



CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE: UMA REVISÃO DA AÇÃO IMUNOMODULADORA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS¹

Merini, L. R.²; Furtado, S. C.²; Guimarães, M. R.³; Galvão, J. R.⁴; Barcellos, J. F. M.⁵

Resumo

As citocinas dividem-se em três famílias: as Interleucinas (IL), os Interferons (INF) e Fatores de Necrose Tumoral (TNF). As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α estão presentes em níveis elevados nas articulações artríticas tanto em humanos como em animais e desempenham papel fundamental nos processos inflamatórios. O efeito antiartrítico de substâncias bioativas, de origem vegetal ou sintética, tem sido testado em modelos animais de artrite induzida e a expressão de mediadores pró-inflamatórios constitui o método mais utilizado para demonstrar o valor terapêutico dessas substâncias sobre Artrite Induzida por Adjuvante (AIA). Esta revisão de literatura tem como objetivo relacionar essas substâncias testadas, analisar e discutir o método utilizado para confirmação da atividade antiartrítica pelos níveis de citocinas pró-inflamatórias. As citocinas IL-1 β e TNF α desempenham papéis dominantes na mediação da progressão de muitas doenças inflamatórias articulares e são primordiais para o aparecimento dos sinais secundários da artrite em modelos de AIA. Estudos comprovam que citocinas anti-inflamatórias inibem a resposta pró-inflamatória e apresentam resultados positivos no tratamento da Artrite Reumatoide. Demonstrar supressão de citocinas pró-inflamatórias em AIA, por substâncias bioativas, é uma preocupação da comunidade científica a fim de desenvolver novos fármacos com máximo de eficiência e baixa toxicidade.

Palavras-Chave: Citocinas, bioativos, Artrite Reumatoide.

Abstract

Cytokines are divided into three families: the Interleukin (IL), the interferons (IFN) and Tumor Necrosis Factor (TNF). The proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α are present at high levels in arthritic joints in humans and in animals, and play a fundamental role in inflammatory processes. The anti-arthritic effect of bioactive substances, vegetable or from synthetic origin, has been tested in models of adjuvant-induced arthritis and the expression of pro-inflammatory mediators is the preferred method to demonstrate the therapeutic value of adjuvant-induced arthritis (AIA). This review aims to relate these tested substances, analyze and discuss the method used to confirm the anti-arthritic activity through rates of proinflammatory cytokines. The IL-1 β and TNF play dominant roles in mediating the progression of many inflammatory joint diseases and are essential for the appearance of secondary signs of arthritic models in AIA. Studies show that anti-inflammatory cytokines inhibit the proinflammatory response and show positive results in the treatment of rheumatoid arthritis. In AIA an intraperitoneal and oral administration are preferred for testing with bioactive substances. The tested substances had concentrations ranging from 1 to 1000 mg / kg for oral administration, and 0.5 to 10 mg/kg intraperitoneally, and doses greater than 500mg/kg were also identified. Values for intramuscular and subcutaneous doses were found ranging between 0.04 and 0.9 mg / kg. To demonstrate suppression of proinflammatory cytokines in AIA is a concern of the scientific community to develop new drugs with maximum efficiency and low toