento no volume da pata dos camundongos 4 horas após o estímulo. A administração oral do GM (1 a 50 mg/kg) 1 hora antes do estímulo com zimosan preveniu significativamente a formação do edema de pata nas doses de 10 e 50 mg/kg. Entretanto, a redução no edema de pata não ocorreu de forma dose-dependente.



**Figura 4. 1: Efeito do pré-tratamento com o GM sobre a formação de edema de pata.** O edema de pata foi induzido através da injeção intraplantar de zimosan (100 μg/pata) 1 hora após o pré-tratamento oral com diferentes doses do GM (1 a 50 mg/kg). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume i.pl. de salina estéril. O edema de pata foi medido em pletismógrafo no tempo de 4 horas após o estímulo com zimosan. Os valores do edema foram expressos como a diferença (Δ; em μL) entre a pata estimulada e a pata controle de cada animal. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de um grupo de no mínimo 6 animais por experimento e são representativos de dois experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas  $p \leq 0,05$  (teste *one-way* ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*) comparado com o grupo estimulado com zimosan foram representadas por (+).

Para avaliar o efeito anti-inflamatório do GM na pleurisia induzida por zimosan, os animais foram pré-tratados por via oral (v.o) com o GM em diferentes doses (1 a 50 mg/kg) 1 hora antes do estímulo. Conforme demonstrado na **Figura 4. 2**, a injeção i.t. de zimosan (100 μg/cavidade; 100 μL) induziu um acúmulo significativo de leucócitos, principalmente de neutrófilos e um marcado extravasamento proteico na cavidade pleural dos animais 4 horas após o estímulo (**Figura 4. 2 A-C**).

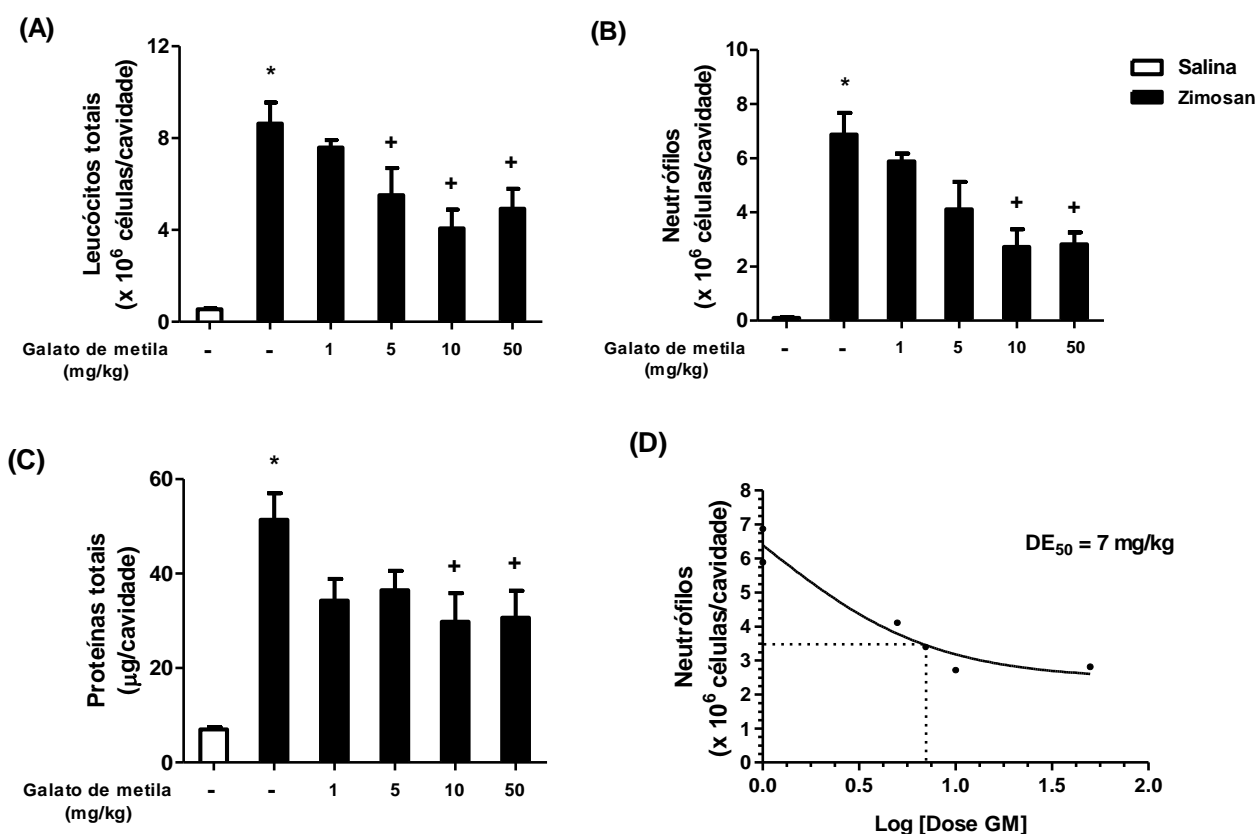
Na **Figura 4. 2 A**, observa-se que o pré-tratamento com o GM reduziu significativamente o acúmulo de leucócitos totais nas doses de 5, 10 e 50 mg/kg mas não na dose de 1 mg/kg. Conforme observado na **Figura 4. 2 B e C**, o GM inibiu a migração de neutrófilos e o extravasamento proteico na cavidade torácica nas duas doses mais elevadas (10 e 50 mg/kg).

Dentre os parâmetros inflamatórios avaliados, selecionamos o acúmulo de neutrófilos para calcular a dose eficaz em inibir 50% (DE<sub>50</sub>) da resposta inflamatória. Conforme pode ser



observado na **Figura 4. 2 D**, a  $DE_{50}$  do influxo de neutrófilos foi de 7 mg/kg, sendo esta dose escolhida para dar seguimento aos ensaios *in vivo* seguintes.

Estes resultados demonstram que o GM exibe uma importante atividade anti-inflamatória, através da inibição do edema da pata, exsudação de plasma e recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural.



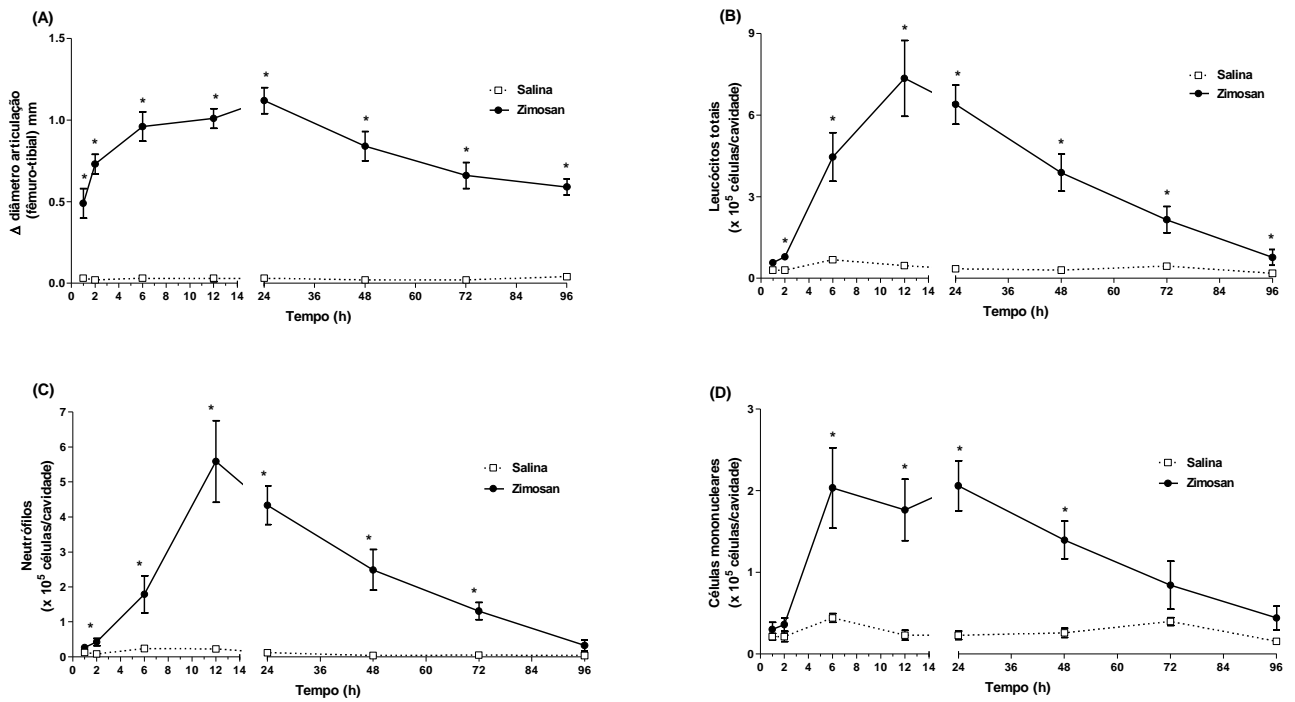
**Figura 4. 2: Efeito do pré-tratamento com o GM na pleurisia.** A pleurisia foi induzida através de injeção intratorácica de zimosan (100  $\mu$ g/cavidade) 1 hora após o pré-tratamento oral com diferentes doses do GM (1 a 50 mg/kg). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume i.t. de salina estéril. A quantificação do acúmulo total de leucócitos (A), neutrófilos (B) e o extravasamento proteico (C) foram realizados 4 horas após o estímulo com zimosan. O cálculo da  $DE_{50}$  do GM está representada na figura D. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de um grupo de no mínimo 6 animais por experimento e são representativos de dois experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas  $p \leq 0,05$  (teste *one-way* ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*) comparado com o grupo controle salina foram representadas por (\*), ao passo que comparado com o grupo estimulado com zimosan foram representadas por (+).

## 4.2 AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO ARTICULAR INDUZIDA POR ZIMOSAN EM DIFERENTES TEMPOS

A avaliação da formação do edema e do acúmulo de leucócitos após a injeção intra-articular de zimosan foi realizada com a finalidade de observarmos os períodos mais relevantes do processo inflamatório articular em camundongos.

Na **Figura 4.3 A**, observa-se que a injeção intra-articular (i.a.) de zimosan (500 µg/cavidade) em camundongos induziu um aumento significativo no diâmetro da articulação do joelho logo na primeira hora após o estímulo, atingindo o aumento máximo em 24 horas. Após este tempo os valores do diâmetro articular começaram a diminuir, mas permaneceram significativamente acima dos valores basais até 96 horas após o estímulo. A injeção de zimosan induziu um acúmulo de leucócitos na cavidade articular observado a partir de 2 horas após o estímulo, atingindo o máximo em 12 horas, mantendo-se até 24 horas e reduzindo gradualmente nos tempos posteriores retornando a níveis similares aos do controle 96 horas após a injeção de zimosan (**Figura 4.3 B**). O aumento do número de leucócitos totais em 12 horas foi acompanhado pelo aumento no número de neutrófilos (**Figura 4.3 C**). O número de células mononucleares aumentou 6 e 24 horas após o estímulo, retornando a níveis similares aos do controle 72 horas após a injeção de zimosan (**Figura 4.3 D**).

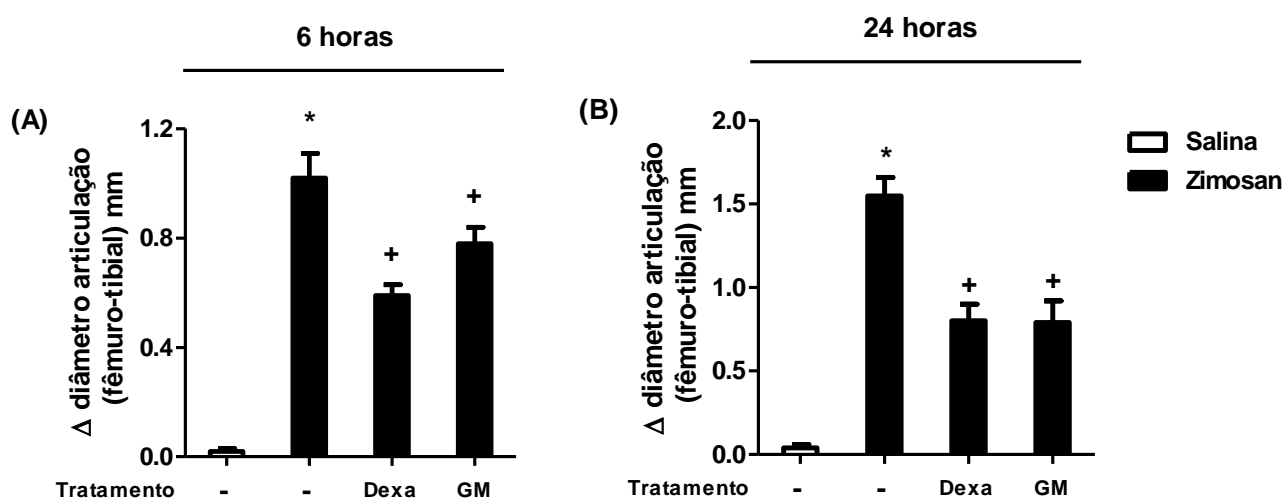
Com base nos resultados obtidos, a dose do GM (7 mg/kg) e os tempos da reação (6 e 24 horas) foram escolhidos para os próximos estudos.



**Figura 4. 3: Estudo da inflamação articular induzida por zimosan.** A artrite experimental foi induzida através da injeção intra-articular (i.a.) de zimosan (500  $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$ ). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume i.a. de salina estéril (25  $\mu\text{L}$ ). Foi avaliado a formação de edema articular (A), o acúmulo do total de leucócitos (B), neutrófilos (C) e células mononucleares (D) 1, 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após o estímulo com zimosan. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de um grupo de no mínimo 6 animais por experimento e são representativos de dois experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas  $p \leq 0,05$  (teste *t de Student*) comparado com o grupo controle salina foram representadas por (\*).

### 4.3 EFEITO DO GALATO DE METILA NA FORMAÇÃO DE EDEMA E ACÚMULO CELULAR NA ARTRITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ZIMOSAN EM CAMUNDONGOS

Na **Figura 4. 4** está representado o efeito do GM (7 mg/kg) 6 e 24 horas após o estímulo com zimosan (500 µg/cavidade; 25 µL). Observa-se que o GM reduziu de forma significativa o aumento do diâmetro articular em 6 (**Figura 4. 4 A**) e em 24 horas (**Figura 4. 4 B**) após a indução da artrite experimental. Como referência de fármaco anti-inflamatório foi utilizado a dexametasona (10 mg/kg; 100 µL; i.p.) que inibiu a formação de edema articular nos dois tempos avaliados.

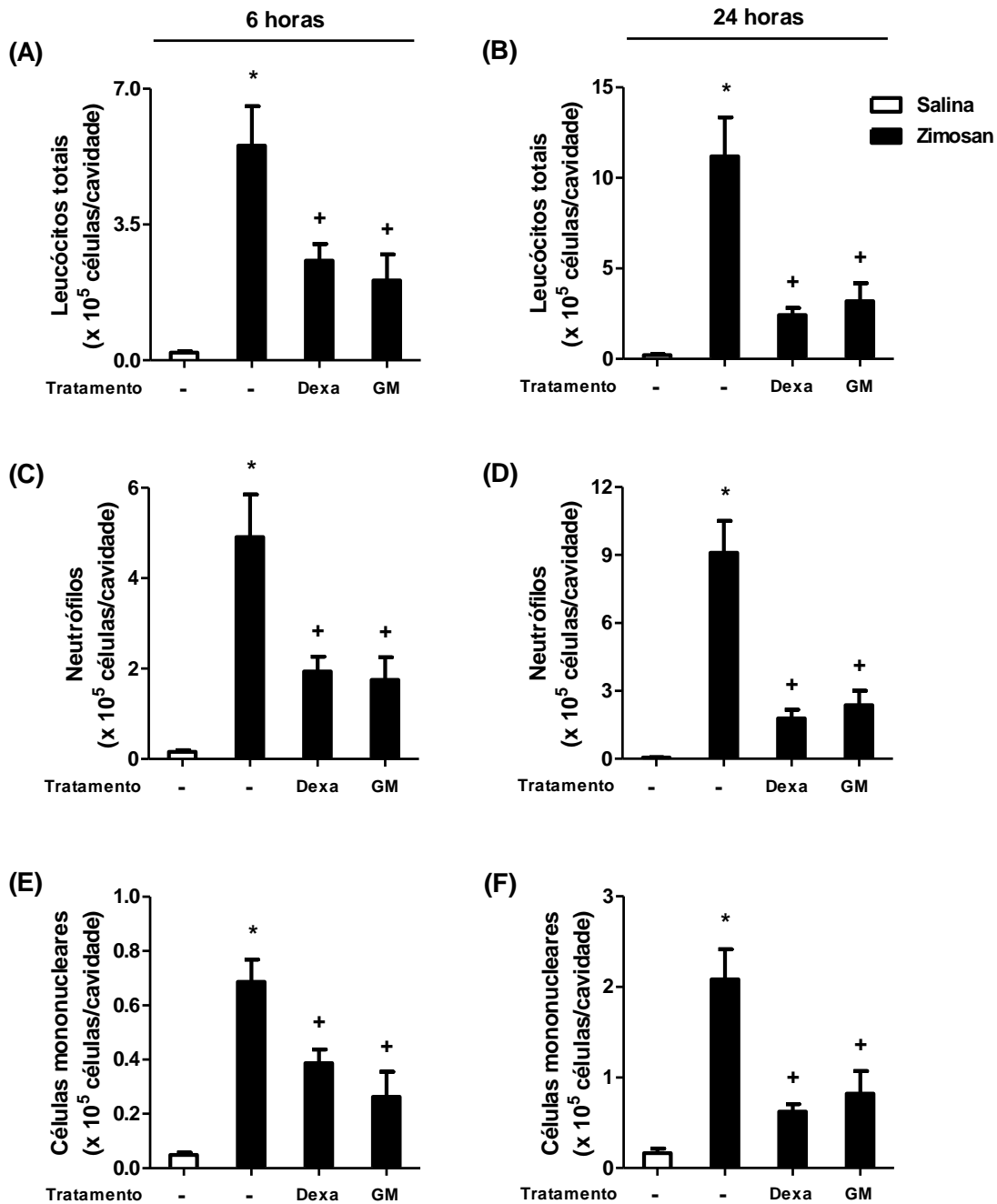


**Figura 4. 4: Efeito do pré-tratamento com o GM na formação de edema articular.** A artrite foi induzida através da injeção intra-articular (i.a.) de zimosan (500 µg/cavidade; 25 µL) 1 hora após o pré-tratamento oral com o GM (7 mg/kg) ou com o fármaco de referência dexametasona (10 mg/kg; i.p.). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume i.a. de salina estéril (25 µL). A avaliação do diâmetro articular foi realizada através de um paquímetro digital 6 (A) e 24 (B) horas após o estímulo com zimosan. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de um grupo de no mínimo 6 animais por experimento e são representativos de três experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas  $p \leq 0,05$  (teste *one-way* ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*) comparado com o grupo controle salina foram representadas por (\*), ao passo que comparado com o grupo estimulado com zimosan foram representadas por (+).

Como pode ser observado na **Figura 4. 5** a injeção i.a. de zimosan (500 µg/cavidade) induziu, em 6 e 24 horas, um acúmulo significativo de leucócitos na cavidade articular, quando comparado ao grupo controle. O acúmulo de leucócitos foi acompanhado pelo aumento do

número de neutrófilos somado ao discreto, mas significativo, acúmulo de células mononucleares na articulação (**Figura 4. 5 A-F**).

O pré-tratamento com a dexametasona (10 mg.kg; i.p.) inibiu significativamente a migração dos leucócitos para a cavidade articular em ambos os tempos analisados (**Figura 4. 5 A-F**). A administração oral do GM 1 hora antes do estímulo reduziu de forma significativa o acúmulo do total de leucócitos na cavidade articular 6 e 24 horas após a injeção de zimosan (**Figura 4. 5 A e B**). Este efeito foi caracterizado principalmente pela inibição da migração de neutrófilos nos dois tempos avaliados (58% de inibição em 6 horas e 70% de inibição em 24 horas) (**Figura 4. 5 C e D**). O GM reduziu também o acúmulo de células mononucleares 6 e 24 horas após o estímulo (**Figura 4. 5 E e F**).



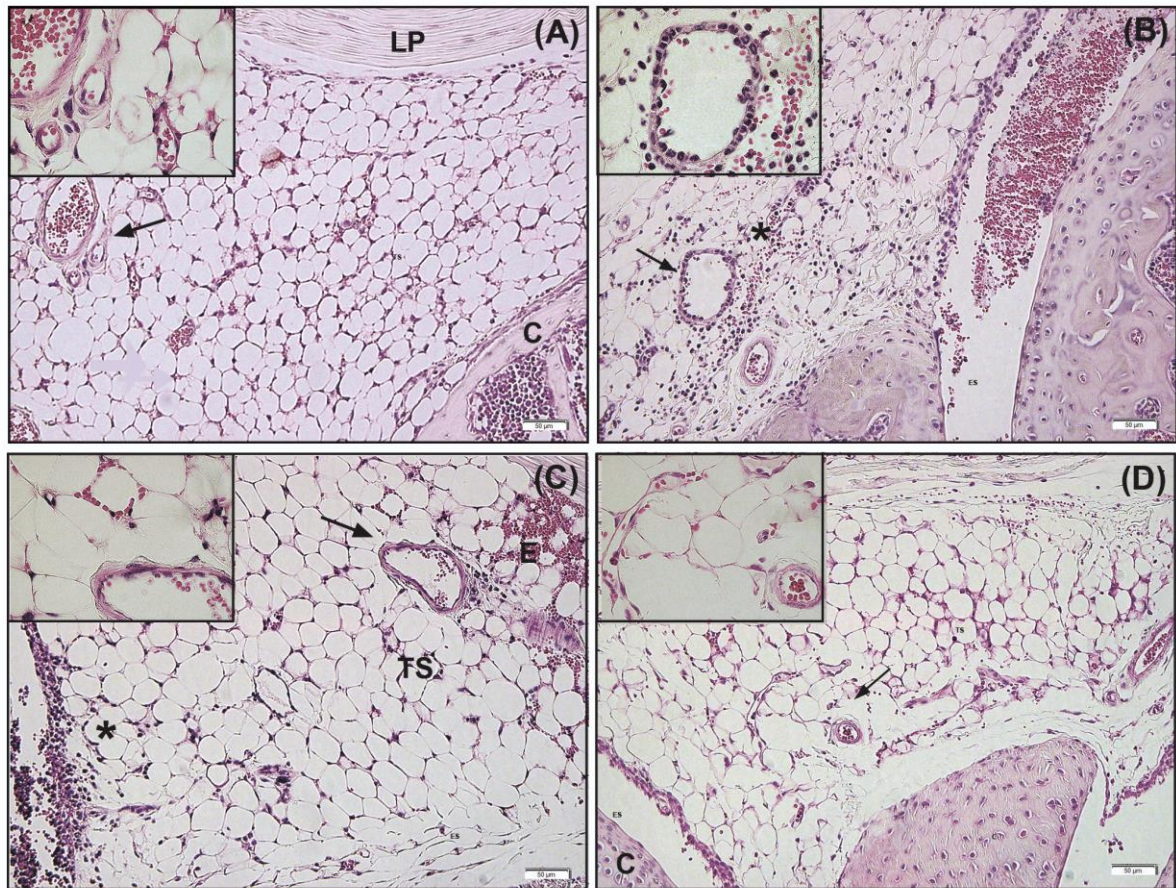
**Figura 4. 5: Efeito do pré-tratamento com o GM sobre a migração celular na artrite experimental.** A artrite foi induzida através da injeção intra-articular (i.a.) de zimosan (500 µg/cavidade; 25 µL) 1 hora após o pré-tratamento oral com o GM (7 mg/kg) ou com o fármaco de referência dexametasona (10 mg/kg; i.p.). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume i.a. de salina estéril (25 µL). A quantificação do acúmulo total de leucócitos (A e B), neutrófilos (C e D) e células mononucleares (E e F) foram realizados 6 e 24 horas após o estímulo com zimosan. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de um grupo de no mínimo 6 animais por experimento e são representativos de três experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas  $p \leq 0,05$  (teste *one-way* ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*) comparado com o grupo controle salina foram representadas por (\*), ao passo que comparado com o grupo estimulado com zimosan foram representadas por (+).

Os cortes histológicos da articulação fêmuro-tibial de camundongos foram obtidos 6 e 24 horas após o estímulo com zimosan. Nos cortes histológicos da articulação fêmuro-tibial, obtidos de animais do grupo controle (salina), observa-se que o tecido sinovial preservado é composto por adipócitos e fibroblastos, não apresenta influxo de células inflamatórias (seta preta e insertos) e possui a cartilagem íntegra (**Figura 4. 6 e Figura 4. 7 A**). Ao analisarmos os cortes da articulação inflamada observamos um intenso acúmulo de leucócitos, em sua grande parte neutrófilos (representados nas imagens pelo uso de um \*) dispersos difusamente no tecido sinovial, especialmente ao redor de vasos sanguíneos e uma hemorragia no tecido e no espaço sinovial (**Figura 4. 6 B e Figura 4. 7 B**).

Nas **Figura 4. 6 e Figura 4. 7 C e D**, observamos que o pré-tratamento com o GM e com a dexametasona reduziu o acúmulo de neutrófilos e os pontos hemorrágicos no tecido sinovial, corroborando com nossos achados anteriores na diminuição do número de neutrófilos na cavidade sinovial.

A redução da formação de edema, acúmulo de células inflamatórias retidas no tecido sinovial, observado nos cortes histológicos, e a inibição do influxo de células para a articulação indicam uma importante atividade anti-inflamatória do GM na inflamação articular murina induzida por zimosan.

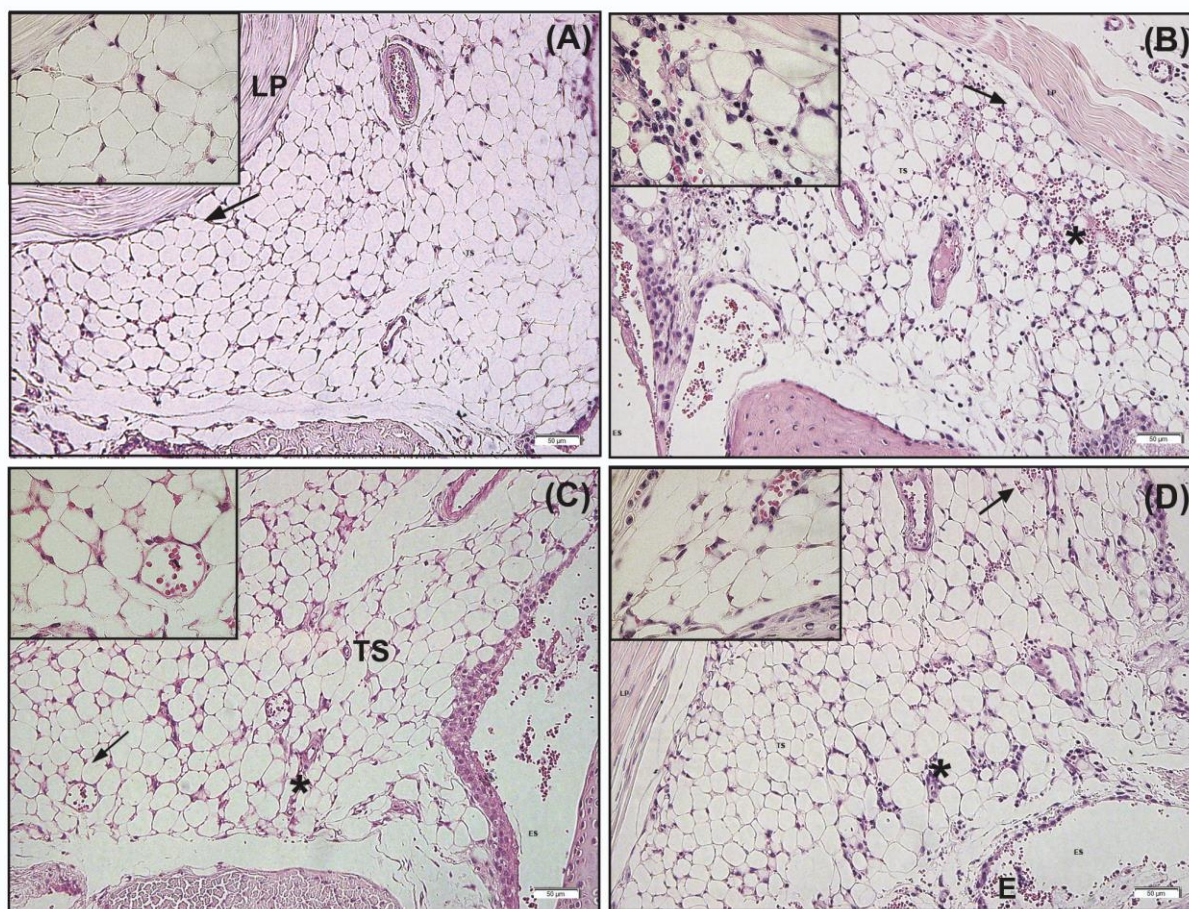
## 6 Horas



**Figura 4. 6: Histopatologia representativa do efeito do GM sobre a inflamação articular induzida por zimosan 6 horas após o estímulo.** Cortes histológicas longitudinais da articulação fêmuro-tibial de camundongos C57BL/6 injetados i.a. com (A) salina ou (B-D) zimosan (500µg/cavidade). Uma hora antes da i.a. parte dos animais foram tratados oralmente com (D) GM (7 mg/kg) ou (C) dexametasona (10 mg/kg) utilizado com fármaco de referência. (A) Tecido sinovial preservado sem influxo de células inflamatórias (seta preta e insertos) e cartilagem morfolologicamente normal. (B) Intenso infiltrado inflamatório (\*) e hemorragia no tecido sinovial e no espaço sinovial, presença de vasos sanguíneos com neutrófilos aderidos (seta preta e insertos). (C) Tecido sinovial apresentando infiltrado inflamatório (\*) e pontos hemorrágicos reduzidos (seta preta e insertos). (D) Infiltrado inflamatório reduzido no tecido sinovial (seta preta e insertos) e cartilagem preservada. Coloração de Hematoxilina e Eosina. Aumento de 20X e insertos de 100X. C: cartilagem; E: Eritrócitos; ES: Espaço sinovial; LP: Ligamento patelar; TS: tecido sinovial.



## 24 Horas

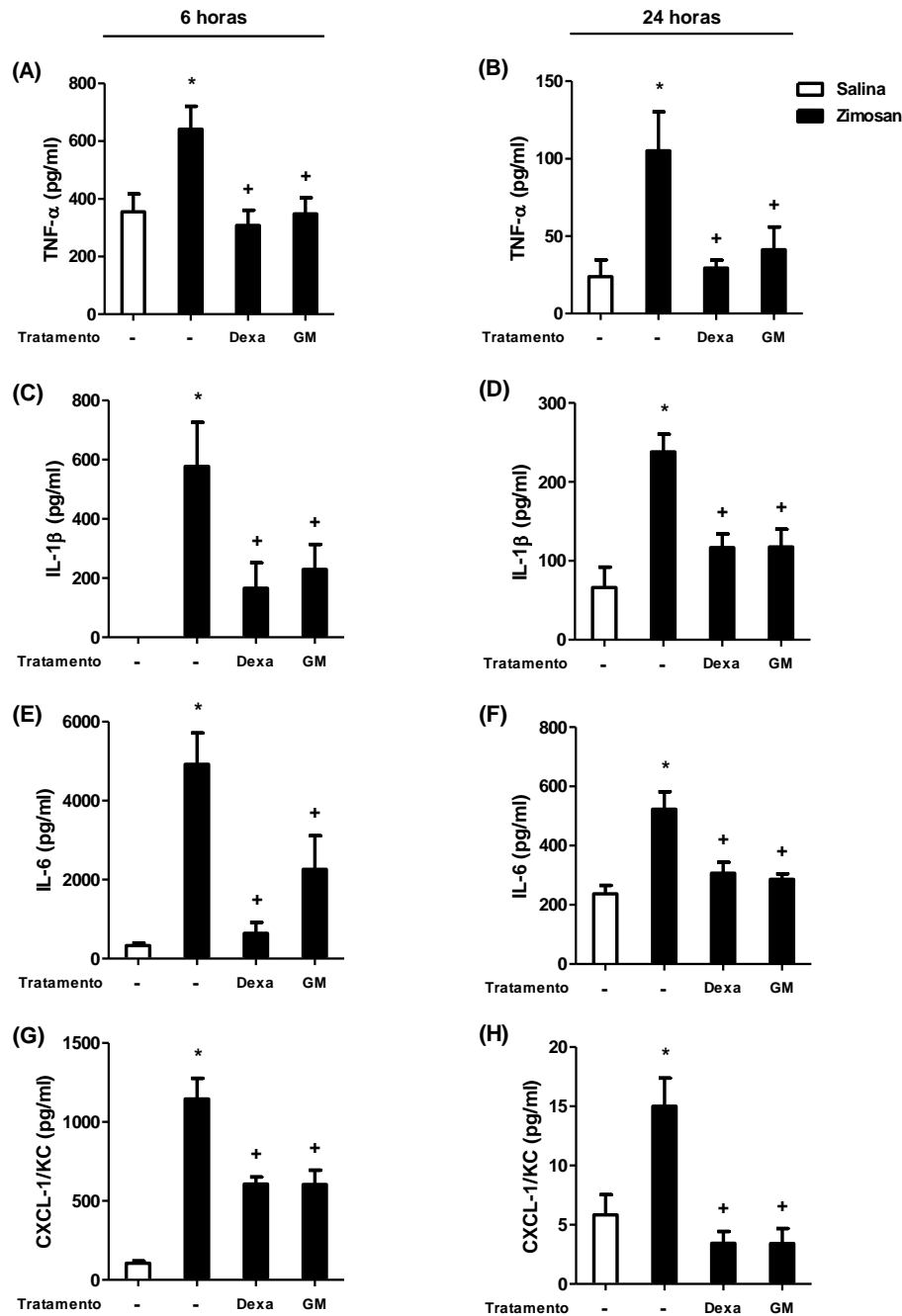


**Figura 4. 7: Histopatologia representativa do efeito do GM sobre a inflamação articular induzida por zimosan 24 horas após o estímulo.** Cortes histológicos longitudinais da articulação fêmuro-tibial de camundongos C57BL/6 injetados i.a. com (A) salina ou (B-D) zimosan (500µg/cavidade). Uma hora antes da i.a. parte dos animais foram tratados oralmente com (D) GM (7 mg/kg) ou (C) dexametasona (10 mg/kg) utilizado com fármaco de referência. (A) Tecido sinovial preservado livre de células inflamatórias (seta preta e insertos) e cartilagem morfologicamente normal. (B) Presença de intenso infiltrado inflamatório (\*) no espaço sinovial (seta preta e insertos). (C) Tecido sinovial apresentando infiltrado inflamatório (\*) e pontos hemorrágicos bastante reduzidos (seta preta e insertos). (D) Presença de células inflamatórias difusas no tecido sinovial (seta preta e insertos). Coloração de Hematoxilina e Eosina. Aumento de 20X e insertes de 100X. C: cartilagem; E: Eritrócitos; ES: Espaço sinovial; LP: Ligamento patelar; TS: tecido sinovial.

#### **4.4 EFEITO DO GALATO DE METILA NOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS PRESENTES NA ARTRITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ZIMOSAN**

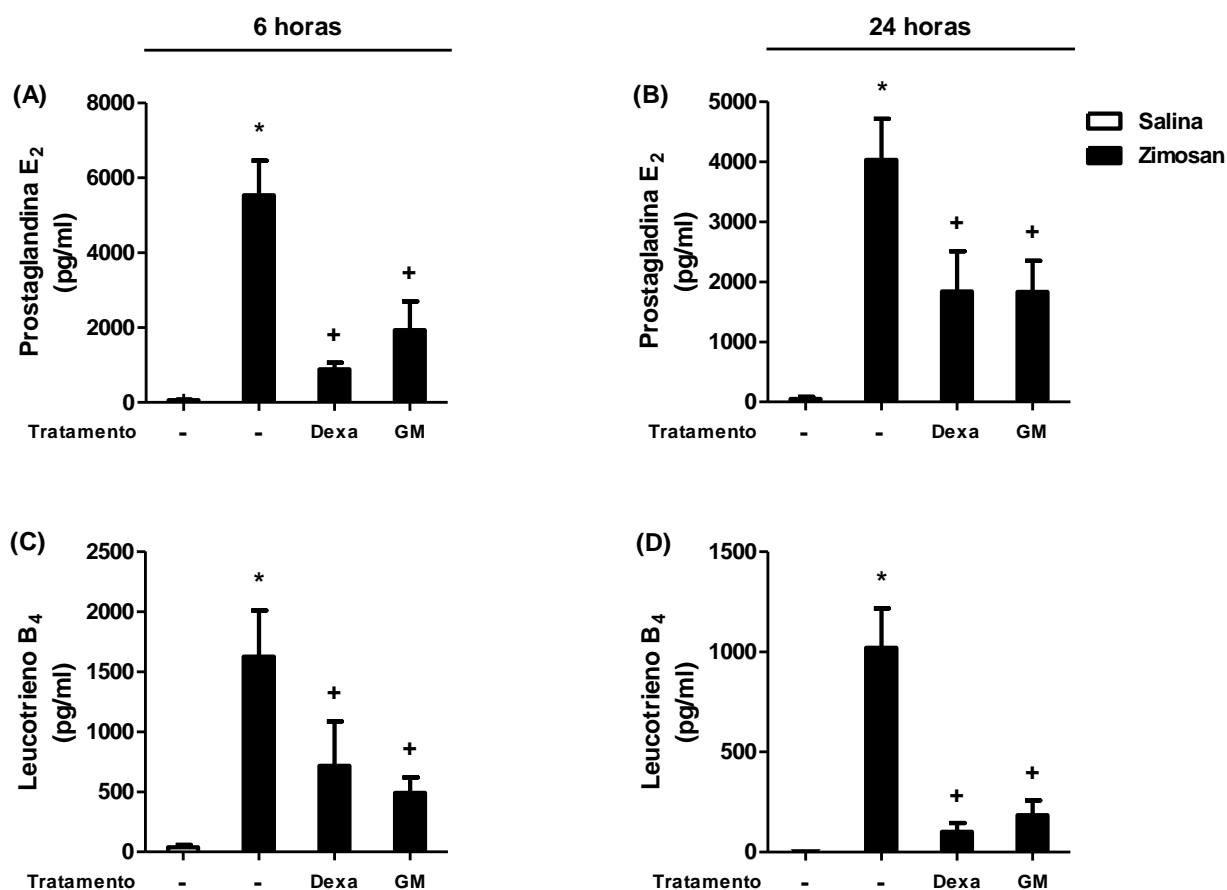
Mediadores inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, LTB<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub> estão diretamente envolvidos na patogênese da artrite reumatoide (Arend, 2001; Deng e Lenardo, 2006; Brennan e McInnes, 2008). Fomos então investigar o efeito do tratamento com o GM na produção destes mediadores durante a artrite experimental murina.

Como pode ser observado na **Figura 4. 8** o estímulo intra-articular com zimosan induziu um aumento na produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 e da quimiocina CXCL-1/KC tanto em 6 quanto em 24 horas de reação. O pré-tratamento com a dexametasona foi capaz de inibir a produção de todos os mediadores estudados em ambos os tempos avaliados (**Figura 4. 8 A-H**). O pré-tratamento com o GM foi capaz de reduzir significativamente as concentrações de TNF- $\alpha$  (**Figura 4. 8 A e B**), IL-1 $\beta$  (**Figura 4. 8 C e D**), IL-6 (**Figura 4. 8 E e F**) e de CXCL-1/KC (**Figura 4. 8 G e H**) de forma similar ao inibidor de referência.



**Figura 4. 8: Efeito do pré-tratamento com o GM sobre a produção de mediadores inflamatórios na artrite experimental.** A artrite foi induzida através da injeção intra-articular (i.a.) de zimosan (500  $\mu$ g/cavidade; 25  $\mu$ L) 1 hora após o pré-tratamento oral com o GM (7 mg/kg) ou com o fármaco de referência dexametasona (10 mg/kg; i.p.). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume i.a. de salina estéril (25  $\mu$ L). A quantificação da concentração das citocinas TNF- $\alpha$  (A e B), IL-1 $\beta$  (C e D), IL-6 (E e F) e da quimiocina CXCL-1/KC (G e H) foram realizados 6 e 24 horas após o estímulo com zimosan por ELISA. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de um grupo de no mínimo 6 animais por experimento e são representativos de dois experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas  $p \leq 0,05$  (teste *one-way* ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*) comparado com o grupo controle salina foram representadas por (\*), ao passo que comparado com o grupo estimulado com zimosan foram representadas por (+).

Na **Figura 4. 9** podemos observar que a injeção i.a. de zimosan induziu um aumento na produção de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> 6 e 24 horas após o estímulo. A administração oral de GM (7 mg/kg) reduziu significativamente a produção de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub>, em ambos os tempos estudados, semelhante a dexametasona (**Figura 4. 9 A-D**).



**Figura 4. 9: Efeito do pré-tratamento com o GM sobre a produção de mediadores lipídicos na artrite experimental.** A artrite foi induzida através da injeção intra-articular (i.a.) de zimosan (500 µg/cavidade; 25 µL) 1 hora após o pré-tratamento oral com o GM (7 mg/kg) ou com o fármaco de referência dexametasona (10 mg/kg; i.p.). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume i.a. de salina estéril (25 µL). A quantificação da concentração dos mediadores lipídicos PGE<sub>2</sub> (A e B) e LTB<sub>4</sub> (C e D) foram realizados 6 e 24 horas após o estímulo com zimosan por EIA. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de um grupo de no mínimo 6 animais por experimento e são representativos de dois experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas  $p \leq 0,05$  (teste *one-way* ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*) comparado com o grupo controle salina foram representadas por (\*), ao passo que comparado com o grupo estimulado com zimosan foram representadas por (+).

#### 4.5 EFEITO DO GALATO DE METILA EM NEUTRÓFILOS MURINOS *IN VITRO*

Com o objetivo de estudar o efeito do GM *in vitro* foi realizado inicialmente um ensaio de citotoxicidade celular em neutrófilos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6. A viabilidade celular dessas células foi avaliada pelo método de quantificação da lactato desidrogenase (LDH), que é uma enzima oxidorreductase citosólica estável que catalisa a conversão de lactato a piruvato. Os neutrófilos foram incubados com diferentes concentrações do GM (0,01 – 100  $\mu\text{M}$ ) durante 2 horas, em seguida, o sobrenadante das células foram recolhidos para quantificação da LDH. Neste estudo foram consideradas não citotóxicas as concentrações que induzem até 10% de morte celular. Como pode ser observado na **Tabela 4. 1** o GM não induziu morte celular acima ou igual a 10%, não sendo citotóxico em nenhuma das concentrações testadas.

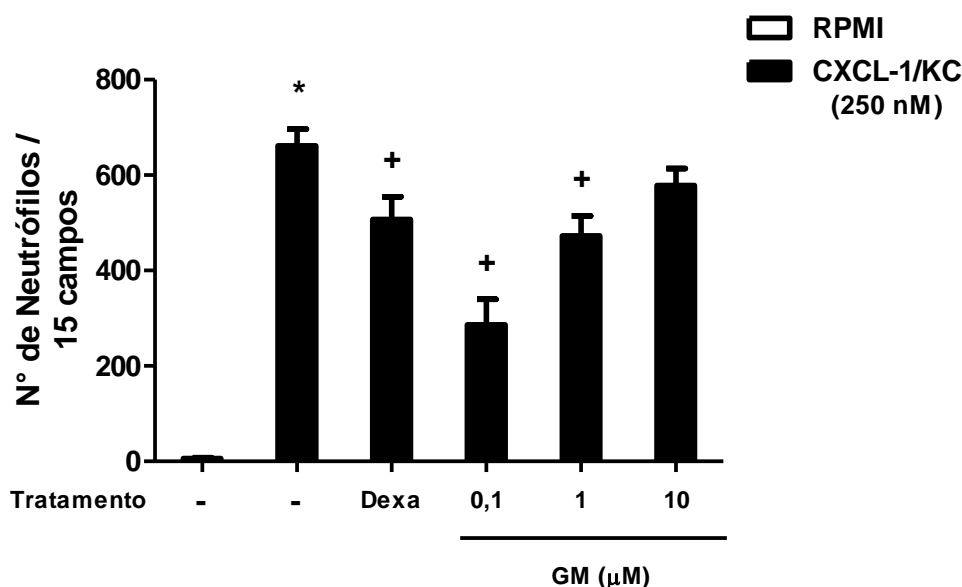
**Tabela 4. 1: Efeito do GM na viabilidade de neutrófilos murinos**

	Controle	GM 0,01 $\mu\text{M}$	GM 0,1 $\mu\text{M}$	GM 1 $\mu\text{M}$	GM 10 $\mu\text{M}$	GM 100 $\mu\text{M}$
Viabilidade dos neutrófilos (%)	100	100	100	100	100	92

Os resultados são expressos como porcentagem (%) de células viáveis. O ensaio foi realizado em quadruplicata por grupo contendo  $1 \times 10^5$  células/poço incubadas com diferentes concentrações do GM por 2 horas (37° C, 5%  $\text{CO}_2$ ). A porcentagem de células viáveis foi calculada a partir do *kit In Vitro Toxicology Assay, Lactic Dehydrogenase*.

O efeito direto do GM na migração dos neutrófilos foi avaliado num ensaio de quimiotaxia *in vitro* em câmara de Boyden. Neste ensaio foi utilizado como estímulo quimiotático a quimiocina CXCL-1/KC. Os neutrófilos da medula óssea de camundongos foram pré-incubados com diferentes concentrações do GM (0,1 – 10  $\mu\text{M}$ ) durante 1 hora em atmosfera controlada. Em seguida, foram distribuídos nos poços superiores da câmara de Boyden onde foi induzida a migração por CXCL-1/KC (250 nM), presente nos poços inferiores. De acordo com a **Figura 4. 10** a CXCL-1/KC induziu quimiotaxia nos neutrófilos. A migração dos neutrófilos, pela membrana da câmara de Boyden, foi reduzida quando essas células foram pré-tratadas com dexametasona. Observou-se também uma redução significativa da quimiotaxia em neutrófilos pré-incubados com o GM nas concentrações de 0,1 e 1  $\mu\text{M}$ . De

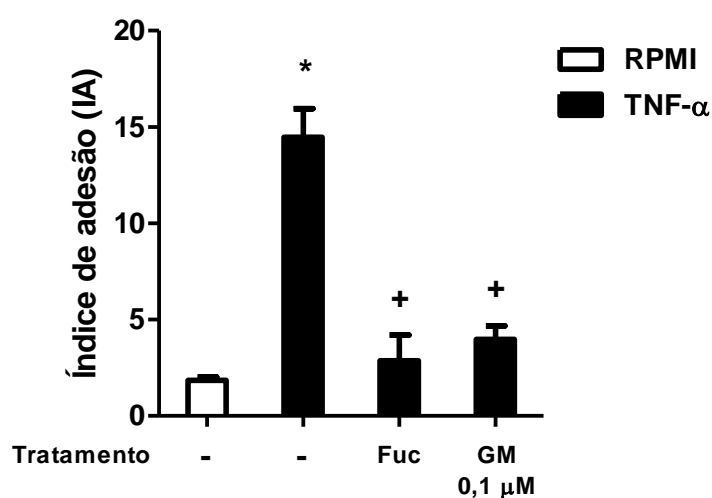
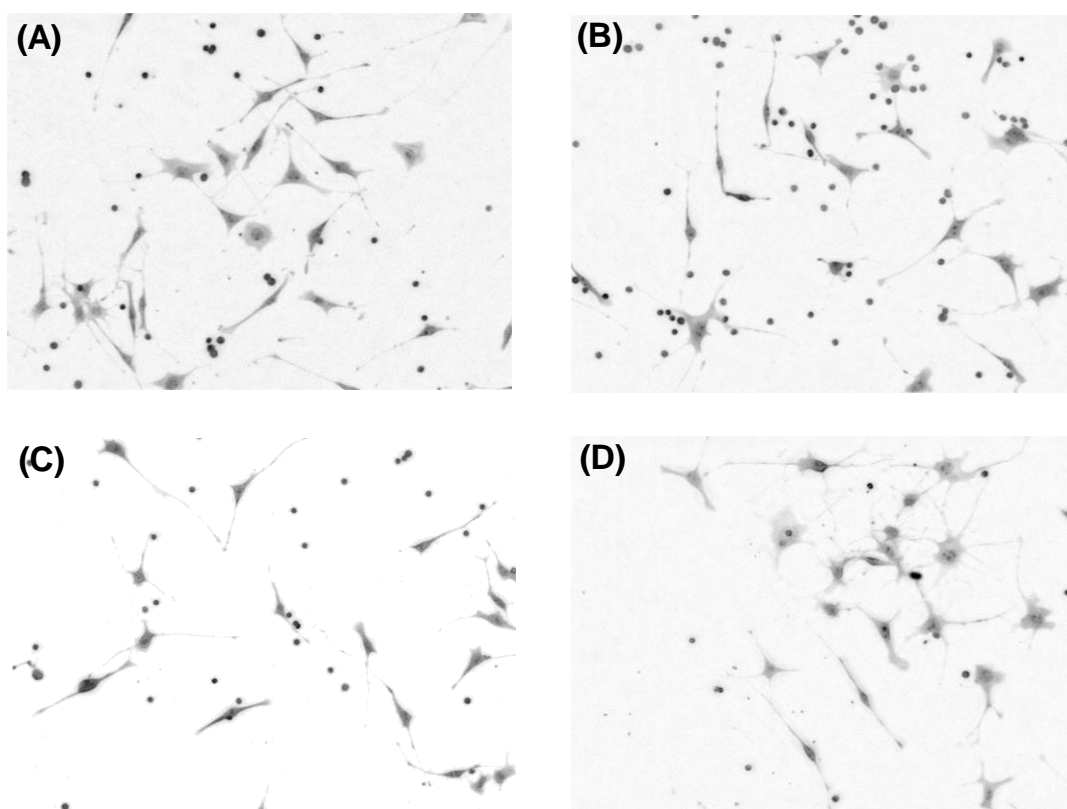
forma interessante observamos que a inibição da quimiotaxia foi inversamente proporcional à concentração do GM.



**Figura 4. 10: Efeito do GM na quimiotaxia de neutrófilos murinos.** Os neutrófilos foram isolados da medula óssea de camundongos C57BL/6 e foram pré-incubados durante 1 hora com RPMI, diferentes concentrações do GM (0,1 μM, 1 μM e 10 μM) ou com o fármaco de referência dexametasona (50 nM). Em seguida, foram submetidos ao ensaio de quimiotaxia sendo estimulados com CXCL-1/KC (250 nM) durante 1 hora em atmosfera controlada (37° C, 5% de CO<sub>2</sub>). Os poços controle continham RPMI. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de dois experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas  $p \leq 0,05$  (teste *one-way* ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*) comparado com o grupo controle RPMI foram representadas por (\*), ao passo que comparado com o grupo estimulado com CXCL-1/KC foram representadas por (+).

Avaliamos em seguida o efeito do GM na adesão de neutrófilos nas células endoteliais estimuladas por TNF- $\alpha$ , o que resulta na expressão de moléculas de adesão e produção de quimiocinas que induzem o recrutamento dos neutrófilos para o local da inflamação (Griffin *et al.*, 2012).

Na **Figura 4. 11** podemos observar que os neutrófilos em contato com as células endoteliais estimuladas com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL; 4 horas) tiveram um aumento no índice de adesão em comparação com os neutrófilos que ficaram em contato com células endoteliais não estimuladas (**Figura 4. 11 A e B**). A pré-incubação dos neutrófilos durante 1 hora com o GM (0,1 μM) ou com a fucoidina (25 μg/mL) reduziu significativamente o índice de adesão a células endoteliais estimuladas (**Figura 4. 11 C e D**).



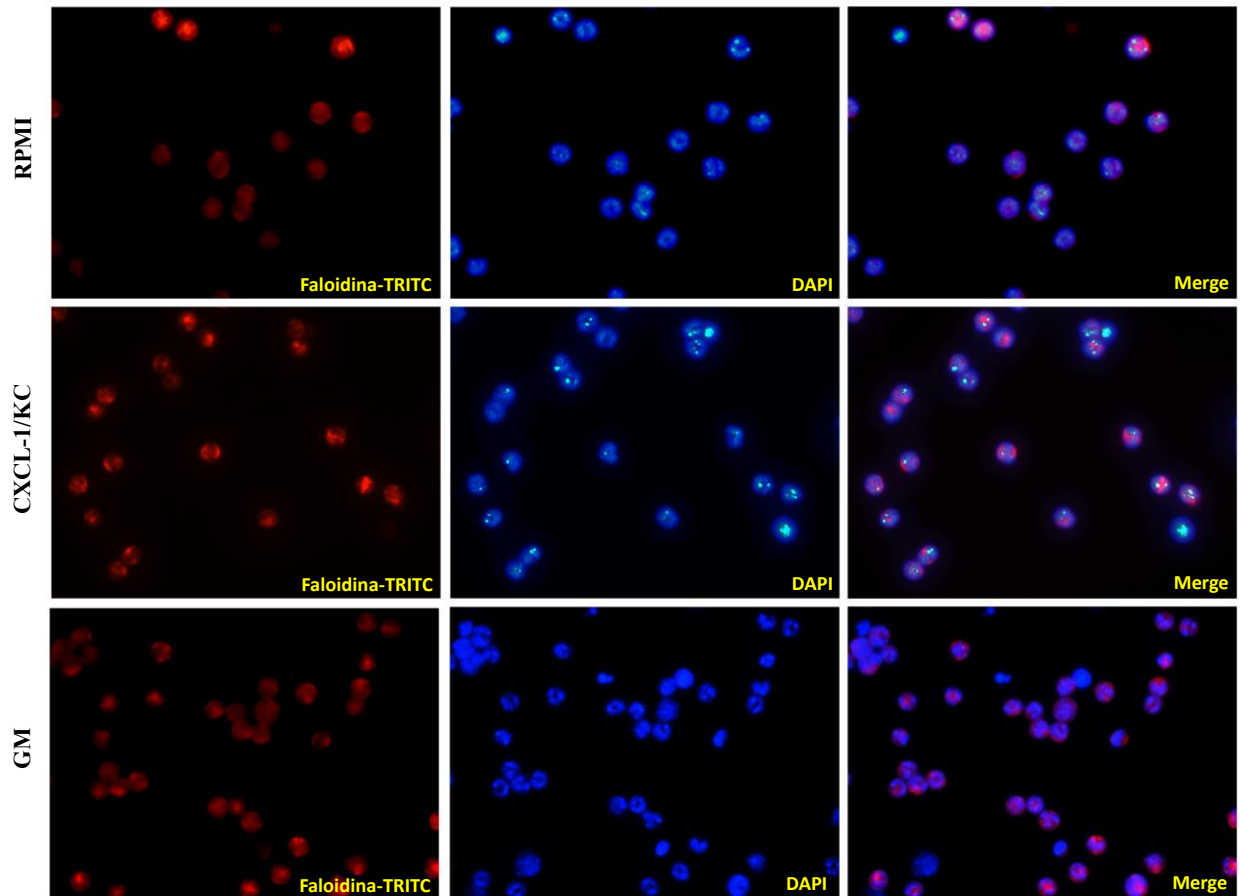
**Figura 4. 11: Efeito do GM na adesão de neutrófilos murinos.** Neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram incubados durante 1 hora com RPMI, GM (0,1  $\mu$ M) ou com fucoidina (25  $\mu$ g/mL). Em seguida, foram colocadas sobre células endoteliais previamente estimuladas com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL; 50 neutrófilos/tEnd.1; 4 horas) durante 1 hora. A adesão foi quantificada por um índice de adesão calculado como demonstrado na metodologia. As fotos representam os grupos: (A) RPMI, (B) TNF- $\alpha$ , (C) Fucoidina e (D) GM. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de dois experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas  $p \leq 0,05$  (teste *one-way* ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*) comparado com o grupo controle RPMI foram representadas por (\*), ao passo que comparado com o grupo estimulado com TNF- $\alpha$  foram representadas por (+).

A polarização dos filamentos de actina controla a direção da migração dos neutrófilos (Wu *et al.*, 2014). Avaliamos neste ensaio o efeito do GM na polimerização dos filamentos de actina induzida por CXCL-1/KC em neutrófilos murinos.

Os neutrófilos da medula óssea de camundongos foram pré-incubados com o GM na concentração de 0,1  $\mu$ M durante 1 hora, e em seguida foram estimulados com CXCL-1/KC (100 nM). As células foram fixadas e processadas para microscopia de fluorescência através da marcação da F-actina por faloidina-TRITC e o núcleo dos neutrófilos por DAPI. As fotos representativas de cada grupo podem ser observadas na **Figura 4. 12**.

Na imagem representativa do grupo RPMI observa-se que a faloidina-TRITC tem uma menor intensidade da fluorescência, além disso, há um pequeno acúmulo da actina na parte central das células. Em comparação, na imagem representativa do grupo CXCL-1/KC pode-se observar uma concentração de actina nas bordas das células e um aumento da intensidade da fluorescência para a marcação da F-actina. O tratamento dos neutrófilos com o GM reduziu a intensidade da fluorescência para a F-actina e pontos centrais de acúmulo da actina podem ser observados com uma maior frequência do que a concentração destes filamentos nas bordas celulares.





**Figura 4. 12: Efeito do GM na polarização dos filamentos de actina nos neutrófilos.** Neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram incubados durante 1 hora com RPMI ou GM (0,1  $\mu$ M). Em seguida, foram estimulados com CXCL-1/KC (100 nM) durante 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de paraformaldeído e as lâminas foram processadas para microscopia de fluorescência. A polimerização de F-actina foi determinada por fluorescência. Os neutrófilos foram marcados com faloidina-TRITC (vermelho) e a contra-coloração nuclear feita pela utilização de DAPI (azul). O material foi observado em microscópio Zeiss Axioplan equipado com epifluorescência.

#### 4.6 EFEITO DO GALATO DE METILA EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM ZIMOSAN

Na sequência, fomos avaliar o efeito do GM em macrófagos que também são células importantes na AR.

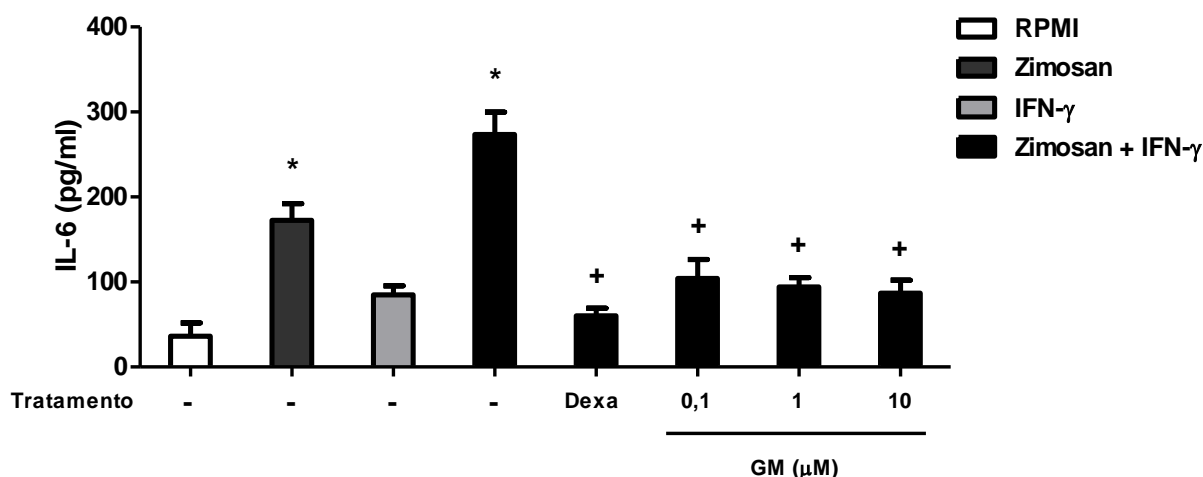
Inicialmente foi realizado um ensaio de citotoxicidade em macrófagos murinos da linhagem J774A.1 através do método de Alamar blue. Os macrófagos foram incubados com o GM em diferentes concentrações (0,01 – 100  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. De acordo com o observado na **Tabela 4.2** o GM não interferiu de forma significativa na viabilidade dos macrófagos em nenhuma das concentrações analisadas.

**Tabela 4. 2: Efeito do GM na viabilidade de macrófagos murinos**

	Controle	GM 0,01 $\mu\text{M}$	GM 0,1 $\mu\text{M}$	GM 1 $\mu\text{M}$	GM 10 $\mu\text{M}$	GM 100 $\mu\text{M}$
Viabilidade dos macrófagos (%)	100	100	100	100	97	95

Os resultados são expressos como porcentagem (%) de células viáveis. O ensaio foi realizado em quadruplicata por grupo contendo  $2,5 \times 10^5$  células/poço incubadas com GM em diferentes concentrações por 24 horas (37° C, 5%  $\text{CO}_2$ ). A porcentagem de células viáveis foi avaliada usando o método de *Alamar blue*.

Em seguida, avaliamos o efeito do GM na produção da citocina IL-6. Os macrófagos foram pré-tratados com o GM (0,1 – 10  $\mu\text{M}$ ) ou com dexametasona (1  $\mu\text{M}$ ) durante 1 hora, e depois estimulados com zimosan e/ou IFN- $\gamma$  por 24 horas. Na **Figura 4. 13** podemos observar que os macrófagos estimulados apenas com zimosan tiveram um aumento significativo na produção de IL-6 em comparação ao controle (células com RPMI), porém o mesmo não foi observado para as células estimuladas somente com IFN- $\gamma$ . Já nos macrófagos estimulados com zimosan e IFN- $\gamma$  a produção de IL-6 foi ainda mais elevada. O pré-tratamento dos macrófagos com o GM foi capaz de diminuir significativamente a produção da IL-6 em todas as concentrações utilizadas assim como a dexametasona.

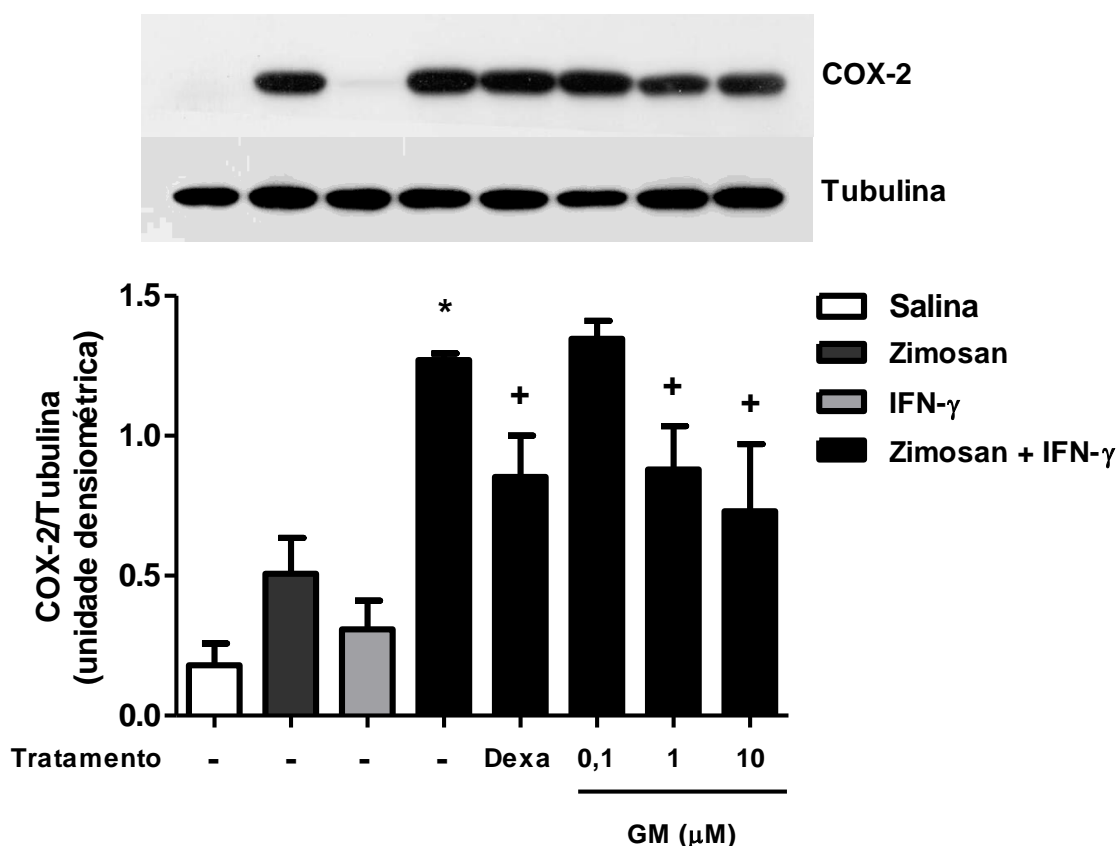


**Figura 4. 13: Efeito do GM na produção de IL-6 em macrófagos murinos J774A.1.** Os macrófagos foram pré-tratados durante 1 hora com RPMI, diferentes concentrações do GM (0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ ) ou com o fármaco de referência dexametasona (1  $\mu\text{M}$ ). Em seguida, foram estimulados com zimosan (10  $\mu\text{g}/10^5$  células), IFN- $\gamma$  (25 U/mL) ou com zimosan e IFN- $\gamma$  durante 24 horas em atmosfera controlada (37° C, 5% de CO<sub>2</sub>). A quantificação da citocina IL-6 foi realizada utilizando o sobrenadante livre de células através da técnica de ELISA. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas  $p \leq 0,05$  (teste *one-way* ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*) comparado com o grupo controle RPMI foram representadas por (\*), ao passo que comparado com o grupo estimulado com zimosan e INF- $\gamma$  foram representadas por (+).

As ciclooxigenases (COXs) são enzimas que catalisam as etapas sequenciais de síntese dos prostanóides (como a PGE<sub>2</sub>). A COX-2 é uma enzima induzível, cuja expressão está associada com os processos inflamatórios (Dinarello, 2010). Conforme observado anteriormente, o GM foi capaz de reduzir a produção de PGE<sub>2</sub> na artrite induzida por zimosan em camundongos. Fomos então investigar se essa redução seria uma interferência do GM na expressão da enzima COX-2.

Para avaliar o efeito do GM na expressão da COX-2, macrófagos murinos J774A.1 foram previamente incubados com diferentes concentrações do GM (0,1 – 10  $\mu\text{M}$ ) ou com a dexametasona (1  $\mu\text{M}$ ) durante 1 hora. Em seguida, as células foram estimuladas com zimosan e/ou IFN- $\gamma$  por 24 horas. A expressão de COX-2 foi determinada a partir dos extratos celulares. Conforme observado na **Figura 4. 14** apenas o estímulo com zimosan e IFN- $\gamma$  aumentou de forma significativa a expressão da enzima COX-2 quando comparado com os macrófagos não estimulados ou estimulados com zimosan ou IFN- $\gamma$  separadamente. A expressão de COX-2 foi

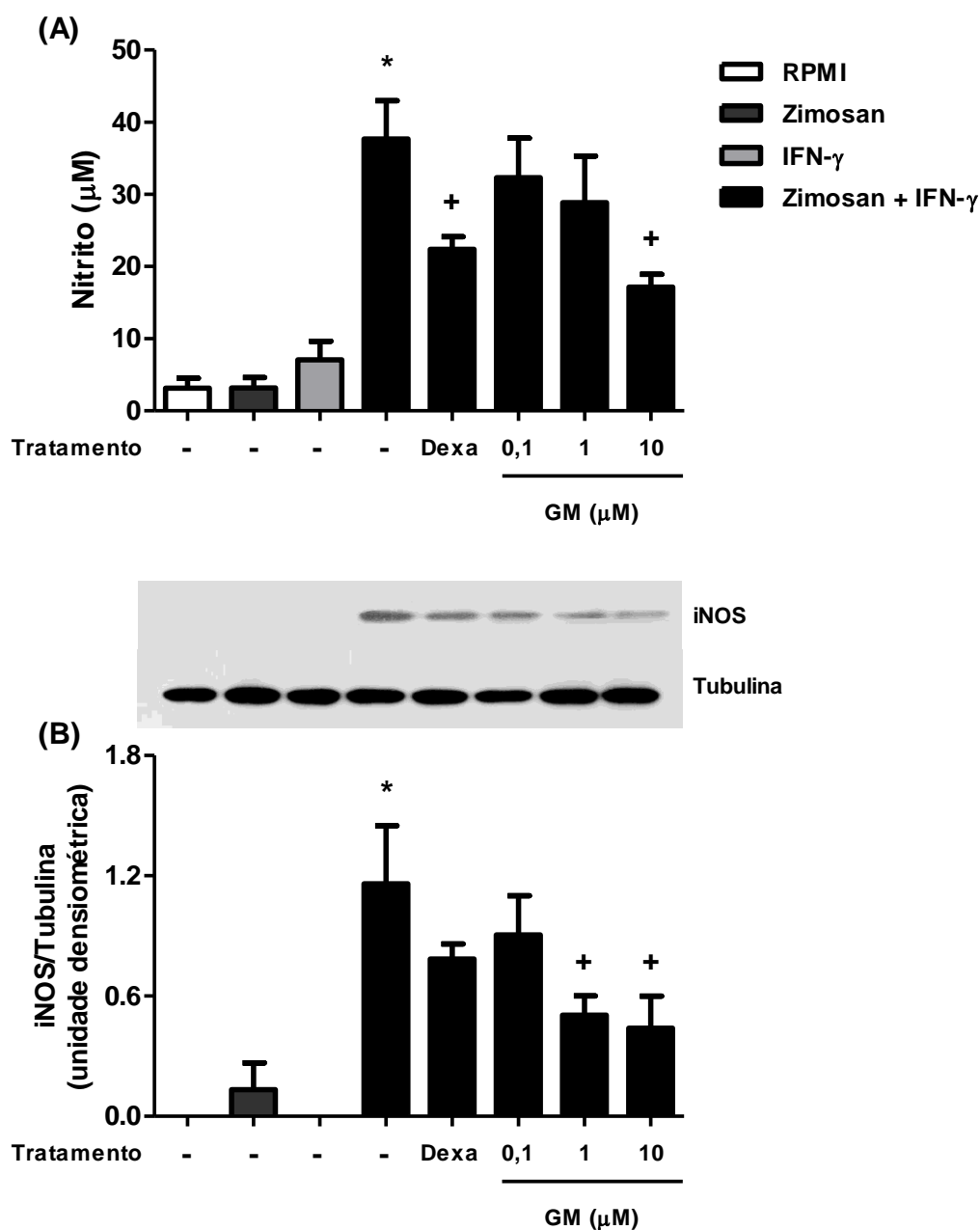
inibida de forma significativa pelo tratamento com a dexametasona. O pré-tratamento com o GM nas concentrações de 1 e 10  $\mu\text{M}$  foi capaz de reduzir a expressão de COX-2.



**Figura 4. 14: Efeito do GM na expressão da enzima COX-2 em macrófagos murinos J774A.1.** Os macrófagos foram pré-tratados durante 1 hora com RPMI, diferentes concentrações do GM (0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ ) ou com o fármaco de referência dexametasona (1  $\mu\text{M}$ ). Em seguida, foram estimulados com zimosan (10  $\mu\text{g}/10^5$  células), IFN- $\gamma$  (25 U/mL) ou com zimosan e IFN- $\gamma$  durante 24 horas em atmosfera controlada (37° C, 5% de  $\text{CO}_2$ ). A expressão de COX-2 foi quantificada a partir dos extratos celulares por *western blot*. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas  $p \leq 0,05$  (teste *one-way* ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*) comparado com o grupo controle RPMI foram representadas por (\*), ao passo que comparado com o grupo estimulado com zimosan e INF- $\gamma$  foram representadas por (+).

Avaliamos o efeito do GM na produção de óxido nítrico (NO) e na expressão da enzima iNOS induzida por zimosan. Macrófagos J774A.1 foram incubados com GM em diferentes concentrações (0,1  $\mu\text{M}$  – 10  $\mu\text{M}$ ) ou com dexametasona (1  $\mu\text{M}$ ) durante 1 hora. Em seguida, as células foram estimuladas com zimosan e/ou IFN- $\gamma$  por 24 horas em atmosfera controlada. A produção de NO foi quantificada pela detecção do nitrito (Giustarini *et al.*, 2008) através da

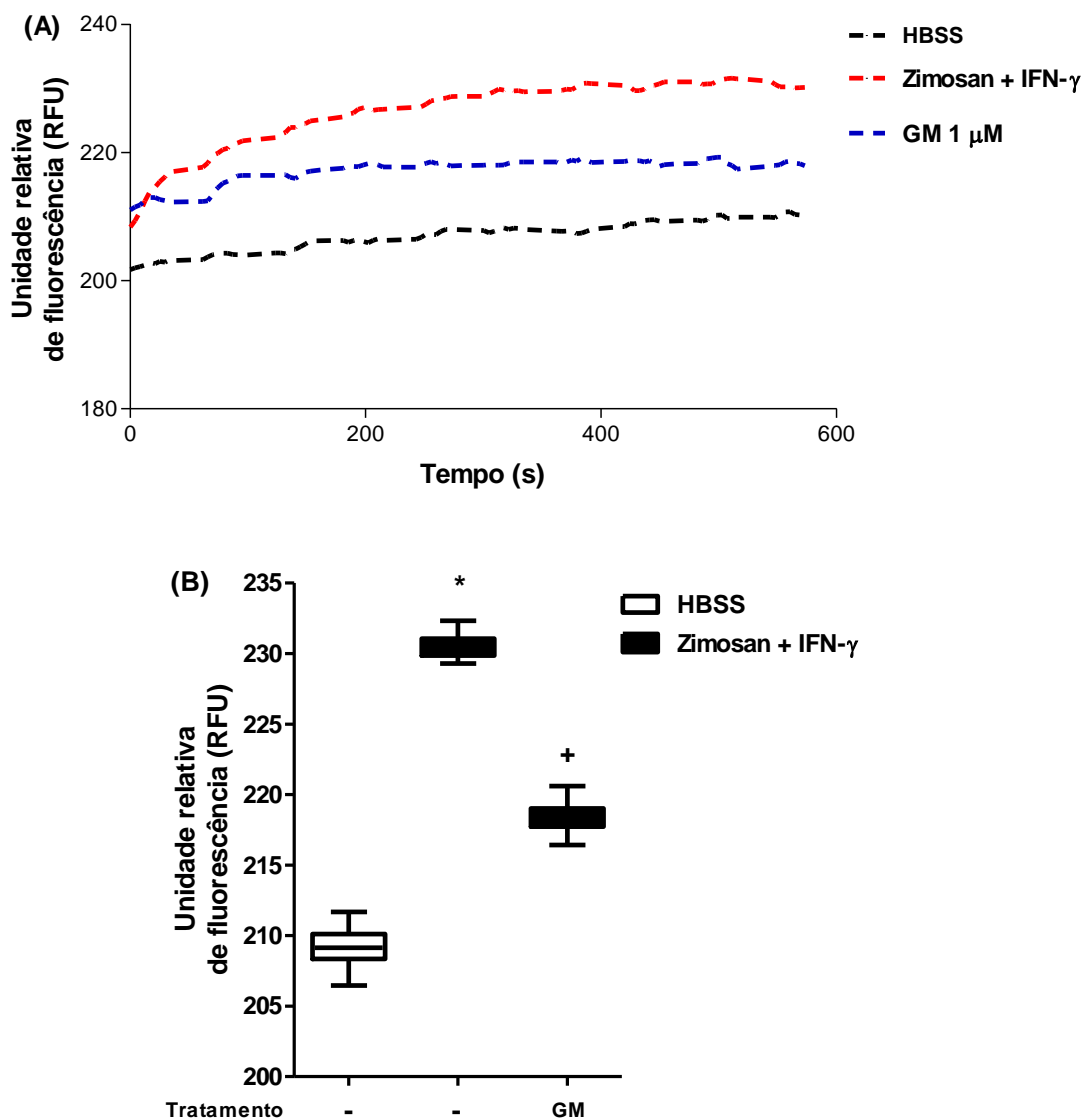
reação de Griess e a expressão da iNOS foi determinada a partir dos extratos celulares por *western blot*. Na **Figura 4. 15 A e B** observa-se que apenas o estímulo com zimosan e IFN- $\gamma$  induziu um aumento na produção de NO e na expressão de iNOS. O pré-tratamento com o GM foi capaz de reduzir significativamente a produção de NO apenas na maior concentração utilizada (10  $\mu$ M). A dexametasona também inibiu significativamente a produção de NO (**Figura 4. 15 A**). Já a expressão de iNOS, foi inibida significativamente pelo GM nas concentrações de 1 e 10  $\mu$ M, enquanto que em células pré-tratadas com a dexametasona, a redução da expressão da enzima não foi estatisticamente significativa (**Figura 4. 15 B**).



**Figura 4. 15: Efeito do GM na produção de NO e na expressão de iNOS em macrófagos murinos J774A.1.** Os macrófagos foram pré-tratados durante 1 hora com RPMI, diferentes concentrações do GM (0,1 µM, 1 µM e 10 µM) ou com o fármaco de referência dexametasona (1 µM). Em seguida, foram estimulados com zimosan (10 µg/10<sup>5</sup> células), IFN-γ (25 U/mL) ou com zimosan e IFN-γ durante 24 horas em atmosfera controlada (37° C, 5% de CO<sub>2</sub>). A quantificação do NO foi realizada utilizando o sobrenadante livre de células através da reação de Griess e a expressão de iNOS foi quantificada a partir dos extratos celulares por *western blot*. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas  $p \leq 0,05$  (teste *one-way* ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*) comparado com o grupo controle RPMI foram representadas por (\*), ao passo que comparado com o grupo estimulado com zimosan e INF-γ foram representadas por (+).

O  $\text{Ca}^{2+}$  é armazenado principalmente no retículo endoplasmático (RE), de onde é liberado quando a célula é estimulada. A liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  é uma importante via de sinalização para ativação de fatores de transcrição nuclear pró-inflamatórios que são regulados através de diversos mensageiros secundários (Dolmetsch, Xu e Lewis, 1998). Como pode ser observado na **Figura 4. 16 A**, a ativação celular mediada pelo estímulo com zimosan e  $\text{IFN-}\gamma$  foi acompanhada por um aumento prolongado na liberação intracelular de cálcio. O GM (1  $\mu\text{M}$ ) reduziu a saída do cálcio dos compartimentos intracelulares para o citoplasma, de forma significativa como é mostrado na **Figura 4. 16 B**.

Em conjunto, os resultados apresentados demonstram que o GM reduz diretamente a ativação dos macrófagos.



**Figura 4. 16: Efeito do GM na liberação intracelular de cálcio em macrófagos murinos J774A.1.**

Os macrófagos foram pré-tratados durante 1 hora com HBSS ou GM (1  $\mu$ M). Em seguida, foram estimulados com zimosan (10  $\mu$ g/ $10^5$  células) e IFN- $\gamma$  (25 U/mL). Os ensaios foram realizados com o *Calcium Assay Kit*, como recomenda o fabricante, e a leitura foi realizada no equipamento Softmax Pro (Molecular Devices). (A) o gráfico demonstra os valores de RFU obtidos durante 600 segundos com leitura realizada a cada 7 segundos. (B) o gráfico demonstra os valores de RFU obtidos entre 360-600 segundos após o estímulo. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de dois experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas  $p \leq 0,05$  (teste *one-way* ANOVA seguido por *Student-Newman-Keuls*) comparado com o grupo controle RPMI foram representadas por (\*), ao passo que comparado com o grupo estimulado com zimosan e INF- $\gamma$  foram representadas por (+).



## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, demonstramos que o galato de metila (GM) um derivado de ácidos fenólicos encontrado em várias espécies de plantas possui um importante efeito anti-inflamatório na reação inflamatória induzida pelo zimosan, sobretudo na artrite experimental. Nossos resultados mostraram que o GM reduz de forma significativa a migração dos neutrófilos, a produção de mediadores inflamatórios e a ativação de células cruciais para o desenvolvimento da doença.

A artrite experimental induzida por zimosan possui características semelhantes com as observadas na AR humana, embora tenha uma menor dependência da resposta imune mediada por linfócitos (Asquith *et al.*, 2009). Dentre as principais características podemos destacar: a formação de edema articular, a infiltração de células para a cavidade sinovial, a produção dos principais mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da doença e a incapacitação articular (da Rocha *et al.*, 2004; Penido *et al.*, 2006; Guerrero *et al.*, 2008).

O zimosan estimula a fagocitose, a produção de citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de induzir a migração de células e o aumento da permeabilidade vascular (Gantner *et al.*, 2003; Yuhki *et al.*, 2008), neste último ocorre o extravasamento de líquido e proteínas do plasma para o tecido induzindo a formação de edema (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). No modelo de edema de pata induzido por zimosan existe o envolvimento das aminas vasoativas, bradicinina, PAF (dados ainda não publicados). Em nosso trabalho, observamos que o pré-tratamento oral com o GM foi capaz de inibir a formação do edema de pata e do extravasamento proteico na pleurisia, ambos induzidos por zimosan (Figuras 4.1 e 4.2). Cavalher-Machado e colaboradores (Cavalher-Machado *et al.*, 2008) relataram que o pré-tratamento de mastócitos com o GM reduziu a liberação de histamina e a degranulação dessas células após o estímulo com C48/80 ou a sensibilização passiva com IgE. Resultados obtidos em nosso laboratório demonstraram que o GM também foi capaz de inibir o edema de pata induzido por histamina, bradicinina e PAF (dados ainda não publicados). Em conjunto,

estes resultados sugerem que o efeito anti-edematogênico do GM pode estar direta ou indiretamente envolvido com a modulação de mediadores lipídicos, bradicinina e histamina na inflamação induzida por zimosan.

O modelo da pleurisia induzida por zimosan é amplamente utilizado na busca de substâncias obtidas de produtos naturais com ação anti-inflamatória (Penido *et al.*, 2006). Neste trabalho, avaliamos a curva dose-resposta usando a pleurisia induzida por zimosan para encontrar uma relação entre efeito farmacológico e dose do GM. A dose eficaz, capaz de reduzir 50% (DE<sub>50</sub>) da infiltração de neutrófilos para a cavidade torácica, foi calculada como sendo de 7 mg / kg (Figura 4.2 D).

A injeção intra-articular de zimosan induziu um aumento no diâmetro da articulação do joelho (edema) na primeira hora após o estímulo e sendo máximo em 24 horas. O pré-tratamento oral com o GM (7 mg/kg) foi capaz de reduzir o edema articular tanto em 6 quanto em 24 horas após o estímulo (Figura 4.4). O aumento do diâmetro articular observado após a injeção do zimosan é o resultado de uma cascata de acontecimentos que inclui a ativação do sistema complemento, a degranulação de mastócitos, a geração de metabólitos do ácido araquidônico como leucotrienos, prostanóides e PAF e a produção de NO (Gegout *et al.*, 1995; da S Rocha *et al.*, 2002; Conte *et al.*, 2008; Dimitrova *et al.*, 2010; Linke *et al.*, 2012).

A administração oral do GM reduziu a produção de PGE<sub>2</sub> na cavidade sinovial em 6 e 24 horas de reação (Figura 4.9 A e B). A inibição da produção de prostaglandina pelo GM também foi relatada por Kim e colaboradores (Kim, S. J. *et al.*, 2006) que demonstraram uma falha na produção de PGD<sub>2</sub> por mastócitos devido a uma redução da atividade da enzima COX-2 pelo GM, mas não pela sua expressão. Diferente do trabalho anteriormente citado, nós observamos que o GM inibe a expressão de COX-2 por macrófagos estimulados *in vitro* (Figura 4.14). A divergência entre os dois resultados pode ser explicada pela diferença dos tipos celulares utilizados nos dois estudos, e também pela diferença dos mediadores utilizados para induzir a expressão da enzima. Além disso, um estudo recente baseado em ligação magnética em combinação com HPLC-DAD-MS demonstrou que o grupamento galoil (presente em algumas catequinas e que apresenta uma maior similaridade estrutural com o GM) tem uma potente capacidade de inibição da atividade de COX-2 semelhante ao celocoxibe (Deng *et al.*, 2014). Em nosso estudo, podemos sugerir que a inibição da produção de PGE<sub>2</sub> *in vivo* é devido à diminuição da expressão da enzima COX-2. Contudo, mais estudos são necessários para afirmar que essa redução também é decorrente da ação do GM sobre a atividade da COX-2.

A resposta inflamatória ao zimosan é mediada por TLR2, que atua em colaboração com TLR6. A ligação do zimosan ao TLR2 induz a ativação de NF- $\kappa$ B, que leva produção de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, TNF e outras, bem como a expressão de moléculas co-estimulatórias e a liberação de ácido araquidônico (Frasnelli *et al.*, 2005; Asquith *et al.*, 2009; Guerrero *et al.*, 2012). A produção desses mediadores inflamatórios no tecido sinovial de pacientes com AR é um processo importante na patogênese da doença (Bingham, 2002; Firestein, 2003). Observamos que a injeção intra-articular de zimosan desencadeou a produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, da quimiocina CXCL-1/KC e dos mediadores lipídicos LTB<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub> em 6 e 24 horas após o estímulo (Figuras 4.8 e 4.9).

Embora existam evidências de que a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  tenham funções independentes nos processos patofisiológicos da AR, alguns relatos afirmam que estas citocinas atuam de uma forma sinérgica (Dayer, 2003). O sinergismo desses mediadores foi ilustrado no modelo animal de artrite induzida por colágeno, onde foi observado que em ratos que receberam IL-1Ra, antagonista do receptor de IL-1, ou anti-TNF- $\alpha$  ocorreu uma fraca inibição da inflamação e reabsorção óssea. Porém, quando os tratamentos foram dados em combinação (IL-1Ra e anti-TNF- $\alpha$ ), a redução da inflamação e destruição articular foi acentuadamente maior (Bendele *et al.*, 2000). Experimentalmente, essas citocinas desempenham um papel crítico na manifestação da hipernocicepção inflamatória em diferentes modelos de artrite experimental (Cunha *et al.*, 2005; Verri *et al.*, 2006). A inibição genética ou farmacológica de TNFR1 e IL-1R1, respectivos receptores de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , reduz a hipernocicepção articular e a migração de neutrófilos no modelo experimental de artrite induzida por antígeno (Cunha *et al.*, 2008; Sachs *et al.*, 2011). A relevância de TNF e IL-1 para o influxo de neutrófilos é consistente com os efeitos conhecidos dessas citocinas em orquestrar a produção de quimioatraentes de neutrófilos e induzir a expressão de moléculas de adesão celular em locais de inflamação (Hickey *et al.*, 1997; Kelly, Hwang e Kubes, 2007). Por outro lado, Sachs e colaboradores (Sachs *et al.*, 2011) demonstraram que o bloqueio da entrada dos neutrófilos ao sítio de inflamação com fucoidina diminuiu a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Então, no modelo de artrite induzida por antígeno, TNF e IL-1 são necessários para um influxo adequado de neutrófilos, mas os neutrófilos também são essenciais para a produção direta ou indireta desses mediadores. Observamos no presente trabalho, que o GM foi capaz de inibir a concentração de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em 6 e 24 horas após o estímulo com zimosan (Figura 4.8 A-D). No entanto é necessário esclarecer se o GM inibe a produção desses mediadores diretamente ou se a diminuição na concentração deles é decorrente da redução do influxo de neutrófilos. De qualquer maneira, a inibição desses mediadores é de

grande importância, uma vez que, nos estudos clínicos, o antagonismo de IL-1 $\beta$  ou o bloqueio de TNF- $\alpha$  reduz os sinais e sintomas da AR e retarda a destruição das articulações, sendo um dos avanços mais significativos no tratamento da AR (Cohen *et al.*, 2002; Caporali *et al.*, 2011; Lama e Saikia, 2011; Tak e Kalden, 2011).

A IL-6 é um mediador de funções pleiotrópicas, incluindo efeitos sobre a maturação e ativação de macrófagos, osteoclastos, condrócitos e células endoteliais. A ausência de IL-6 protege camundongos da artrite induzida por colágeno, e a neutralização da IL-6 utilizando anticorpos específicos atenua a doença (Rose-John, 2012). A prova central do papel crítico da IL-6 na patogênese da artrite reumatoide foi demonstrada em ensaios clínicos e em modelos experimentais de artrite onde a depleção ou a utilização de anticorpos específicos anti-IL-6 suprimiram a atividade e progressão da erosão articular durante a artrite (Alonzi *et al.*, 1998; Nishimoto *et al.*, 2004; Richards *et al.*, 2006). O pré-tratamento oral com o GM foi responsável por um decréscimo significativo na produção de IL-6 em 6 e 24 horas após a inflamação articular induzida por zimosan (Figura 4.8 E e F). Como a IL-6 é uma das principais citocinas produzidas pelos sinoviócitos do tipo B (Firestein, 2005), a redução da produção desse mediador pode ser um indicativo de que o GM atue na ativação dessas células ou pode ser devido a um efeito indireto, uma vez que, o GM atua diretamente em outros eventos inflamatórios.

Dentro das articulações inflamadas de pacientes com AR, a concentração de LTB<sub>4</sub> está correlacionada com a gravidade da doença e os leucócitos expressam altos níveis de BLT1 (receptor do LTB<sub>4</sub>) no fluido sinovial (Hashimoto *et al.*, 2003; Kim, N. D. *et al.*, 2006). Essas evidências sugerem que esse mediador contribui para a sinovite característica da AR através do recrutamento de leucócitos para a cavidade articular. Na artrite induzida por zimosan, foi demonstrada uma liberação significativa de LTB<sub>4</sub> logo na primeira hora após a injeção do estímulo (da Rocha *et al.*, 2004). Uma vez que, o influxo de células para a articulação estimulada com zimosan é significativo a partir da segunda hora após a injeção i.a. de zimosan é evidente que a produção de LTB<sub>4</sub> precede o influxo de neutrófilos. No entanto, o tratamento dos animais com fucoidina ou com um anticorpo anti-neutrófilos inibiu a produção de LTB<sub>4</sub> induzida por zimosan na articulação 7 horas após o estímulo (Guerrero *et al.*, 2008). Esses relatos sugerem que células residentes, tais como os sinoviócitos são as responsáveis pela liberação imediata de LTB<sub>4</sub>, mas os neutrófilos são responsáveis pela produção posterior desse mediador. Os nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com o GM reduziu de forma significativa a concentração de LTB<sub>4</sub> na articulação sinovial 6 e 24 horas após a injeção de

zimosan (Figura 4.9 C e D). Porém, como nós não avaliamos se o GM reduz a produção desse mediador logo na primeira hora após o estímulo, não podemos afirmar que essa substância interfere diretamente na produção do LTB<sub>4</sub> pelas células residentes. A inibição da concentração de LTB<sub>4</sub> pelo GM pode ser uma consequência da inibição do influxo de neutrófilos para a articulação estimulada.

A molécula quimiotática CXCL-8/IL-8 (homólogo murino CXCL-1/KC), é uma das mais abundantes quimiocinas presente no fluido sinovial de pacientes com AR e sua expressão no tecido sinovial está associada com a atividade da doença (Kraan *et al.*, 2001). No modelo murino de artrite inflamatória K/BxN, foi observado que o receptor CXCR2 (receptor de CXCL-1/KC) é crítico para a manutenção da inflamação na artrite. Chou e colaboradores (Chou *et al.*, 2010) também demonstraram que existe uma diferença na requisição dos receptores BLT1 e CXCR2. Durante o curso da artrite inflamatória, BLT1 é internalizado em polimorfonucleares (PMNs) após a ligação do LTB<sub>4</sub> (Chen *et al.*, 2006). Em contraste, ocorre um aumento na expressão de CXCR2 nessas células presentes na articulação após o início da inflamação articular. Tais informações são consistentes com relatos que mostram que o CXCL-1/KC tem um papel importante no recrutamento dos PMNs em tempos tardios enquanto que o LTB<sub>4</sub> participa mais ativamente do recrutamento de PMNs nos momentos iniciais da reação (Sadik, Kim e Luster, 2011). Nossos resultados demonstraram um aumento importante da concentração de CXCL-1/KC na articulação sinovial 6 e 24 horas após o estímulo com zimosan (Figura 4.8 G e H), que está correlacionado com a migração massiva dos neutrófilos para o tecido articular. O GM foi capaz de reduzir a produção desse mediador tanto em 6 quanto em 24 horas. É provável que a inibição do influxo de neutrófilos para a sinóvia ocasionada pelo GM está relacionada com a redução na produção de CXCL-1/KC no sítio inflamatório.

O estímulo i.a. de zimosan levou a um aumento acentuado no número de leucócitos, principalmente de neutrófilos e uma quantidade menor, porém significativa, de células mononucleares no espaço articular (Figura 4.5). Os neutrófilos são as células mais abundantes presentes no fluido sinovial de pacientes com AR. Essas células amplificam as respostas inflamatórias e contribuem para a perpetuação da inflamação nas articulações (Cross *et al.*, 2005). A ativação dos neutrófilos induz à reorganização do citoesqueleto, a liberação do conteúdo dos seus grânulos, a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, a produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e mediadores lipídicos, e ao aumento da fagocitose (Casção *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2010; Németh e Mócsai, 2012). Recentemente, Suo e colaboradores (Suo *et al.*, 2014) demonstraram que a depleção ou inibição das funções

dos neutrófilos levou a uma redução significativa da formação de edema, 2-8 horas após a injeção de zimosan.

No presente trabalho, demonstramos que o pré-tratamento com o GM reduziu o acúmulo de leucócitos na cavidade articular após o estímulo com zimosan. O efeito observado na redução do número de células foi principalmente devido à redução do acúmulo dos neutrófilos para a cavidade, o que foi confirmado através da análise histopatológica do tecido da articulação fêmuro-tibial (Figuras 4.5, 4.6 e 4.7). Contudo, também observamos uma diminuição significativa no infiltrado de células mononucleares para a articulação sinovial 6 e 24 horas após a indução da artrite (Figura 4.5 E e F).

Para esclarecer se o GM inibe diretamente a migração dos neutrófilos, realizamos um ensaio de quimiotaxia, onde observamos que o GM foi capaz de reduzir de forma significativa a migração dos neutrófilos na presença da quimiocina CXCL-1/KC (Figura 4.10). O KC induz a quimiotaxia dos neutrófilos através da sua ligação os receptores de sete domínios transmembranares (CXCR1 e CXCR2) localizados na superfície dos neutrófilos (Wu *et al.*, 2014). Esses receptores são acoplados à proteína G (GPCRs), que são compostos pelas subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . A subunidade  $G\beta\gamma$  ativa fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) que conduz à fosforilação de fosfoinosítídeo (PI) para formar PI-trifosfato (PI3P), que por sua vez ativa a proteína quinase B (Akt/PKB), bem como GTPases (Futosi, Fodor e Mócsai, 2013). Essa sinalização regula a polimerização de F-actina que controla a migração dos neutrófilos (Stillie *et al.*, 2009). Um estudo recente mostrou que o GM reduziu significativamente a migração de células do glioma através da inibição da fosforilação de Akt e da formação de adesão focal. Com base nesses dados, nós hipotetizamos que o GM pode interferir na via de sinalização dos GPCRs, tais como CXCR1/CXCR2.

Para comprovar essa hipótese nós realizamos um ensaio de adesão celular uma vez que, a via de sinalização intracelular dos GPCRs ativam integrinas de superfície que participam da cascata de adesão dos neutrófilos (Dimasi, Sun e Bonder, 2013). Avaliamos também a polimerização dos filamentos de actina, pois esse evento é crucial para a reorganização do citoesqueleto dos neutrófilos durante o recrutamento que é dependente da ativação dos receptores de quimiocinas, tal como o CXCR1/CXCR2 (Chodniewicz e Zhelev, 2003). Observamos que o tratamento dos neutrófilos com o GM inibiu sua adesão às células endoteliais ativadas com TNF- $\alpha$  (Figura 4.11). O GM também foi capaz de reduzir a formação da F-actina nos neutrófilos estimulados com CXCL-1 (Figura 4.12). Esses resultados suportam a hipótese

de que o GM pode estar interferindo na via de sinalização do receptor CXCL-1, impedindo assim a ativação, a migração e a expressão de moléculas de adesão nos neutrófilos, conseqüentemente, impedindo a entrada dessas células aos locais de inflamação como na cavidade pleural e na sinóvia.

O reconhecimento do zimosan por macrófagos residentes na sinóvia (sinoviócitos do tipo A), através do receptor TLR2 e dectina-1, é o primeiro passo da resposta inflamatória que ocorre no modelo de inflamação articular estudado nesse trabalho (Pettipher e Salter, 1996; Young *et al.*, 2001). Como mencionado anteriormente, a sinalização intracelular ativada por TLR2 conduz a ativação de NF- $\kappa$ B que desencadeia a produção de mediadores inflamatórios e a expressão de COX-2 e iNOS. A sinalização de dectina-1 estimula o influxo de cálcio através da ativação da fosfolipase C $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) e também ativa NF- $\kappa$ B e MAPK (Kelly, Wang e Ivashkiv, 2010). Com o objetivo de avaliar a regulação da ativação de macrófagos pelo GM, nós avaliamos a produção da citocina IL-6 e NO, a expressão das enzimas COX-2 e iNOS e a mobilização intracelular de cálcio nessas células.

Classicamente a ativação de macrófagos induzida pela combinação de um ligante de *Toll* com IFN- $\gamma$  levam à expressão de um conjunto único de genes que originam um fenótipo pró-inflamatório. Caracteristicamente, essas células produzem citocinas como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12 em quantidades elevadas e regulam positivamente o MHC de classe II e CD86, que facilitam a apresentação de antígenos (Sharif *et al.*, 2007; Drexler *et al.*, 2008). O estado de ativação pró-inflamatório de macrófagos pode ser ainda reforçado, através da alta afinidade do receptor Fc $\gamma$ RI em resposta a imunocomplexos (Mosser e Edwards, 2008). Em adição, macrófagos ativados classicamente produzem espécies reativas de oxigênio como o NO por meio da enzima óxido nítrico sintase 2 (NOS2/iNOS) estimulando células T para o fenótipo de Th1 ou Th2 (Edwards *et al.*, 2006). Como o macrófago é a principal célula que produz mediadores inflamatórios na articulação avaliamos inicialmente se o GM seria capaz de inibir a produção da citocina IL-6. O tratamento de macrófagos estimulados com zimosan e IFN- $\gamma$  com o GM foi capaz de inibir significativamente a produção de IL-6 *in vitro* (Figura 4.13).

O óxido nítrico é sintetizado a partir da catalise da L-arginina pela óxido nítrico sintase (NOS), e exerce um importante papel na regulação de muitas funções fisiológicas (Coleman, 2001). Entretanto, a produção exacerbada de NO pode aumentar a gravidade das doenças autoimunes (Sharma, Al-Omran e Parvathy, 2007). Os efeitos deletérios atribuídos ao NO tem sido associados com a geração de espécies reativas de nitrogênio, formadas após a liberação

deste mediador. Isso pode ocorrer por combinação do NO com outras substâncias, incluindo espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido (Halliwell, Zhao e Whiteman, 1999). No modelo experimental de artrite induzido pelo zimosan foi observado que há uma produção de NO no líquido sinovial dos camundongos, que foi máxima em 6 horas após a injeção i.a. de zimosan (da S Rocha *et al.*, 2002). Essa liberação foi associada com a intensa migração de neutrófilos para a cavidade sinovial, sugerindo que essas células estão associadas com a produção desse mediador no ambiente articular. Um aumento da expressão da iNOS na sinóvia inflamada, particularmente nos sinoviócitos e nos neutrófilos, também contribuem para essa liberação (Bezerra *et al.*, 2004). No presente trabalho nós observamos uma redução significativa da produção de NO por macrófagos estimulados com zimosan e INF- $\gamma$  *in vitro* e na expressão da iNOS por estas células. Observamos que a redução da produção de NO está associada a uma diminuição na expressão da iNOS pelo GM (Figura 4.15). Com base nesses resultados é possível sugerir que o GM inibe a produção de NO pelos sinoviócitos do tipo A na articulação inflamada, entretanto maiores estudos são necessários para afirmar que essa inibição também ocorre diretamente nos neutrófilos.

Os íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) são mensageiros intracelulares versáteis em células eucarióticas que regulam muitos processos celulares incluindo, o ciclo celular, o sistema de transportes, a mobilidade, a expressão gênica e o metabolismo da célula (Domínguez, Guragain e Patrauchan, 2015). O estímulo de macrófagos com zimosan e IFN- $\gamma$  desencadeou uma rápida mobilização de cálcio dos compartimentos intracelulares para o citosol da célula. Nossos resultados demonstram claramente que a ativação mediada por zimosan e IFN- $\gamma$  foi acompanhada por um aumento prolongado no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , o pré-tratamento dos macrófagos com o GM (1  $\mu\text{M}$ ) inibiu o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Figura 4.16). A presença de cálcio é essencial para a ação da enzima  $\text{PLA}_2$  (Berg *et al.*, 2001). O  $\text{Ca}^{2+}$  livre no citosol se liga ao sítio catalítico das  $\text{PLA}_2$  para que estas liberem o ácido araquidônico dos fosfolipídios de membrana e desta forma ocorre a biossíntese dos eicosanoides (Burke e Dennis, 2009). A redução da mobilização intracelular de cálcio pelo GM pode reduzir a atividade das  $\text{PLA}_2$ , conseqüentemente diminuindo a liberação do ácido araquidônico. Este mecanismo pode ser o responsável pela a redução da produção de  $\text{PGE}_2$  e  $\text{LTB}_4$  no fluido sinovial dos camundongos tratados com o GM e estimulados com zimosan.

São várias as evidências que tornam os macrófagos alvos terapêuticos atrativos tais como: (1) a correlação entre a progressão radiológica da destruição articular e o grau de infiltração de macrófagos sinoviais (Mulherin, Fitzgerald e Bresnihan, 1996); (2) a eficácia da



terapia antirreumática convencional que está de acordo com o conhecimento crescente dos efeitos específicos de tais drogas em macrófagos (Bondeson, 1997; Lavagno *et al.*, 2004); (3) a eficácia de terapias biológicas dirigidas a citocinas produzidas predominantemente por macrófagos (Bresnihan *et al.*, 1998; Feldmann *et al.*, 2005); (4) e ainda a ativação diferencial de vias intracelulares de transdução de sinais que estão relacionadas a diferentes funções efetoras dos macrófagos, podem levar à produção de inibidores mais específicos de enzimas metabólicas essenciais ou vias particulares de transdução de sinal como alvos seletivos da terapia antirreumática (Sweeney e Firestein, 2004; Westra *et al.*, 2004).

Este conjunto de resultados demonstra que o GM apresenta um efeito direto em neutrófilos e na modulação de funções dos macrófagos. Isso está de acordo com estudos que relatam que substâncias de origem natural apresentam múltiplos, porém definidos, alvos moleculares (Koeberle e Werz, 2014), entretanto, mais estudos serão necessários para esclarecer o mecanismo de ação exato do GM.

## 6 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os nossos resultados demonstram um efeito anti-inflamatório importante do galato de metila em modelos de inflamação induzido pelo zimosan, principalmente no modelo de artrite experimental, devido à sua capacidade de modular o recrutamento dos neutrófilos e a ativação de macrófagos. Esses achados ressaltam a importância de um estudo mais aprofundado dos mecanismos de ação do GM e destacam que essa substância pode ser uma candidata com potencial anti-inflamatório que poderá ser utilizada no controle da artrite. Além disso, sugerimos que os efeitos anti-inflamatórios do GM podem ser mediados através de diferentes vias associadas ao processo inflamatório, corroborando com os estudos que demonstram que substâncias derivadas de produtos naturais possuem múltiplos alvos moleculares.

## 7 REFERÊNCIAS

- Alcorn, N.; Saunders, S.; Madhok, R. Benefit-risk assessment of leflunomide: an appraisal of leflunomide in rheumatoid arthritis 10 years after licensing. **Drug Saf**, v. 32, n. 12, p. 1123-34, 2009. ISSN 0114-5916.
- Alonso-Ruiz, A. et al. Tumor necrosis factor alpha drugs in rheumatoid arthritis: systematic review and metaanalysis of efficacy and safety. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 9, p. 52, 2008. ISSN 1471-2474.
- Alonzi, T. et al. Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. **J Exp Med**, v. 187, n. 4, p. 461-8, Feb 1998. ISSN 0022-1007.
- An, M. M. et al. The addition of tocilizumab to DMARD therapy for rheumatoid arthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 66, n. 1, p. 49-59, Jan 2010. ISSN 1432-1041.
- Arend, W. P. Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 45, n. 1, p. 101-6, Feb 2001. ISSN 0004-3591.
- Asquith, D. L. et al. Animal models of rheumatoid arthritis. **Eur J Immunol**, v. 39, n. 8, p. 2040-4, Aug 2009. ISSN 1521-4141.
- Barnes, P. J. Corticosteroid effects on cell signalling. **Eur Respir J**, v. 27, n. 2, p. 413-26, Feb 2006. ISSN 0903-1936.
- Barnes, P. J. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 120, n. 2-3, p. 76-85, May 2010. ISSN 1879-1220.
- Bendele, A. Animal models of rheumatoid arthritis. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 1, n. 4, p. 377-85, Jun 2001. ISSN 1108-7161.
- Bendele, A. M. et al. Combination benefit of treatment with the cytokine inhibitors interleukin-1 receptor antagonist and PEGylated soluble tumor necrosis factor receptor type I in animal models of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 43, n. 12, p. 2648-59, Dec 2000. ISSN 0004-3591.
- Berg, O. G. et al. Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A(2)-paradigm. **Chem Rev**, v. 101, n. 9, p. 2613-54, Sep 2001. ISSN 0009-2665.
- Bernotiene, E. et al. Delayed resolution of acute inflammation during zymosan-induced arthritis in leptin-deficient mice. **Arthritis Res Ther**, v. 6, n. 3, p. R256-63, 2004. ISSN 1478-6362.
- Bevaart, L.; Vervoordeldonk, M. J.; Tak, P. P. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 8, p. 2192-205, Aug 2010. ISSN 1529-0131.

- Bezerra, M. M. et al. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. **Br J Pharmacol**, v. 141, n. 1, p. 172-82, Jan 2004. ISSN 0007-1188.
- Bingham, C. O. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. **J Rheumatol Suppl**, v. 65, p. 3-9, Sep 2002. ISSN 0380-0903.
- Black, R. A. et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. **Nature**, v. 385, n. 6618, p. 729-33, Feb 1997. ISSN 0028-0836.
- Blaschke, S. et al. Epstein-Barr virus infection in peripheral blood mononuclear cells, synovial fluid cells, and synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 27, n. 4, p. 866-73, Apr 2000. ISSN 0315-162X.
- Bondeson, J. The mechanisms of action of disease-modifying antirheumatic drugs: a review with emphasis on macrophage signal transduction and the induction of proinflammatory cytokines. **Gen Pharmacol**, v. 29, n. 2, p. 127-50, Aug 1997. ISSN 0306-3623.
- Boyce, B. F.; Xing, L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. **Arthritis Res Ther**, v. 9 Suppl 1, p. S1, 2007. ISSN 1478-6362.
- Boyle, W. J.; Simonet, W. S.; Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337-42, May 2003. ISSN 0028-0836.
- Brennan, F. M.; McInnes, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest**, v. 118, n. 11, p. 3537-45, Nov 2008. ISSN 0021-9738.
- Bresnihan, B. et al. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. **Arthritis Rheum**, v. 41, n. 12, p. 2196-204, Dec 1998. ISSN 0004-3591.
- Brown, G. D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 1, p. 33-43, Jan 2006. ISSN 1474-1733.
- Burger, D.; Dayer, J. M. The role of human T-lymphocyte-monocyte contact in inflammation and tissue destruction. **Arthritis Res**, v. 4 Suppl 3, p. S169-76, 2002. ISSN 1465-9905.
- Burger, D. et al. Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis? **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 20, n. 5, p. 879-96, Oct 2006. ISSN 1521-6942.
- Burke, J. E.; Dennis, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **J Lipid Res**, v. 50 Suppl, p. S237-42, Apr 2009. ISSN 0022-2275.
- Caporali, R. et al. Recommendations for the use of biologic therapy in rheumatoid arthritis: update from the Italian Society for Rheumatology I. Efficacy. **Clin Exp Rheumatol**, v. 29, n. 3 Suppl 66, p. S7-14, 2011 May-Jun 2011. ISSN 0392-856X.

- Cascão, R. et al. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. **Autoimmun Rev**, v. 9, n. 8, p. 531-5, Jun 2010. ISSN 1873-0183.
- Cassim, B. et al. Kallikreins, kininogens and kinin receptors on circulating and synovial fluid neutrophils: role in kinin generation in rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 48, n. 5, p. 490-6, May 2009. ISSN 1462-0332.
- Cavalher-Machado, S. C. et al. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. **Int Immunopharmacol**, v. 8, n. 11, p. 1552-60, Nov 2008. ISSN 1567-5769.
- Cedergren, J. et al. Intracellular oxidative activation in synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis but not from other arthritis patients. **J Rheumatol**, v. 34, n. 11, p. 2162-70, Nov 2007. ISSN 0315-162X.
- Chae, H. S. et al. Methyl gallate inhibits the production of interleukin-6 and nitric oxide via down-regulation of extracellular-signal regulated protein kinase in RAW 264.7 cells. **Am J Chin Med**, v. 38, n. 5, p. 973-83, 2010. ISSN 0192-415X.
- Chen, M. et al. Neutrophil-derived leukotriene B4 is required for inflammatory arthritis. **J Exp Med**, v. 203, n. 4, p. 837-42, Apr 2006. ISSN 0022-1007.
- Cho, E. J. et al. Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 544-51, 2003. ISSN 0944-7113.
- Cho, Y. G. et al. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev**, v. 7, n. 1, p. 65-70, Nov 2007. ISSN 1568-9972.
- Chodniewicz, D.; Zhelev, D. V. Novel pathways of F-actin polymerization in the human neutrophil. **Blood**, v. 102, n. 6, p. 2251-8, Sep 2003. ISSN 0006-4971.
- Chou, R. C. et al. Lipid-cytokine-chemokine cascade drives neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis. **Immunity**, v. 33, n. 2, p. 266-78, Aug 2010. ISSN 1097-4180.
- Choy, E. H. et al. Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. **Arthritis Rheum**, v. 46, n. 12, p. 3143-50, Dec 2002. ISSN 0004-3591.
- Choy, E. H.; Panayi, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**, v. 344, n. 12, p. 907-16, Mar 2001. ISSN 0028-4793.
- Choy, E. H. et al. A meta-analysis of the efficacy and toxicity of combining disease-modifying anti-rheumatic drugs in rheumatoid arthritis based on patient withdrawal. **Rheumatology (Oxford)**, v. 44, n. 11, p. 1414-21, Nov 2005. ISSN 1462-0324.

- Cicchetti, G.; Allen, P. G.; Glogauer, M. Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 13, n. 3, p. 220-8, 2002. ISSN 1045-4411.
- Cohen, S. et al. Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Arthritis Rheum**, v. 46, n. 3, p. 614-24, Mar 2002. ISSN 0004-3591.
- Coleman, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **Int Immunopharmacol**, v. 1, n. 8, p. 1397-406, Aug 2001. ISSN 1567-5769.
- Conte, F. e. P. et al. Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB<sub>4</sub>, TNF- $\alpha$ , and CXCL-1. **J Leukoc Biol**, v. 84, n. 3, p. 652-60, Sep 2008. ISSN 0741-5400.
- Conte, F. P. et al. Lipoxin A(4) attenuates zymosan-induced arthritis by modulating endothelin-1 and its effects. **Br J Pharmacol**, v. 161, n. 4, p. 911-24, Oct 2010. ISSN 1476-5381.
- Crispo, J. A. et al. Protective effects of methyl gallate on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in PC12 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 393, n. 4, p. 773-8, Mar 2010. ISSN 1090-2104.
- Cross, A. et al. Neutrophil gene expression in rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, v. 12, n. 3, p. 191-202, Oct 2005. ISSN 0928-4680.
- Cunha, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 4, p. 824-32, Apr 2008. ISSN 0741-5400.
- Cunha, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 5, p. 1755-60, Feb 2005. ISSN 0027-8424.
- da Rocha, F. A. et al. Blockade of leukotriene B<sub>4</sub> prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. **Eur J Pharmacol**, v. 497, n. 1, p. 81-6, Aug 2004. ISSN 0014-2999.
- da S Rocha, J. C. et al. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. **Br J Pharmacol**, v. 136, n. 4, p. 588-96, Jun 2002. ISSN 0007-1188.
- Dayer, J. M. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 42 Suppl 2, p. ii3-10, May 2003. ISSN 1462-0324.
- Deng, G.; Lenardo, M. The role of immune cells and cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**. 3: 163–168 p. 2006.
- Deng, X. et al. Magnetic ligand fishing combination with high-performance liquid chromatography-diode array detector-mass spectrometry to screen and characterize

cyclooxygenase-2 inhibitors from green tea. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 973C, p. 55-60, Oct 2014. ISSN 1873-376X.

Dimasi, D.; Sun, W. Y.; Bonder, C. S. Neutrophil interactions with the vascular endothelium. **Int Immunopharmacol**, v. 17, n. 4, p. 1167-75, Dec 2013. ISSN 1878-1705.

Dimitrova, P. et al. The role of properdin in murine zymosan-induced arthritis. **Mol Immunol**, v. 47, n. 7-8, p. 1458-66, Apr 2010. ISSN 1872-9142.

Dinarello, C. A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 935-50, Mar 2010. ISSN 1097-4172.

Dixon, W. G. et al. Drug-specific risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register (BSRBR). **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 3, p. 522-8, Mar 2010. ISSN 1468-2060.

Dolmetsch, R. E.; Xu, K.; Lewis, R. S. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. **Nature**, v. 392, n. 6679, p. 933-6, Apr 1998. ISSN 0028-0836.

Domínguez, D. C.; Guragain, M.; Patrauchan, M. Calcium binding proteins and calcium signaling in prokaryotes. **Cell Calcium**, v. 57, n. 3, p. 151-65, Mar 2015. ISSN 1532-1991.

Donahue, K. E. et al. Systematic review: comparative effectiveness and harms of disease-modifying medications for rheumatoid arthritis. **Ann Intern Med**, v. 148, n. 2, p. 124-34, Jan 2008. ISSN 1539-3704.

Dostert, A.; Heinzl, T. Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. **Curr Pharm Des**, v. 10, n. 23, p. 2807-16, 2004. ISSN 1381-6128.

Drexler, S. K. et al. Cell signalling in macrophages, the principal innate immune effector cells of rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 10, n. 5, p. 216, 2008. ISSN 1478-6362.

Dunlop, D. D. et al. The costs of arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 49, n. 1, p. 101-13, Feb 2003. ISSN 0004-3591.

Edwards, J. P. et al. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **J Leukoc Biol**, v. 80, n. 6, p. 1298-307, Dec 2006. ISSN 0741-5400.

Elsaid, K. A.; Jay, G. D.; Chichester, C. O. Detection of collagen type II and proteoglycans in the synovial fluids of patients diagnosed with non-infectious knee joint synovitis indicates early damage to the articular cartilage matrix. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 11, n. 9, p. 673-80, Sep 2003. ISSN 1063-4584.

Espanha, M. M. [Articular cartilage: structure and histochemical composition]. **Acta Reumatol Port**, v. 35, n. 5, p. 424-33, 2010 Oct-Dec 2010. ISSN 0303-464X.

- Falgarone, G.; Jaen, O.; Boissier, M. C. Role for innate immunity in rheumatoid arthritis. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 1, p. 17-25, Jan 2005. ISSN 1297-319X.
- Feldmann, M. et al. Anti-TNF therapy: where have we got to in 2005? **J Autoimmun**, v. 25 Suppl, p. 26-8, 2005. ISSN 0896-8411.
- Feldmann, M. et al. Biological insights from clinical trials with anti-TNF therapy. **Springer Semin Immunopathol**, v. 20, n. 1-2, p. 211-28, 1998. ISSN 0344-4325.
- Feldmann, M.; Maini, R. N. Anti-TNF therapy, from rationale to standard of care: what lessons has it taught us? **J Immunol**, v. 185, n. 2, p. 791-4, Jul 2010. ISSN 1550-6606.
- Ferrandi, C. et al. Phosphoinositide 3-kinase gamma inhibition plays a crucial role in early steps of inflammation by blocking neutrophil recruitment. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 322, n. 3, p. 923-30, Sep 2007. ISSN 0022-3565.
- Ferraris, F. K. et al. Gedunin, a natural tetranortriterpenoid, modulates T lymphocyte responses and ameliorates allergic inflammation. **Int Immunopharmacol**, v. 14, n. 1, p. 82-93, Sep 2012. ISSN 1878-1705.
- Firestein, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 356-61, May 2003. ISSN 0028-0836.
- Firestein, G. S. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: (Ed.). **Kelley's Textbook of Rheumatology**. Philadelphia, Pa, 2005. cap. 65,
- Firestein, G. S. et al. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. **J Immunol**, v. 144, n. 9, p. 3347-53, May 1990. ISSN 0022-1767.
- Frasnelli, M. E. et al. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Res Ther**, v. 7, n. 2, p. R370-9, 2005. ISSN 1478-6362.
- Futosi, K.; Fodor, S.; Mócsai, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. **Int Immunopharmacol**, v. 17, n. 3, p. 638-50, Nov 2013. ISSN 1878-1705.
- Gabriel, S. E.; Michaud, K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. **Arthritis Res Ther**, v. 11, n. 3, p. 229, 2009. ISSN 1478-6362.
- Gantner, B. N. et al. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. **J Exp Med**, v. 197, n. 9, p. 1107-17, May 2003. ISSN 0022-1007.
- Gegout, P. et al. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life Sci**, v. 55, n. 17, p. PL321-6, 1994. ISSN 0024-3205.
- Gegout, P. et al. Zymosan-induced arthritis in rats. II. Effects of anti-inflammatory drugs. **Life Sci**, v. 56, n. 20, p. PL389-94, 1995. ISSN 0024-3205.



- Gierut, A.; Perlman, H.; Pope, R. M. Innate immunity and rheumatoid arthritis. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 36, n. 2, p. 271-96, May 2010. ISSN 1558-3163.
- Giustarini, D. et al. Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. **Methods Enzymol**, v. 440, p. 361-80, 2008. ISSN 0076-6879.
- Goodridge, H. S. et al. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. **Nature**, v. 472, n. 7344, p. 471-5, Apr 2011. ISSN 1476-4687.
- Griffin, G. K. et al. IL-17 and TNF- $\alpha$  sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. **J Immunol**, v. 188, n. 12, p. 6287-99, Jun 2012. ISSN 1550-6606.
- Guerrero, A. T. et al. Toll-like receptor 2/MyD88 signaling mediates zymosan-induced joint hypernociception in mice: participation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CXCL1/KC. **Eur J Pharmacol**, v. 674, n. 1, p. 51-7, Jan 2012. ISSN 1879-0712.
- Guerrero, A. T. et al. Involvement of LTB4 in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE2. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 1, p. 122-30, Jan 2008. ISSN 0741-5400.
- Halliwell, B.; Zhao, K.; Whiteman, M. Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. **Free Radic Res**, v. 31, n. 6, p. 651-69, Dec 1999. ISSN 1071-5762.
- Haringman, J. J.; Ludikhuizen, J.; Tak, P. P. Chemokines in joint disease: the key to inflammation? **Ann Rheum Dis**, v. 63, n. 10, p. 1186-94, Oct 2004. ISSN 0003-4967.
- Hashimoto, A. et al. Differential expression of leukotriene B4 receptor subtypes (BLT1 and BLT2) in human synovial tissues and synovial fluid leukocytes of patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 30, n. 8, p. 1712-8, Aug 2003. ISSN 0315-162X.
- Henriques, M. G. et al. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Braz J Med Biol Res**, v. 20, n. 2, p. 243-9, 1987. ISSN 0100-879X.
- Henriques, M. G. et al. Differential inhibition by two hexazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. **Br J Pharmacol**, v. 99, n. 1, p. 164-8, Jan 1990. ISSN 0007-1188.
- Hickey, M. J. et al. Tumor necrosis factor-alpha induces leukocyte recruitment by different mechanisms in vivo and in vitro. **J Immunol**, v. 158, n. 7, p. 3391-400, Apr 1997. ISSN 0022-1767.
- Hikiji, H. et al. The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. **Prog Lipid Res**, v. 47, n. 2, p. 107-26, Mar 2008. ISSN 0163-7827.
- Hitchon, C. A.; El-Gabalawy, H. S. Oxidation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 6, n. 6, p. 265-78, 2004. ISSN 1478-6362.

- Hofkens, W. et al. Liposomal targeting of prednisolone phosphate to synovial lining macrophages during experimental arthritis inhibits M1 activation but does not favor M2 differentiation. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e54016, 2013. ISSN 1932-6203.
- Hsieh, T. J. et al. Protective effect of methyl gallate from *Toona sinensis* (Meliaceae) against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage in MDCK cells. **Food Chem Toxicol**, v. 42, n. 5, p. 843-50, May 2004. ISSN 0278-6915.
- Izquierdo, E. et al. Synovial fibroblast hyperplasia in rheumatoid arthritis: clinicopathologic correlations and partial reversal by anti-tumor necrosis factor therapy. **Arthritis Rheum**, v. 63, n. 9, p. 2575-83, Sep 2011. ISSN 1529-0131.
- Joosten, L. A. et al. IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. **J Immunol**, v. 163, n. 9, p. 5049-55, Nov 1999. ISSN 0022-1767.
- Kang, M. S. et al. Effects of methyl gallate and gallic acid on the production of inflammatory mediators interleukin-6 and interleukin-8 by oral epithelial cells stimulated with *Fusobacterium nucleatum*. **J Microbiol**, v. 47, n. 6, p. 760-7, Dec 2009. ISSN 1976-3794.
- Kannan, K.; Ortmann, R. A.; Kimpel, D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. **Pathophysiology**, v. 12, n. 3, p. 167-81, Oct 2005. ISSN 0928-4680.
- Katano, M. et al. Implication of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced neutrophil gelatinase-associated lipocalin in pathogenesis of rheumatoid arthritis revealed by proteome analysis. **Arthritis Res Ther**, v. 11, n. 1, p. R3, 2009. ISSN 1478-6362.
- Keffer, J. et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. **EMBO J**, v. 10, n. 13, p. 4025-31, Dec 1991. ISSN 0261-4189.
- Kelly, E. K.; Wang, L.; Ivashkiv, L. B. Calcium-activated pathways and oxidative burst mediate zymosan-induced signaling and IL-10 production in human macrophages. **J Immunol**, v. 184, n. 10, p. 5545-52, May 2010. ISSN 1550-6606.
- Kelly, M.; Hwang, J. M.; Kubes, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 120, n. 1, p. 3-10, Jul 2007. ISSN 0091-6749.
- Keystone, E. C. et al. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis Rheum**, v. 20, n. 7, p. 1396-1401, 1977 Sep-Oct 1977. ISSN 0004-3591.
- Khanna, D. et al. Natural products as a gold mine for arthritis treatment. **Curr Opin Pharmacol**, v. 7, n. 3, p. 344-51, Jun 2007. ISSN 1471-4892.
- Khurana, R.; Berney, S. M. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, v. 12, n. 3, p. 153-65, Oct 2005. ISSN 0928-4680.

- Kikuchi, M. et al. Bibliographical investigation of complementary alternative medicines for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **Geriatr Gerontol Int**, v. 9, n. 1, p. 29-40, Mar 2009. ISSN 1447-0594.
- Kim, N. D. et al. A unique requirement for the leukotriene B4 receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. **J Exp Med**, v. 203, n. 4, p. 829-35, Apr 2006. ISSN 0022-1007.
- Kim, S. J. et al. Effects of methyl gallate on arachidonic acid metabolizing enzymes: Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase in mouse bone marrow-derived mast cells. **Arch Pharm Res**, v. 29, n. 10, p. 874-8, Oct 2006. ISSN 0253-6269.
- Kinne, R. W. et al. Macrophages in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res**, v. 2, n. 3, p. 189-202, 2000. ISSN 1465-9905.
- Kinne, R. W.; Stuhlmüller, B.; Burmester, G. R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. **Arthritis Res Ther**, v. 9, n. 6, p. 224, 2007. ISSN 1478-6362.
- Kirwan, J. R. et al. Effects of glucocorticoids on radiological progression in rheumatoid arthritis. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, p. CD006356, 2007. ISSN 1469-493X.
- Kishimoto, T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 1-21, 2005. ISSN 0732-0582.
- Koeberle, A.; Werz, O. Multi-target approach for natural products in inflammation. **Drug Discov Today**, v. 19, n. 12, p. 1871-82, Dec 2014. ISSN 1878-5832.
- Kolaczowska, E.; Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 3, p. 159-75, Mar 2013. ISSN 1474-1741.
- Kosinska, M. K. et al. Articular Joint Lubricants during Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis Display Altered Levels and Molecular Species. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0125192, 2015. ISSN 1932-6203.
- Kouskoff, V. et al. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. **Cell**, v. 87, n. 5, p. 811-22, Nov 1996. ISSN 0092-8674.
- Kraan, M. C. et al. The development of clinical signs of rheumatoid synovial inflammation is associated with increased synthesis of the chemokine CXCL8 (interleukin-8). **Arthritis Res**, v. 3, n. 1, p. 65-71, 2001. ISSN 1465-9905.
- Lader, C. S.; Flanagan, A. M. Prostaglandin E2, interleukin 1alpha, and tumor necrosis factor-alpha increase human osteoclast formation and bone resorption in vitro. **Endocrinology**, v. 139, n. 7, p. 3157-64, Jul 1998. ISSN 0013-7227.
- Lama, A.; Saikia, H. Targeted therapies for rheumatoid arthritis: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. Vol. 2: 1116-1134 p. 2011.
- Larché, M. J.; Sacrez, S. M.; Foxwell, B. M. Pathogenic role of TNF $\alpha$  in rheumatoid arthritis. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**. 2: 367-375 p. 2005.

- Lavagno, L. et al. Anti-inflammatory drugs and tumor necrosis factor-alpha production from monocytes: role of transcription factor NF-kappa B and implication for rheumatoid arthritis therapy. **Eur J Pharmacol**, v. 501, n. 1-3, p. 199-208, Oct 2004. ISSN 0014-2999.
- Lawrence, T.; Gilroy, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **Int J Exp Pathol**, v. 88, n. 2, p. 85-94, Apr 2007. ISSN 0959-9673.
- Lee, A. et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  induces sustained signaling and a prolonged and unremitting inflammatory response in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Arthritis Rheum**, v. 65, n. 4, p. 928-38, Apr 2013. ISSN 1529-0131.
- Lee, H. S. et al. Several regions in the major histocompatibility complex confer risk for anti-CCP-antibody positive rheumatoid arthritis, independent of the DRB1 locus. **Mol Med**, v. 14, n. 5-6, p. 293-300, 2008 May-Jun 2008. ISSN 1076-1551.
- Lefrançois, E. et al. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 5, p. 1673-8, Jan 2012. ISSN 1091-6490.
- Leistad, L. et al. Presence of secretory group IIa and V phospholipase A2 and cytosolic group IValpha phospholipase A2 in chondrocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Clin Chem Lab Med**, v. 42, n. 6, p. 602-10, 2004. ISSN 1434-6621.
- Leombruno, J. P.; Einarson, T. R.; Keystone, E. C. The safety of anti-tumour necrosis factor treatments in rheumatoid arthritis: meta and exposure-adjusted pooled analyses of serious adverse events. **Ann Rheum Dis**, v. 68, n. 7, p. 1136-45, Jul 2009. ISSN 1468-2060.
- Ley, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 9, p. 678-89, Sep 2007. ISSN 1474-1741.
- Linke, B. et al. Analysis of sphingolipid and prostaglandin synthesis during zymosan-induced inflammation. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 99, n. 1-2, p. 15-23, Oct 2012. ISSN 1098-8823.
- Majno, G.; Joris, I. **Cells, Tissues and Disease**. Second Edition. Oxford University Press 2004.
- Mantovani, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 519-31, Aug 2011. ISSN 1474-1741.
- Marcus, D. M. Therapy: Herbs and supplements for rheumatic diseases. **Nat Rev Rheumatol**, v. 5, n. 6, p. 299-300, Jun 2009. ISSN 1759-4804.
- Mathis, S.; Jala, V. R.; Haribabu, B. Role of leukotriene B4 receptors in rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev**, v. 7, n. 1, p. 12-7, Nov 2007. ISSN 1568-9972.
- Matsumoto, I. et al. How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease. **Nat Immunol**, v. 3, n. 4, p. 360-5, Apr 2002. ISSN 1529-2908.

- Maxwell, L. J.; Singh, J. A. Abatacept for rheumatoid arthritis: a Cochrane systematic review. **J Rheumatol**, v. 37, n. 2, p. 234-45, Feb 2010. ISSN 0315-162X.
- McCoy, J. M.; Wicks, J. R.; Audoly, L. P. The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **J Clin Invest**, v. 110, n. 5, p. 651-8, Sep 2002. ISSN 0021-9738.
- McInnes, I. B.; Leung, B. P.; Liew, F. Y. Cell-cell interactions in synovitis. Interactions between T lymphocytes and synovial cells. **Arthritis Res**, v. 2, n. 5, p. 374-8, 2000. ISSN 1465-9905.
- Medzhitov, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-6, Mar 2010. ISSN 1097-4172.
- Mok, C. C. Rituximab for the treatment of rheumatoid arthritis: an update. **Drug Des Devel Ther**, v. 8, p. 87-100, 2014. ISSN 1177-8881.
- Morita, I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 68-69, p. 165-75, Aug 2002. ISSN 1098-8823.
- Mosser, D. M.; Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 12, p. 958-69, Dec 2008. ISSN 1474-1741.
- Mulherin, D.; Fitzgerald, O.; Bresnihan, B. Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 39, n. 1, p. 115-24, Jan 1996. ISSN 0004-3591.
- Müller-Ladner, U. et al. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. **Nat Clin Pract Rheumatol**, v. 1, n. 2, p. 102-10, Dec 2005. ISSN 1745-8382.
- Nagase, H.; Kashiwagi, M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. **Arthritis Res Ther**, v. 5, n. 2, p. 94-103, 2003. ISSN 1478-6362.
- Nakagawa, T. et al. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates leukocyte infiltration and articular cartilage destruction in rat zymosan-induced arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 46, n. 9, p. 2486-94, Sep 2002. ISSN 0004-3591.
- Nathan, C.; Ding, A. Nonresolving inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871-82, Mar 2010. ISSN 1097-4172.
- Nielen, M. M. et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 2, p. 380-6, Feb 2004. ISSN 0004-3591.
- Nishimoto, N. et al. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 6, p. 1761-9, Jun 2004. ISSN 0004-3591.

- Németh, T.; Mócsai, A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. **Immunol Lett**, v. 143, n. 1, p. 9-19, Mar 2012. ISSN 1879-0542.
- Patakas, A. The role of TH17 cells in a model of rheumatoid arthritis. 2011. (Doctoral). University of Glasgow
- Penido, C. et al. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. **Inflamm Res**, v. 55, n. 11, p. 457-64, Nov 2006. ISSN 1023-3830.
- Pettipher, E. R.; Salter, E. D. Resident joint tissues, rather than infiltrating neutrophils and monocytes, are the predominant sources of TNF-alpha in zymosan-induced arthritis. **Cytokine**, v. 8, n. 2, p. 130-3, Feb 1996. ISSN 1043-4666.
- Pillinger, M. H.; Abramson, S. B. The neutrophil in rheumatoid arthritis. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 21, n. 3, p. 691-714, Aug 1995. ISSN 0889-857X.
- Pope, R. M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 7, p. 527-35, Jul 2002. ISSN 1474-1733.
- Pruenster, M. et al. The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. **Nat Immunol**, v. 10, n. 1, p. 101-8, Jan 2009. ISSN 1529-2916.
- Rajakariar, R.; Yaqoob, M. M.; Gilroy, D. W. COX-2 in inflammation and resolution. **Mol Interv**, v. 6, n. 4, p. 199-207, Aug 2006. ISSN 1534-0384.
- Rannou, F. et al. Cartilage breakdown in rheumatoid arthritis. **Joint Bone Spine**, v. 73, n. 1, p. 29-36, Jan 2006. ISSN 1297-319X.
- Rasheed, Z. Hydroxyl radical damaged immunoglobulin G in patients with rheumatoid arthritis: biochemical and immunological studies. **Clin Biochem**, v. 41, n. 9, p. 663-9, Jun 2008. ISSN 1873-2933.
- Ravindran, V.; Rachapalli, S.; Choy, E. H. Safety of medium- to long-term glucocorticoid therapy in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 48, n. 7, p. 807-11, Jul 2009. ISSN 1462-0332.
- Raychaudhuri, S. Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol**, v. 22, n. 2, p. 109-18, Mar 2010. ISSN 1531-6963.
- Rhen, T.; Cidlowski, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. **N Engl J Med**, v. 353, n. 16, p. 1711-23, Oct 2005. ISSN 1533-4406.
- Richards, P. J. et al. Functional characterization of a soluble gp130 isoform and its therapeutic capacity in an experimental model of inflammatory arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 54, n. 5, p. 1662-72, May 2006. ISSN 0004-3591.

- Rose-John, S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. **Int J Biol Sci**, v. 8, n. 9, p. 1237-47, 2012. ISSN 1449-2288.
- Sachs, D. et al. Cooperative role of tumour necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice. **Br J Pharmacol**, v. 162, n. 1, p. 72-83, Jan 2011. ISSN 1476-5381.
- Sadik, C. D. et al. Neutrophils orchestrate their own recruitment in murine arthritis through C5aR and Fc $\gamma$ R signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 46, p. E3177-85, Nov 2012. ISSN 1091-6490.
- Sadik, C. D.; Kim, N. D.; Luster, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends Immunol**, v. 32, n. 10, p. 452-60, Oct 2011. ISSN 1471-4981.
- Sakaguchi, N. et al. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. **Nature**, v. 426, n. 6965, p. 454-60, Nov 2003. ISSN 1476-4687.
- Salliot, C.; van der Heijde, D. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. **Ann Rheum Dis**, v. 68, n. 7, p. 1100-4, Jul 2009. ISSN 1468-2060.
- Sanz, M. J.; Kubes, P. Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 2, p. 278-83, Feb 2012. ISSN 1521-4141.
- Sarkar, F. H. et al. Back to the future: COX-2 inhibitors for chemoprevention and cancer therapy. **Mini Rev Med Chem**, v. 7, n. 6, p. 599-608, Jun 2007. ISSN 1389-5575.
- Sato, M. et al. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. **J Immunol**, v. 171, n. 1, p. 417-25, Jul 2003. ISSN 0022-1767.
- Scott, D. L.; Wolfe, F.; Huizinga, T. W. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 376, n. 9746, p. 1094-108, Sep 2010. ISSN 1474-547X.
- Sharif, O. et al. Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages. **BMC Immunol**, v. 8, p. 1, 2007. ISSN 1471-2172.
- Sharma, J. N.; Al-Omran, A.; Parvathy, S. S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**, v. 15, n. 6, p. 252-9, Dec 2007. ISSN 0925-4692.
- Sherwood, E. R.; Toliver-Kinsky, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, n. 3, p. 385-405, Sep 2004. ISSN 1521-6896.
- Shimizu, T. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 49, p. 123-50, 2009. ISSN 0362-1642.

- Spector, W. G. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. Issue 2. **The Journal of Pathology and Bacteriology**. 72: 367-380 p. 1956.
- Stillie, R. et al. The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN. **J Leukoc Biol**, v. 86, n. 3, p. 529-43, Sep 2009. ISSN 1938-3673.
- Stix, G. Better ways to target pain. **Sci Am**, v. 296, n. 1, p. 84-6, 88, Jan 2007. ISSN 0036-8733.
- Strangfeld, A. et al. Comparative effectiveness of tumour necrosis factor alpha inhibitors in combination with either methotrexate or leflunomide. **Ann Rheum Dis**, v. 68, n. 12, p. 1856-62, Dec 2009. ISSN 1468-2060.
- Strangfeld, A. et al. Risk of incident or recurrent malignancies among patients with rheumatoid arthritis exposed to biologic therapy in the German biologics register RABBIT. **Arthritis Res Ther**, v. 12, n. 1, p. R5, 2010. ISSN 1478-6362.
- Strangfeld, A. et al. Risk of herpes zoster in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF-alpha agents. **JAMA**, v. 301, n. 7, p. 737-44, Feb 2009. ISSN 1538-3598.
- Suo, J. et al. Neutrophils mediate edema formation but not mechanical allodynia during zymosan-induced inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 96, n. 1, p. 133-42, Jul 2014. ISSN 1938-3673.
- Svenson, M. et al. Monitoring patients treated with anti-TNF-alpha biopharmaceuticals: assessing serum infliximab and anti-infliximab antibodies. **Rheumatology (Oxford)**, v. 46, n. 12, p. 1828-34, Dec 2007. ISSN 1462-0332.
- Svensson, M. N. et al. Fms-like tyrosine kinase 3 ligand controls formation of regulatory T cells in autoimmune arthritis. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54884, 2013. ISSN 1932-6203.
- Sweeney, S. E.; Firestein, G. S. Signal transduction in rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol**, v. 16, n. 3, p. 231-7, May 2004. ISSN 1040-8711.
- Tak, P. P.; Kalden, J. R. Advances in rheumatology: new targeted therapeutics. **Arthritis Res Ther**, v. 13 Suppl 1, p. S5, 2011. ISSN 1478-6362.
- Tarner, I. H. et al. The different stages of synovitis: acute vs chronic, early vs late and non-erosive vs erosive. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 19, n. 1, p. 19-35, Feb 2005. ISSN 1521-6942.
- Tarrant, T. K.; Patel, D. D. Chemokines and leukocyte trafficking in rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, v. 13, n. 1, p. 1-14, Feb 2006. ISSN 0928-4680.
- Taylor, P. R. et al. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. **J Immunol**, v. 169, n. 7, p. 3876-82, Oct 2002. ISSN 0022-1767.
- Underhill, D. M. Macrophage recognition of zymosan particles. **J Endotoxin Res**, v. 9, n. 3, p. 176-80, 2003. ISSN 0968-0519.



- van de Loo, F. A. et al. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 38, n. 2, p. 164-72, Feb 1995. ISSN 0004-3591.
- van den Berg, W. B. et al. Amelioration of established murine collagen-induced arthritis with anti-IL-1 treatment. **Clin Exp Immunol**, v. 95, n. 2, p. 237-43, Feb 1994. ISSN 0009-9104.
- van den Berg, W. B. et al. Role of tumour necrosis factor alpha in experimental arthritis: separate activity of interleukin 1beta in chronicity and cartilage destruction. **Ann Rheum Dis**, v. 58 Suppl 1, p. I40-8, Nov 1999. ISSN 0003-4967.
- van Lent, P. L. et al. Phagocytic synovial lining cells regulate acute and chronic joint inflammation after antigenic exacerbation of smouldering experimental murine arthritis. **J Rheumatol**, v. 25, n. 6, p. 1135-45, Jun 1998. ISSN 0315-162X.
- Van Lent, P. L. et al. Local removal of phagocytic synovial lining cells by clodronate-liposomes decreases cartilage destruction during collagen type II arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 57, n. 7, p. 408-13, Jul 1998. ISSN 0003-4967.
- Vasanthi, P.; Nalini, G.; Rajasekhar, G. Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis a review. Issue 4. **APLAR Journal of Rheumatology**. 10: 270-274 p. 2007.
- Verri, W. A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacol Ther**, v. 112, n. 1, p. 116-38, Oct 2006. ISSN 0163-7258.
- Vonkeman, H. E.; van de Laar, M. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: adverse effects and their prevention. **Semin Arthritis Rheum**, v. 39, n. 4, p. 294-312, Feb 2010. ISSN 1532-866X.
- Waksman, B. H. Immune regulation in adjuvant disease and other arthritis models: relevance to pathogenesis of chronic arthritis. **Scand J Immunol**, v. 56, n. 1, p. 12-34, Jul 2002. ISSN 0300-9475.
- Wang, C. H. et al. Expression of CD147 (EMMPRIN) on neutrophils in rheumatoid arthritis enhances chemotaxis, matrix metalloproteinase production and invasiveness of synoviocytes. **J Cell Mol Med**, v. 15, n. 4, p. 850-60, Apr 2011. ISSN 1582-4934.
- Westenburg, H. E. et al. Activity-guided isolation of antioxidative constituents of *Cotinus coggygia*. **J Nat Prod**, v. 63, n. 12, p. 1696-8, Dec 2000. ISSN 0163-3864.
- Westra, J. et al. Strong inhibition of TNF-alpha production and inhibition of IL-8 and COX-2 mRNA expression in monocyte-derived macrophages by RWJ 67657, a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor. **Arthritis Res Ther**, v. 6, n. 4, p. R384-92, 2004. ISSN 1478-6362.

- Wang, W. K. et al. Methyl gallate and chemicals structurally related to methyl gallate protect human umbilical vein endothelial cells from oxidative stress. **Exp Mol Med**, v. 37, n. 4, p. 343-52, Aug 2005. ISSN 1226-3613.
- Williams, M. R. et al. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. **Trends Immunol**, v. 32, n. 10, p. 461-9, Oct 2011. ISSN 1471-4981.
- Wipke, B. T.; Allen, P. M. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. **J Immunol**, v. 167, n. 3, p. 1601-8, Aug 2001. ISSN 0022-1767.
- Wright, H. L. et al. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology (Oxford)**, v. 49, n. 9, p. 1618-31, Sep 2010. ISSN 1462-0332.
- Wright, H. L.; Moots, R. J.; Edwards, S. W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol**, Jun 2014. ISSN 1759-4804.
- Wu, X. et al. Exploring inflammatory disease drug effects on neutrophil function. **Analyst**, v. 139, n. 16, p. 4056-63, Aug 2014. ISSN 1364-5528.
- Yen, J. H. Treatment of early rheumatoid arthritis in developing countries. Biologics or disease-modifying anti-rheumatic drugs? **Biomed Pharmacother**, v. 60, n. 10, p. 688-92, Dec 2006. ISSN 0753-3322.
- Young, S. H. et al. Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha production in 1->3-beta-glucan (zymosan)-activated macrophages. **J Biol Chem**, v. 276, n. 23, p. 20781-7, Jun 2001. ISSN 0021-9258..
- Yuhki, K. et al. Prostaglandin I2 plays a key role in zymosan-induced mouse pleurisy. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 325, n. 2, p. 601-9, May 2008. ISSN 1521-0103.
- Zimmerman, M. **Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals**. 16: 109-110 p. 1983.

## 8 APÊNDICE A –

Artigo aceito no Journal of Ethnopharmacology. (J Ethnopharmacol. 2015 Oct 7. pii: S0378-8741(15)30173-2. doi: 10.1016/j.jep.2015.10.014)

### **Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis**

\*Elaine Cruz Rosas<sup>1,2</sup>, Luana Barbosa Correa<sup>1,2</sup>, Tatiana Almeida Pádua<sup>1,2</sup>, Thadeu Estevam Moreira Maramaldo Costa<sup>1,2</sup>, José Luiz Mazzei<sup>4</sup>, Alan Patrick Heringer<sup>3</sup>, Carlos Alberto Bizarro<sup>1,6</sup>, Maria Auxiliadora Coelho Kaplan<sup>5</sup>, Maria Raquel Figueiredo<sup>3</sup>, \*Maria G Henriques<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Applied Pharmacology, Farmanguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>2</sup>National Institute for Science and Technology on Innovation on Neglected Diseases (INCT/IDN), Center for Technological Development in Health (CDTS), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>3</sup>Natural Products Laboratory, Farmanguinhos, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>4</sup>Analytical Center, Farmanguinhos, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>5</sup>Natural Products Research Center (NPPN), Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil

<sup>6</sup>Present address: Germano Sinval Faria School Health Center (CSEGSF), Sergio Arouca National School of Public Health (ENSP), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

\*Corresponding authors:

Maria G Henriques, Laboratory of Applied Pharmacology, Farmanguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail address: [gracahenriques@fiocruz.br](mailto:gracahenriques@fiocruz.br) (M.G. Henriques).

Phone number: 55 21 3977-2487

or

Elaine Cruz Rosas, Laboratory of Applied Pharmacology, Farmanguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail address: [ecrosas@fiocruz.br](mailto:ecrosas@fiocruz.br) (E.C. Rosas)

Phone number: 55 21 3977-2480

**Ethnopharmacological relevance:** *Schinus terebinthifolius* is a species of plant from the Anacardiaceae family, which can be found in different regions of Brazil. *Schinus* is popularly known as aroeirinha, aroeira-vermelha, or Brazilian pepper. In folk medicine, *S. terebinthifolius* is used for several disorders, including inflammatory conditions, skin wounds, mucosal membrane ulcers, respiratory problems, gout, tumors, diarrhea and arthritis. According to chemical analyses, gallic acid, methyl gallate and pentagalloylglucose are the main components of hydroalcoholic extracts from *S. terebinthifolius* leaves. In the present study, we demonstrated the ability of a hydroalcoholic extract to inhibit cell migration in arthritis and investigated the mechanisms underlying this phenomenon.

**Materials and methods:** The anti-inflammatory effect of *S. terebinthifolius* hydroalcoholic leaf extract (ST-70) was investigated in a zymosan-induced experimental model of inflammation. Male Swiss mice received zymosan (100 µg/cavity) via intra-thoracic (i.t.) or intra-articular (i.a.) injection after oral pre-treatment with ST-70. The direct action of ST-70 on neutrophils was evaluated via chemotaxis.

**Results:** ST-70 exhibited a dose-dependent effect in the pleurisy model. The median effective dose (ED<sub>50</sub>) was 100 mg/kg, which inhibited 70% of neutrophil accumulation when compared with the control group. ST-70 reduced joint diameter and neutrophil influx for synovial tissues at 6 h and 24 h in zymosan-induced arthritis. Additionally, ST-70 inhibited synovial Interleukin (IL)-6, IL-1β, keratinocyte-derived chemokine (CXCL1/KC) and Tumor Necrosis Factor (TNF)-α production at 6 h and CXCL1/KC and IL-1β production at 24 h. The direct activity of ST-70 on neutrophils was observed via the impairment of CXCL1/KC-induced chemotaxis in neutrophils. Oral administration of ST-70 did not induce gastric damage. Daily administration for twenty days did not kill any animals. In contrast, similar administrations of diclofenac induced gastric damage and killed all animals by the fifth day.

**Conclusions:** Our results demonstrated significant anti-inflammatory effects of ST-70, suggesting a putative use of this herb for the development of phytomedicines to treat inflammatory diseases, such as joint inflammation.

**Keywords:** *Schinus terebinthifolius* Raddi, Arthritis, Neutrophils

**Chemical compounds studied in this article:**

Gallic acid (PubChem CID: 370); Methyl gallate (PubChem CID: 7428); Pentagalloylglucose (PubChem CID: 65238).

## 1. Introduction

*Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) is a native plant from South America. It has been used in folk medicine as teas, infusions or tinctures; as an anti-inflammatory, febrifuge, analgesic, and depurative agent; and to treat urogenital system illnesses (Medeiros et al., 2007). Through ethnopharmacological research, the gastroprotective properties of *S. terebinthifolius* are remarkably effective, especially in the treatment of gastritis and ulcers (Carlini et al., 2010). Previous reports have demonstrated that *S. terebinthifolius* extracts or fractions rich in polyphenols, display antioxidant, antibacterial, antifungal and anti-allergic activities in different experimental models (Cavalher-Machado et al., 2008; de Lima et al., 2006; Schmourlo et al., 2005; Velázquez et al., 2003). Despite its importance in popular medicine for the treatment of inflammatory disorders, few scientific studies have examined the biological activities and chemical composition of *Schinus terebinthifolius* extracts.

Inflammation is a complex physiological response that occurs in vascularized tissues in response to harmful stimuli, such as pathogens, damaged cells or irritants. The inflammatory process is coordinated by different chemical mediators that induce vasodilation, plasma leakage and leukocyte margination. However, when the inflammatory response becomes prolonged or chronic, the same process can become destructive and has been linked to a number of diseases. Chronic inflammation can result from a failure to eliminate harmful stimuli, an abnormal autoimmune response or the persistence of a chronic, low-intensity irritant that continually causes acute inflammation response (Medzhitov, 2010).

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune inflammatory disease characterized by pathological changes, such as persistent synovitis, vascular proliferation, infiltration of inflammatory cells, and damage to cartilage and bone (Scott et al., 2010). A critical factor that contributes to joint damage is the excessive production of inflammatory mediators by resident or infiltrating inflammatory cells. Cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) and eicosanoids (leukotrienes and prostaglandins) are involved in the pathogenesis of arthritis and participate in pain, neutrophil accumulation and tissue damage (Brennan and McInnes, 2008; Guerrero et al., 2008). Recently, the importance of IL-17 has been studied in experimental arthritis, wherein the cytokine was detected during neutrophil accumulation and cartilage degradation and in hyperalgesic symptoms (Pinto et al., 2010). The recruitment of neutrophils contributes to the local production of cytokines and joint damage and appears to be important in the pathogenesis of human arthritis (Wright et al., 2014). In the last decade, the involvement of other cells, such as macrophages, synoviocytes, lymphocytes and mast cells, have been described, indicating

that a wider variety of cells are also important in the perpetuating the articular inflammatory process (McInnes and Schett, 2011).

Current clinical treatments for RA include steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (SAIDs and NSAIDs, respectively), disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) and biological agents (Kalden, 2002). However, the prolonged use of SAIDs and NSAIDs has been associated with serious adverse effects, including gastrointestinal disorders, immunodeficiency and humoral disturbances (Roth, 2012), which are factors that have been attributed to treatment dropout.

In recent decades, the screening of safer and more potent anti-inflammatory drugs for clinical use has increased. In this context, plants with anti-inflammatory activities have shown promising effects against inflammatory diseases, such as arthritis (Lama and Saikia, 2011). A few reports have shown that a polyphenol from green tea extract displayed a protective effect in a model of inflammatory arthritis, largely through its ability to inhibit the production of key inflammatory mediators, such as interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6, by RA synovial fibroblasts (Ahmed et al., 2006).

Considering the popular uses of teas and tinctures for medicinal purposes, we evaluated the anti-inflammatory effect of hydroalcoholic extracts from *S. terebinthifolius* Raddi to assess its ability to inhibit cell migration and inflammatory mediators in experimental arthritis. Furthermore, we explored the mechanisms involved in this phenomenon.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Reagents**

Zymosan serotype A, dexamethasone, potassium diclofenac, phosphate buffered saline (PBS), buffer perborate, *o*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD), Bradford reagent, bovine serum albumin (BSA), ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt (EDTA), RPMI 1640 medium and fMLP (*N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) were all obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). DMSO (for biological tests), ethyl ether, ethyl acetate, *n*-hexane, dichloromethane, methanol and acetone for chromatography were purchased from Vetec Química Fina, Ltda. (Xerém, RJ, Brazil). LTB<sub>4</sub> immuno-assay kit was obtained from Cayman Chemicals (Ann Arbor, Michigan, USA). Purified anti-murine TNF- $\alpha$ , CXCL1/KC, IL-6 and IL-1 $\beta$  mAbs; biotinylated anti-TNF- $\alpha$ , CXCL-1/KC, IL-6 and IL-1 $\beta$  mAbs; and recombinant TNF- $\alpha$ , CXCL-1/KC, IL-6 and IL-1 $\beta$  were all obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

## 2.2. Preparation and analysis of ST-70 extract

Leaves were collected from 10 individual of *S. terebinthifolius* plants in the Atlantic Forest Campus FIOCRUZ, Jacarepaguá, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, and a voucher specimen was deposited into the Rio de Janeiro Botanical Garden Herbarium under number RB-451742.

The collected material were dried at 40°C in an oven with air circulation, reduced to small fragments and extracted with 70% ethanol in a dynamic maceration for 24 h. Then, the extract was filtered, concentrated under reduced pressure and lyophilized, resulting in a hydroethanolic extract (ST-70) with a yield of 11.00%. These conditions were based on previous studies of extraction times.

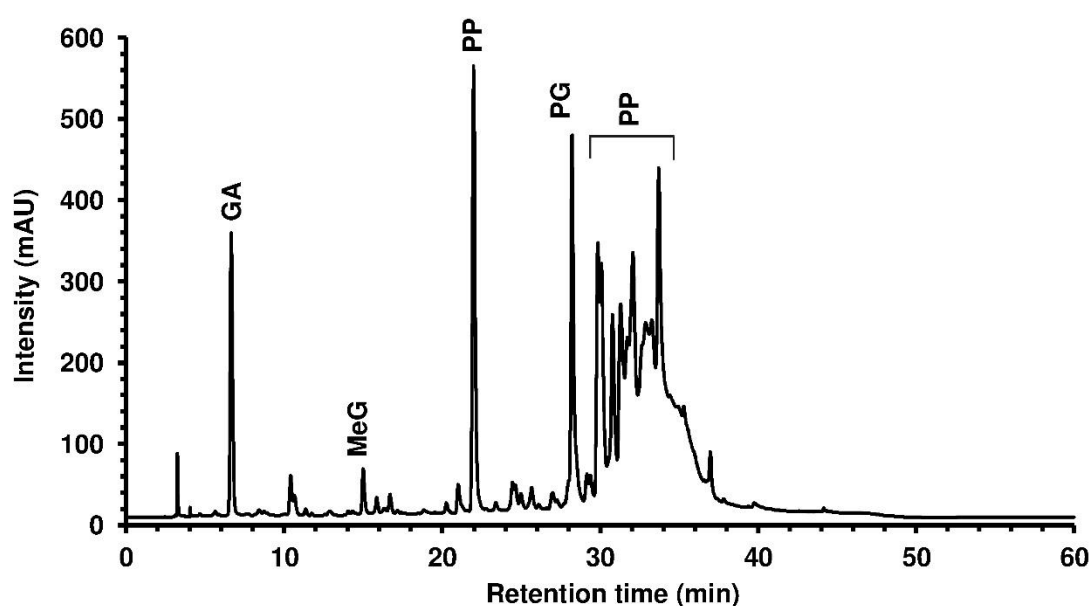
The ST-70 extract was analyzed using techniques such as adsorption column chromatography, thin layer chromatography, partition chromatography (countercurrent chromatography), gas chromatography coupled to mass spectrometry, high performance liquid chromatography (HPLC) and crystallization by traditional methodologies.

Several different methodologies were employed to isolate compounds from *S. terebinthifolius*. Spectrometric and spectroscopic analyses led to the identification of luteolin, quercetin, kaempferol, agathisflavone, gallic acid (GA), methyl gallate (MG), 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose (PG), epicatechin,  $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -amyrin, and lupeol.

The main secondary metabolite constituents in the extract, namely GA and MG, were assigned by HPLC analyses to the respective standard substances based on the similarities of their UV spectra on a diode array detector (DAD) at 220–400 nm and their retention times (6.6 min for GA and 15.0 min for MG). The HPLC chromatograms of ST-70 and the standards are shown in **Fig. 1**. The samples and the standard compounds were prepared in methanol through conventional dilution, and 20  $\mu$ L was injected for analysis. A Supelcosil LC-18 column (250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m) coupled to a Supelcosil LC-18 (4.0 mm  $\times$  20 mm, 5  $\mu$ m) guard-column (Supelco, Bellefonte) was used. The following gradient program of the mobile phase, which consisted of aqueous trifluoroacetic acid at pH 2.5 (A) and methanol/acetonitrile 1:3 v/v (B), was performed at 40°C and 1.0 ml/min: 0-20 min, 3-20% B; 20-30 min, 20-30% B; 30-35 min, 30-50% B; 35-40 min, 50-96% B; 40-45 min, 96-3% B; and 45-60 min, 3% B. Detection was set at 270 nm. Separately, the extract was spiked with the standards to confirm peak assignments. The GA and MG contents of ST-70 were determined based on calibration curves of the standards, which were tested in triplicate to confirm linearity and validity via ANOVA. The range (18.1 to 226  $\mu$ g/ml for GA and 2.0 - 200  $\mu$ g/ml for MG), linearity [ $y_{GA} = 14.24 \times 10^3 \times (\mu\text{g GA/ml})$  at r



= 0.9998,  $y_{MG} = 12.52 \times 10^3 \times (\mu\text{g MG/ml})$  at  $r = 0.9997$ ], precision (relative standard deviation for GA = 2.02 and for MG = 2.07) and limits of quantification (1 and 0.2  $\mu\text{g/ml}$  for GA and MG, respectively) were determined following the International Conference of Harmonization guidelines (ICH, 2005) and literature recommendations (Ribani M et al., 2004). The extract was composed of  $13.7 \pm 0.3$  mg/g of GA and  $2.3 \pm 0.1$  mg/g of MG. A total of  $172 \pm 2.1$  mg/g of eight main polyphenolic components presented UV spectra similar to that of GA, including 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose (PG at  $37.4 \pm 0.9$  mg/g), were estimated by an external calibration versus an MG curve.



**Fig. 1:** HPLC-270 nm chromatogram of the hydroalcoholic extract from *S. terebinthifolius* leaves. GA, gallic acid. MeG, methyl gallate. PG, 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose. PP, other gallic acid derivatives.

### 2.3. Animals

Male Swiss-44 and C57BL/6 mice (20-30 g) from CECAL-FIOCRUZ bioterium were maintained on a 12 h-light/dark cycle with controlled temperature and free access to food and fresh water. All experiments were conducted under license number CEUA LW-43/14 in accordance with the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain and the institutional guidelines for animal use.

#### ***2.4. Treatments***

Mice that were fasted overnight received ST-70 (3.125 - 200 mg/kg) orally (p.o.) in a final volume of 200  $\mu$ l 1 h prior to stimulation. As reference drugs, dexamethasone (10 mg/kg, 100  $\mu$ l) was administered i.p., and potassium diclofenac (100 mg/kg, 200  $\mu$ l) was administered p.o. 1 h prior to stimulation. Equivalent volumes of vehicle were administered to the control groups.

#### ***2.5. Zymosan-induced pleurisy***

Swiss mice were orally pre-treated with diclofenac (100 mg/kg) or different doses of extract (3,125 - 200 mg/kg) 1 h before zymosan-induced pleurisy in order to determine the ST-70 effective dose to reduce inflammation by half (ED<sub>50</sub>). The control group received an i.t. injection of an equal volume of vehicle. The animals were euthanized 4 h after stimulus by carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) inhalation, and their thoracic cavities were washed with 1 ml of PBS containing EDTA (10 mM) at pH 7.4. Total leukocyte counts were performed on all washes from thoracic cavities using an automatic particle counter Z2 Counter (Coulter Z1, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). Differential cell counts were performed under light microscopy (1000x) using cytopsin smears (Cytospin 3, Shandon Inc., Pittsburgh, PA, USA) stained according to the May-Grunwald-Giemsa method. The counts were reported as the numbers of cells ( $\times 10^6$ ) per cavity. Then, pleural washes were centrifuged at  $400 \times g$  for 10 min. Supernatants were stored at -80°C for further EIA and ELISA. The total protein contents of the supernatants were quantified using the Bradford method according to the manufacturer's instructions.

#### ***2.6. Experimental arthritis***

Joint inflammation was induced by intra-articular (i.a.) injection of zymosan (500  $\mu$ g/cavity) that was diluted in sterile saline to a final volume of 25  $\mu$ l, according to the technique of (Conte et al., 2008). Control animals (C57BL/6 mice) received i.a. injections of equal volumes of sterile saline. Knee-joint swelling was evaluated by measuring the transverse diameters of each knee joint using digital calipers (Digmatic Caliper, Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan). Animals were pre-treated 1 h prior with ST-70 (100 mg/kg) or dexamethasone. Values of knee joint thickness were expressed in millimeters (mm) as the difference of the knee-joint diameter before and after the induction of articular inflammation ( $\Delta$ ). After 6 h or 24 h of joint inflammation induction, the mice were euthanized by carbon dioxide inhalation. Knee synovial cavities were washed with 300  $\mu$ l of PBS containing EDTA

(10 mM). Total leukocyte counts were performed in an automatic particle counter Z2 (Coulter Z2, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). Differential cell counts were performed under light microscopy (1000×) using cytopsin smears (Cytospin 3, Shandon Inc., Pittsburgh, PA, USA) stained according to the May-Grunwald-Giemsa method. The counts were reported as numbers of cells per cavity ( $\times 10^5$ ). The synovial washes were centrifuged at  $400 \times g$  for 10 min and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for further analyses.

### ***2.7. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)***

Levels of the CXCL1/KC and IL-6 were evaluated in Swiss mice pleural washes. CXCL1/KC, IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels were quantified in C57BL/6 mice synovial washes by sandwich ELISA using matched antibody pairs from R&D Systems (Quantikine, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions.

### ***2.8. Determination of cytotoxicity***

To investigate the treatment of GA on cellular viability, J77A-4 cells were plated onto black, flat-bottomed 96-well plates at a density of  $2.5 \times 10^6$  cells/well. After 1 h of incubation in a controlled atmosphere (5% CO<sub>2</sub>, 37°C), the cells received fresh medium with or without Tween 20 (3%), DMSO (0.5%) and GA (1, 10 or 100 nM) in a quadruplicate assay. After 21 h of further incubation, 20  $\mu\text{L}$  of an Alamar Blue solution were added to each well. After an additional 3 h, the fluorescence was read on a SpectraMax M5/M5e microplate reader (Molecular Devices;  $k_{\text{exc}}$  555 nm,  $k_{\text{em}}$  585 nm).

### ***2.9. Murine neutrophil purification***

C57BL/6 mice were euthanized, and the femurs from both hind legs were dissected, removed and freed of soft tissue attachments. The distal tip of the femur extremity was excised, and each femur was washed with 2 ml of Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free HBSS–EDTA solution. Cell suspensions were then centrifuged at  $400 \times g$  for 15 min at 20°C and resuspended in 2 ml Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free HBSS–EDTA. The cells were purified via Percoll discontinuous gradient centrifugation (65% and 72% diluted in Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free HBSS–EDTA). Briefly, the cells were centrifuged at  $1200 \times g$  for 35 min at room temperature without braking, and polymorphonuclear cells were recovered from the 65%/72% interface. Then, neutrophils were counted in a Neubauer chamber, identified by cytopsin centrifugation, and followed by Wright-Giemsa coloration according to the manufacturer's instructions.

### ***2.10. Human neutrophil purification***

Human neutrophils were isolated from citrate (3.8%)-treated peripheral venous blood of healthy volunteers using a four-step discontinuous Percoll gradient (Amersham Biosciences, San Francisco, CA, USA). Erythrocytes were removed by hypotonic lysis. Isolated neutrophils (98% purity), estimated to be >96% viable by Trypan blue exclusion, were resuspended in RPMI 1640 medium.

### ***2.11. Chemotaxis assay***

Neutrophil chemotaxis was assayed in a 48-well Boyden chamber (Neuroprobe, Inc. Cabin John, MD, USA) using a 5- $\mu$ m PVP-free polycarbonate filter (Nuclepore, Pleasanton, CA, USA). Briefly, purified murine neutrophils were incubated with ST-70 (500  $\mu$ g/ml) or dexamethasone (50 nM) for 1 h prior to the chemotaxis assay. Then, the cells were centrifuged at  $400 \times g$  for 10 min at room temperature and assayed in a chemotaxis chamber. The bottom wells of the chamber were filled with 29  $\mu$ l of a chemoattractant stimulant, CXCL-1/KC (250 nM). Pre-treated neutrophils ( $1 \times 10^5$  cells/50  $\mu$ l) were seeded in the upper compartment. The chamber was then incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 1 h, and the filter was fixed and stained by Wright-Giemsa coloration according to the manufacturer's instructions. In another set of assays, purified human neutrophils were incubated with one of the main polyphenols of ST-70, GA (100 nM), or dexamethasone (50 nM) for 1 h prior to the chemotaxis assay. Then, the human cells were assayed in chemotaxis chambers, as described above, under fMLP (10  $\mu$ M) stimulation. Neutrophils that had migrated through the membrane were counted under a light microscope (1000  $\times$  magnification) in fifteen random fields. The result is expressed as the mean number of migrated neutrophils per fifteen fields.

### ***2.12. Ulcerogenic activity and survival***

Swiss mice that were fasted for 24 h were orally administered either different doses of ST-70 (100 or 400 mg/kg) or potassium diclofenac (100 mg/kg) diluted in filtered water to a final volume of 200  $\mu$ l. After 5 h, the mice were euthanized. The stomachs were removed, opened along the greater curvature and gently washed with PBS. Gastric lesions were analyzed under a stereoscopic microscope (Olympus, Japan) by a single-blind method. Additionally, Swiss mice received daily p.o. ST-70 (100 mg/kg), potassium diclofenac (100 mg/kg) diluted in filtered water to a final volume of 200  $\mu$ l, or only filtered water (200  $\mu$ l) for twenty days to assess survival rates.

### **2.13. Statistical analysis**

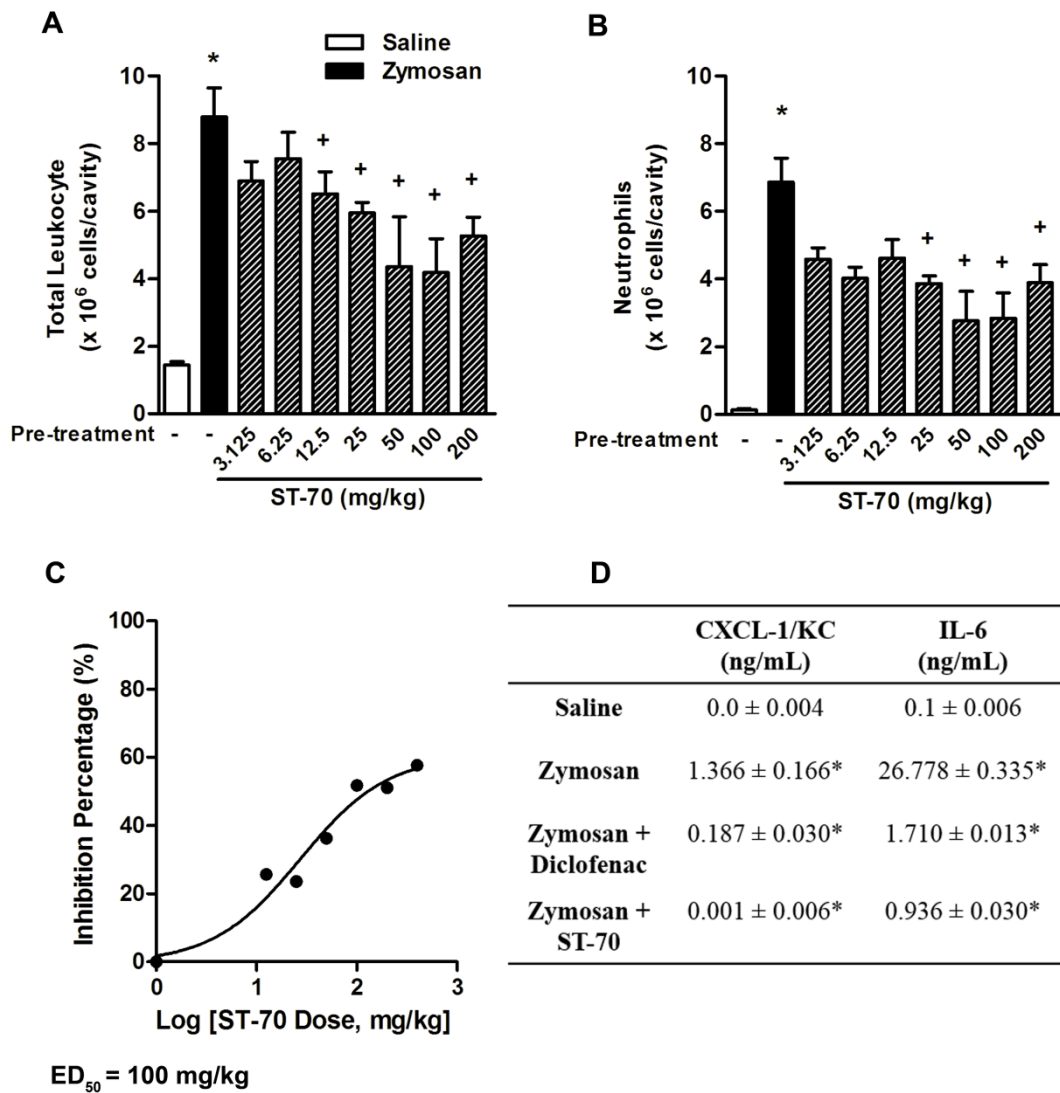
All results are expressed as the means  $\pm$  standard errors of the means (SEM) and were evaluated using one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test. A log-rank (Mantel-Cox) test was used to compare the survival rates. The significance level was set at  $P \leq 0.05$ .

## **3. Results**

### **3.1. ST-70 inhibits leukocyte infiltration and inflammatory mediator production in pleurisy.**

To determine the dose-response effect of ST70, it was applied to zymosan-induced pleurisy. As shown in **Figs. 2A-B**, the oral pre-treatment with different doses of ST-70 (3.125 - 200 mg/kg) significantly inhibited (from 25 mg/kg) the migration into pleural sites of total leukocytes, including neutrophils, 4 h after stimulation in a dose-dependent manner. According to the dose-response curve for leukocyte infiltration, the ED<sub>50</sub> of ST-70 was 100 mg/kg (**Fig. 2C**). Potassium diclofenac, a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID), was used as a reference inhibitor. As was observed with 100 mg/kg ST-70, the oral pre-treatment with 100 mg/kg diclofenac similarly inhibited total leukocyte and neutrophil accumulation (**Fig. S1**).

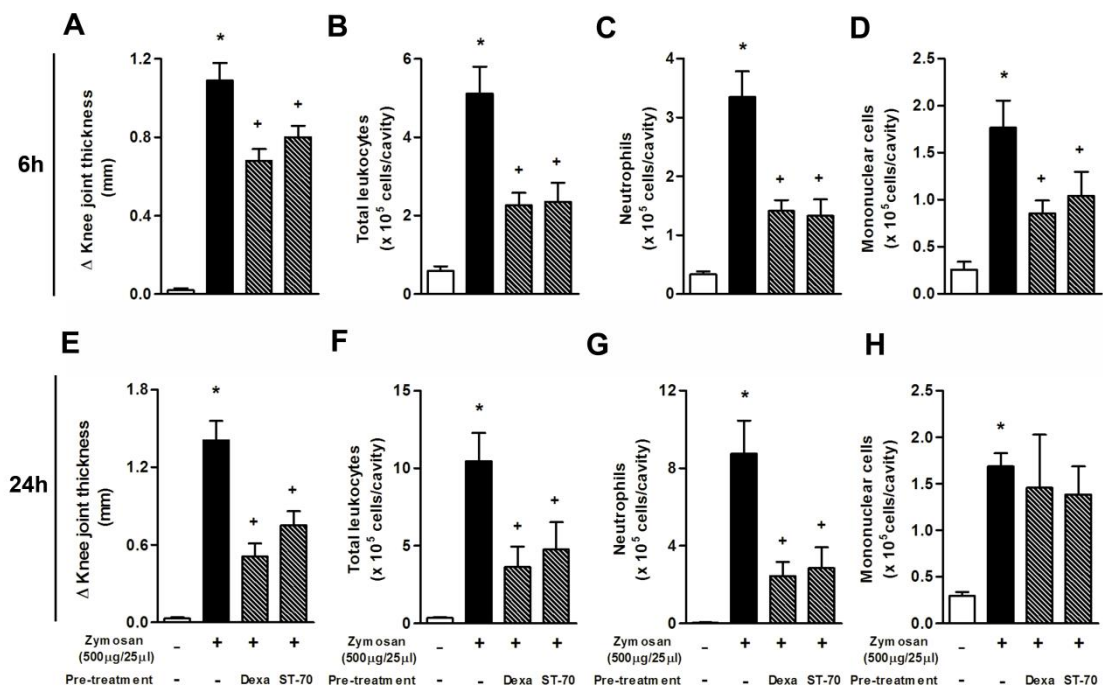
The migration and activation of neutrophils during inflammation results from several events, such as cytokine and chemokine action. In zymosan pleural washes, increased CXCL-1/KC and IL-6 levels were detected when compared with control groups. The oral pre-treatment with ST-70 (100 mg/kg) decreased the concentrations of CXCL-1/KC and IL-6 by 99.92% and 96.52%, respectively (**Fig. 2D**). A smaller decrease was observed after potassium diclofenac (100 mg/kg) pre-treatment (**Fig. 2D**).



**Fig. 2:** Study of the dose-response effect of the hydroalcoholic extract from *S. terebinthifolius* (ST-70) on cell migration and the production of inflammatory mediators. Effect of pre-treatment with ST-70 (3.125 – 200 mg/kg, p.o., 1 h before stimulation) on (A) total leukocyte and (B) neutrophil recruitment were analyzed 4 h after zymosan i.t. injection (100 µg/cavity; black columns). Control animals received saline i.t. injection (100 µl/cavity; white columns). (C) Dose-response log-curve of ST-70 treatment based on neutrophil recruitment analysis; the ED<sub>50</sub> was calculated as 100 mg/kg. (D) CXCL-1/KC and IL-6 production from thoracic cavity washes were measured by ELISA. Data are presented as the means ± SEM (n = 6). Significant differences (P < 0.05) are indicated between stimulated and non-stimulated groups (\*) and between treated and non-treated groups (+).

### 3.2. *ST-70 inhibits neutrophils migration on zymosan-induced arthritis*

We previously reported that the i.a. injection of zymosan (500 µg/cavity) induced an articular inflammatory response after 6 h, which was characterized by a significant increase in edema formation and massive neutrophil influx peaking at 24 h (Conte et al., 2008; Penido et al., 2006). In the present study, the analyses were performed at 6 h and 24 h after stimulation because marked inflammatory reactions were already observed at these time points (**Figs. 3 and 4**). As shown in **Figs. 3A and 3E**, the oral pre-treatment with ST-70 (100 mg/kg) 1 h prior to zymosan injection markedly reduced knee-joint thickness at 6 h and 24 h after stimulation. Notably, the oral treatment with ST-70 induced a similar effect as that achieved via the i.p. administration of dexamethasone (10 mg/kg) (**Figs. 3A and 3E**). The treatments with ST-70 or dexamethasone also inhibited total leukocyte, mononuclear cell and neutrophil infiltration when compared with non-treated mice 6 h after i.a. zymosan injection (**Fig. 3B-D**). However, 24 h after stimulation, the ST-70 pre-treatment inhibited total leukocyte and neutrophil migration but failed to reduce mononuclear cell influx into the synovial cavity (**Figs. 3F-H**). Interestingly, a single oral treatment with ST-70 (100 mg/kg) was able to inhibit edema formation and leukocyte migration at all times analyzed after i.a. zymosan injection. It is noteworthy that ST-70 also inhibited murine neutrophil chemotaxis induced by CXCL-1/KC *in vitro*, demonstrating a direct effect of ST-70 on neutrophils (**Fig. S2**).



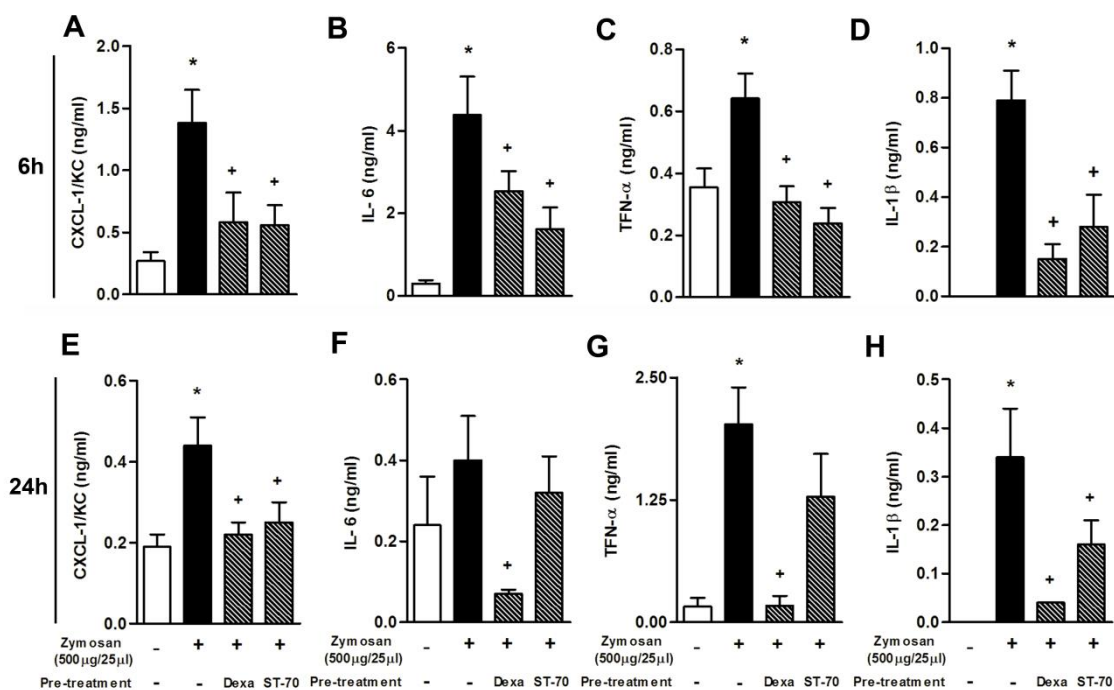
**Fig. 3:** ST-70 effect on edema and leukocyte migration during zymosan-induced arthritis. Knee-joint diameter was measured with a digital caliper, and knee synovial cells were recovered 6 h or 24 h after zymosan stimulation. Pre-treatment with ST-70 (100 mg/kg, p.o., 1 h before stimulation) was analyzed in (A) knee-joint thickness, (B) total leukocyte, (C) neutrophil and (D) mononuclear cell migration 6 h after zymosan i.a. injection (500  $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$ /cavity; black columns) and in (E) knee-joint thickness, (F) total leukocyte, (G) neutrophil and (H) mononuclear cells migration 24 h after zymosan i.a. injection (500  $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$ /cavity; black columns). Control animals received sterile saline i.a. injection (25  $\mu\text{l}$ /cavity; white columns). Dexamethasone (Dexa, 100 mg/kg) was applied i.p. 1 h before stimulation. Data are presented as the means  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ). Significant differences ( $P < 0.05$ ) are indicated between stimulated and non-stimulated groups (\*) and between treated and non-treated groups (+).

### 3.3. ST-70 reduces pro-inflammatory mediators in articular zymosan-injected knee joints

To investigate whether ST-70 exerted its anti-inflammatory effect by modulating the production of inflammatory mediators, we analyzed its effect on the production of CXCL-1/KC, IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . As demonstrated in **Figs. 4A-H**, the articular cavity levels of CXCL-1/KC, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 increased at 6 h and at 24 h after i.a. zymosan injection. ST-70 oral pre-treatment markedly reduced zymosan-induced CXCL-1/KC, IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  production 6 h after i.a. injection (**Figs. 4A-D**). ST-70 (100 mg/kg) only significantly



inhibited CXCL-1/KC and IL-1 $\beta$  production 24 h after i.a. zymosan injection (**Figs. 4E and 4H**). Pre-treatment with dexamethasone reduced the production of CXCL-1/KC, IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  at both time points investigated.

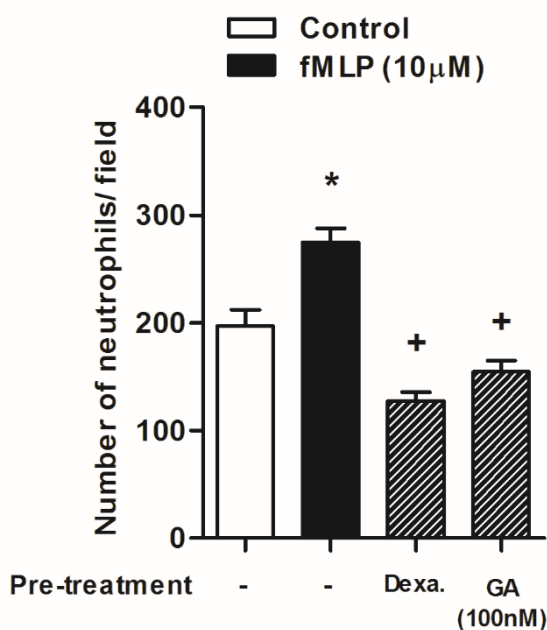


**Fig. 4:** Effect of ST-70 on the production of inflammatory mediators 6 and 24 h after zymosan-induced arthritis. Pre-treatment with ST-70 (100 mg/kg, p.o., 1 h before stimulation) was analyzed in synovial cavity washes collected 6 h or 24 h after zymosan i.a. injection (500  $\mu$ g/25  $\mu$ l/cavity; black columns), and (A and E) CXCL-1/KC, (B and F) IL-6, (C and G) TNF- $\alpha$  and (D and H) IL-1 $\beta$  were measured by ELISA. Dexamethasone (Dexa, 100 mg/kg) was applied i.p. 1 h before stimulation. Data are presented as the means  $\pm$  SEM (n = 7). Significant differences (P < 0.05) are indicated between stimulated and non-stimulated groups (\*) and between treated and non-treated groups (+).

### 3.5. Gallic acid from ST-70 exhibits anti-inflammatory activity

Phytochemical studies revealed that GA is one of the major polyphenol components of the ST-70 extract. To determine whether this substance is responsible for the observed effect on neutrophil migration, we evaluated the effect of GA on human neutrophil chemotaxis. First, the effect of GA (1, 10 and 100 nM) was assessed on cell viability using the resazurin assay; none of tested concentrations were cytotoxic (100 nM  $\geq$ 95% viability). Pre-

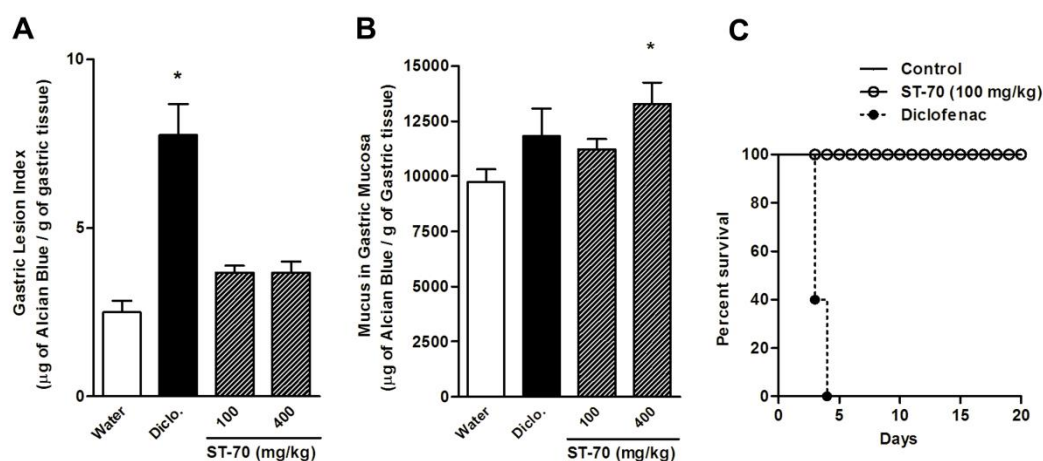
treatment with GA (100 nM) significantly reduced neutrophil chemotaxis (**Fig. 5**). This result suggests that GA is one of the bioactive component present in ST-70 extracts.



**Fig. 5:** Effect of gallic acid (GA) on human neutrophil chemotaxis. Peripheral human neutrophils were isolated and subjected to Boyden chamber chemotaxis assays in response to fMLP stimulation (10 µM; black column). The cells were pre-incubated for 1 h with RPMI (control), dexamethasone (50 nM) or GA (100 nM) before stimulation. Data are presented as the means  $\pm$  SEM (n = 4). Significant differences ( $P < 0.05$ ) are indicated between stimulated and non-stimulated groups (\*) and between treated and non-treated groups (+).

### 3.6. ST-70 does not induce gastric injury or death in mice

As shown in **Fig. 6**, animals that received a single oral dose of sodium diclofenac (100 mg/kg) showed high indices of gastric lesions (**Fig. 6A**) but did not exhibit decreased mucus secretions (**Fig. 6B**). Furthermore, 100% of the mice died up to the fifth day after daily sodium diclofenac oral administration (**Fig. 6C**). However, ST-70 oral administration (100 or 400 mg/kg) induced few gastric lesions when compared with the control group (non-treated animals) and did not decrease the production of mucus secreted in the stomach (**Figs. 6A-B**). Moreover, the animals that received a 400 mg/kg dose displayed increased gastric mucus production. Additionally, the mice that were orally administered ST-70 daily for twenty days remained alive at the end of the experiment (**Fig. 6C**), showing no acute toxicity.



**Fig. 6:** Effect of ST-70 on mice gastric mucosa and survival. Animals received oral administration of ST-70 (100 or 400 mg/kg, 1 h before stimulation), potassium diclofenac (100 mg/kg) or water (200 µl). (A) Gastric lesion index and (B) mucus production in gastric mucosa were analyzed 5 h after oral administration. (C) Survival rates for animals that received daily water (solid line), ST-70 (100 mg/kg; ○) or potassium diclofenac (100 mg/kg; ●). The log-rank test revealed differences in the survival curves between ST-70 and potassium diclofenac oral administration. Data are presented as the means ± SEM (n = 10). Significant differences (P < 0.05) are indicated between animals that received diclofenac and non-treated animals (\*).

#### 4. Discussion

In the present work, we showed that the hydroalcoholic extract from *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves (ST-70) exhibited important anti-inflammatory properties in pleurisy and arthritis, including a marked inhibition of neutrophil influx and reduced inflammatory mediators induced by zymosan. Previous results from our group demonstrated an anti-allergic effect of the ethyl acetate fraction from *S. terebinthifolius* leaves (ST fraction), in which HPLC analysis identified gallic acid, methyl gallate and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose as polyphenol components of ST fraction (Cavalher-Machado et al., 2008). In this work, the ST-fraction was shown to reduce eosinophil migration in allergic pleurisy. To date, the effect of *S. terebinthifolius* on experimental arthritis and neutrophil migration in acute inflammatory responses has not been studied.

Natural products have been tested in a wide range of inflammatory models, including zymosan-induced pleurisy (Penido et al., 2006). In fact, during zymosan-induced inflammatory responses, it is possible to study the mechanisms of phagocytosis, cell migration

and the production of inflammatory mediators (Underhill, 2003). Herein, we performed a dose-response analysis using zymosan-induced pleurisy to pharmacologically investigate the link between ST-70 levels and its effect on inflammatory processes. The ED<sub>50</sub> of ST-70 in the reduction of leukocyte infiltration into the thoracic cavity was calculated to be 100 mg/kg.

Inflammatory signaling in response to zymosan requires nuclear factor (NF)- $\kappa$ B activation. NF- $\kappa$ B is a pivotal regulator in the expression of many pro-inflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6, and chemokines, e.g., CXCL-1/KC (Underhill, 2003), detected at early time points in murine models of inflammation (Ajuebor et al., 1999). Previous reports have shown that TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, and CINC (a member of the  $\alpha$ -CXC chemokine family in rats) were sequentially produced during the early stages of zymosan-induced pleurisy in rats (Utsunomiya et al., 1998). Our results observed the production of IL-6 and CXCL-1/KC 4 h after zymosan intra-thoracic injection in mice. Oral pre-treatments with ST-70 (100 mg/kg) inhibited these pro-inflammatory mediators by more than 70%. Thus, our results suggest that ST-70 reduces neutrophil migration by affecting cytokine and chemokine production.

RA is a disease characterized by neutrophil accumulation. Elevated numbers of neutrophils are found in the synovial fluid of patients with RA. These activated neutrophils secrete proteases that contribute to the destruction of cartilage and related joint structures (Wright et al., 2014). Zymosan-induced arthritis has been used as an experimental model to assess the anti-inflammatory effects of different compounds (Gegout et al., 1995). At early time points following zymosan i.a. stimulation, edema formation was accompanied by massive neutrophil infiltration into the synovial tissue and the fluids of inflamed joints (Conte et al., 2008). Previous reports demonstrated that zymosan i.a. injection in rodents is characterized by a marked increase in knee-joint thickness within 6 h and peaks within 24 h, remaining significantly above control values for 20 days (Penido et al., 2006). Accordingly, we observed that zymosan i.a. injections in mice resulted in a marked increase in knee-joint thickness within 6 h and 24 h, as characterized by protein extravasation into the joint space. This phenomenon was inhibited by ST-70 oral pre-treatment at a dose of 100 mg/kg. However, the mechanism of action of ST-70 in the inhibition of zymosan-induced knee-joint edema remains unknown.

Neutrophils are predominant in the synovial exudates of a variety of inflammatory arthropathies, including rheumatoid arthritis; the participation of these cells in the pathogenesis of tissue lesions has long been recognized (Harris, 1991). However, neutrophils do not seem to be responsible for the perpetuation of chronic synovitis. Neutrophils promote cartilage breakdown and bone resorption by producing important chemicals, such as reactive oxygen and

nitrogen species, lysosomal enzymes and metalloproteases (Hampton et al., 1998). Therefore, strategies to limit neutrophil trafficking or activation have received attention as potential alternatives to treat arthritis. In the present study, neutrophil influx at 6 h and 24 h after zymosan injection was reduced by a single oral dose of ST-70, as observed in synovial washes. Thus, the inhibition of neutrophil migration into the synovial cavity reduced the production of inflammatory mediators and, consequently, tissue damage.

Currently, TNF- $\alpha$  is believed to be the primary mediator in the inflammatory cytokine cascade and in the pathogenesis of RA. TNF- $\alpha$  is primarily produced by activated macrophages in inflamed synovial membrane tissue and induces the production of other pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$  and IL-6, and chemokines, such as CXCL-1, leading to the destruction of articular cartilage (Brennan and McInnes, 2008; van den Berg et al., 1999).

IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  induce neutrophil infiltration when injected into the joints of normal animals. The combination of these cytokines exhibits synergistic activity (Henderson and Pettipher, 1989). A considerable number of studies have shown that blockades of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  reduce inflammation and joint destruction in arthritic animal models (Maini and Taylor, 2000). In clinical studies, antagonism of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  inhibition reduces joint destruction and the signs and symptoms of RA (Bendele et al., 2000). We observed that the i.a. injection of zymosan induced high levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production 6 h and 24 h after stimulation. The oral administration of ST-70 reduced the production of these cytokines at 6 h post stimulus; only IL-1 $\beta$  production was inhibited 24 h after i.a. zymosan injection.

IL-6 displays pleiotropic effects, including effects on the maturation and activation of macrophages, osteoclasts, chondrocytes and endothelial cells. The critical role of IL-6 in the pathogenesis of RA has been demonstrated in clinical trials wherein a specific anti-IL-6 antibody was able to suppress the progression of joint erosion in RA (Brennan and McInnes, 2008). The oral pre-treatment with ST-70 resulted in a significant decrease in IL-6 in the first 6 h after zymosan-induced joint inflammation. In our model, the reduction in IL-6 in the early stages of arthritis seems to be associated with a reduction in edema and cell migration.

The chemokine CXCL-1/KC binds the CXCR1 and CXCR2 receptors, which signal through G-proteins. CXCR2 and CXCR1 signaling plays key roles in neutrophil function, especially in chemotaxis, degranulation, phagocytosis and oxidative burst (Boppana et al., 2014). In our RA experimental model, we observed high levels of CXCL1/KC production and a reduction in the levels of this chemokine after oral pre-treatment with ST-70. Furthermore, neutrophils stimulated with CXCL-1/KC migrated in smaller quantities when pre-incubated with ST-70. Our data suggest that the inhibition in neutrophil tissue accumulation in

the joint cavity may be related to impaired CXCL1/KC generation during zymosan-induced arthritis. Here, we report for the first time a direct inhibition of neutrophil migration in arthritis by a hydroalcoholic extract from *S. terebinthifolius* leaves.

According to previous studies, plant-derived compounds that can modulate the expression of pro-inflammatory signals, such as polyphenols, may have anti-arthritic potential (Khanna et al., 2007). In the present report, the phytochemical analyses of ST-70 revealed the presence of the major polyphenols, GA, methyl gallate and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose. The anti-inflammatory effects of GA have been demonstrated in a few pharmacological studies (Kang et al., 2009). Recently, the mRNA expression levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and IL-6), chemokines (CCL-2/MCP-1 and CCL-7/MCP-3), cyclooxygenase-2, and matrix metalloproteinase-9 by fibroblast-like synoviocytes (FLS) from patients with RA were shown to be suppressed by GA treatment in a dose-dependent manner (Yoon et al., 2013). Therefore, we evaluated the effect of GA from ST-70 on human neutrophil migration to determine 1) whether GA was responsible for the inhibitory action of ST-70 in neutrophil migration and 2) whether this compound was active against human neutrophils. Indeed, the significant reduction of human neutrophil chemotaxis upon pre-incubation with non-cytotoxic GA concentrations and stimulation with fMLP suggests that GA was at least partly responsible for the anti-inflammatory effects of ST-70.

The present study is the first to report an anti-inflammatory role for the hydroalcoholic extracts of *S. terebinthifolius* leaves (ST-70). The long-term oral administration of ST-70 did not induce lethality and gastric damage, in contrast to mice that received potassium diclofenac. This suggests that such an extract could be used to treat inflammatory conditions like arthritis. Plant-derived compounds have been historically valued as a source of anti-inflammatory agents (Calixto et al., 2004) with well-documented therapeutic efficacy and fewer side effects. Hence, the search for new anti-inflammatory drugs from herbal derivatives is justified.

## 5. Conclusion

Taken together, our results demonstrated that ST-70 inhibited leukocyte (primarily neutrophils) migration, cytokine and chemokine production in inflammatory models such as zymosan-induced arthritis. For these reasons, ST-70 may have potential as a phytomedicine for the treatment of inflammatory conditions.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## Acknowledgment

This work was supported by CNPq, CAPES, FAPERJ and PDTIS-FIOCRUZ.

## 6. References

- Ahmed, S., Pakozdi, A., Koch, A.E., 2006. Regulation of interleukin-1beta-induced chemokine production and matrix metalloproteinase 2 activation by epigallocatechin-3-gallate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 54, 2393-2401.
- Ajuebor, M.N., Das, A.M., Virág, L., Flower, R.J., Szabó, C., Perretti, M., 1999. Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. *J Immunol* 162, 1685-1691.
- Bendele, A.M., Chlipala, E.S., Scherrer, J., Frazier, J., Sennello, G., Rich, W.J., Edwards, C.K., 2000. Combination benefit of treatment with the cytokine inhibitors interleukin-1 receptor antagonist and PEGylated soluble tumor necrosis factor receptor type I in animal models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43, 2648-2659.
- Boppana, N.B., Devarajan, A., Gopal, K., Barathan, M., Bakar, S.A., Shankar, E.M., Ebrahim, A.S., Farooq, S.M., 2014. Blockade of CXCR2 signalling: a potential therapeutic target for preventing neutrophil-mediated inflammatory diseases. *Exp Biol Med (Maywood)* 239, 509-518.
- Brennan, F.M., McInnes, I.B., 2008. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 118, 3537-3545.
- Calixto, J.B., Campos, M.M., Otuki, M.F., Santos, A.R., 2004. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med* 70, 93-103.
- Carlini, E.A., Duarte-Almeida, J.M., Rodrigues, E., Tabach, R., 2010. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, pp. 140-146.
- Cavalher-Machado, S.C., Rosas, E.C., Brito, F.e.A., Heringe, A.P., de Oliveira, R.R., Kaplan, M.A., Figueiredo, M.R., Henriques, M., 2008. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *Int Immunopharmacol* 8, 1552-1560.

- Conte, F.e.P., Barja-Fidalgo, C., Verri, W.A., Cunha, F.Q., Rae, G.A., Penido, C., Henriques, M., 2008. Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB<sub>4</sub>, TNF-alpha, and CXCL-1. *J Leukoc Biol* 84, 652-660.
- de Lima, M.R., de Souza Luna, J., dos Santos, A.F., de Andrade, M.C., Sant'Ana, A.E., Genet, J.P., Marquez, B., Neuville, L., Moreau, N., 2006. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 105, 137-147.
- Gegout, P., Gillet, P., Terlain, B., Netter, P., 1995. Zymosan-induced arthritis in rats. II. Effects of anti-inflammatory drugs. *Life Sci* 56, PL389-394.
- Guerrero, A.T., Verri, W.A., Cunha, T.M., Silva, T.A., Schivo, I.R., Dal-Secco, D., Canetti, C., Rocha, F.A., Parada, C.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2008. Involvement of LTB<sub>4</sub> in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE<sub>2</sub>. *J Leukoc Biol* 83, 122-130.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C., 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92, 3007-3017.
- Harris, E.D., 1991. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: its relevance to therapy in the '90s. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 102, 260-268; discussion 268-270.
- Henderson, B., Pettipher, E.R., 1989. Arthritogenic actions of recombinant IL-1 and tumour necrosis factor alpha in the rabbit: evidence for synergistic interactions between cytokines in vivo. *Clin Exp Immunol* 75, 306-310.
- Kalden, J.R., 2002. Expanding role of biologic agents in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* 66, 27-37.
- Kang, M.S., Jang, H.S., Oh, J.S., Yang, K.H., Choi, N.K., Lim, H.S., Kim, S.M., 2009. Effects of methyl gallate and gallic acid on the production of inflammatory mediators interleukin-6 and interleukin-8 by oral epithelial cells stimulated with *Fusobacterium nucleatum*. *J Microbiol* 47, 760-767.
- Khanna, D., Sethi, G., Ahn, K.S., Pandey, M.K., Kunnumakkara, A.B., Sung, B., Aggarwal, A., Aggarwal, B.B., 2007. Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Curr Opin Pharmacol* 7, 344-351.
- Lama, A., Saikia, H., 2011. TARGETED THERAPIES FOR RHEUMATOID ARTHRITIS: A REVIEW, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, pp. 1116-1134
- Maini, R.N., Taylor, P.C., 2000. Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis. *Annu Rev Med* 51, 207-229.
- McInnes, I.B., Schett, G., 2011. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 365, 2205-2219.
- Medeiros, K.C.P., Monteiro, J.C., Diniz, M.F.F.M., Medeiros, I.A., Silva, B.A., Piuvezam, M.R., 2007. Effect of the activity of the brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Raddi in inflammatory models. , *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, pp. 23-28.



- Medzhitov, R., 2010. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140, 771-776.
- Penido, C., Conte, F.P., Chagas, M.S., Rodrigues, C.A., Pereira, J.F., Henriques, M.G., 2006. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. *Inflamm Res* 55, 457-464.
- Pinto, L.G., Cunha, T.M., Vieira, S.M., Lemos, H.P., Verri, W.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2010. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain* 148, 247-256.
- Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, LFC, M., 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* 27, 771-780.
- Roth, S.H., 2012. Coming to terms with nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Drugs* 72, 873-879.
- Schmourlo, G., Mendonça-Filho, R.R., Alviano, C.S., Costa, S.S., 2005. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *J Ethnopharmacol* 96, 563-568.
- Scott, D.L., Wolfe, F., Huizinga, T.W., 2010. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 376, 1094-1108.
- Underhill, D.M., 2003. Macrophage recognition of zymosan particles. *J Endotoxin Res* 9, 176-180.
- Utsunomiya, I., Ito, M., Oh-ishi, S., 1998. Generation of inflammatory cytokines in zymosan-induced pleurisy in rats: TNF induces IL-6 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in vivo. *Cytokine* 10, 956-963.
- van den Berg, W.B., Joosten, L.A., Kollias, G., van De Loo, F.A., 1999. Role of tumour necrosis factor alpha in experimental arthritis: separate activity of interleukin 1beta in chronicity and cartilage destruction. *Ann Rheum Dis* 58 Suppl 1, I40-48.
- Velázquez, E., Tournier, H.A., Mordujovich de Buschiazzi, P., Saavedra, G., Schinella, G.R., 2003. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia* 74, 91-97.
- Wright, H.L., Moots, R.J., Edwards, S.W., 2014. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*.
- Yoon, C.H., Chung, S.J., Lee, S.W., Park, Y.B., Lee, S.K., Park, M.C., 2013. Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Joint Bone Spine* 80, 274-279.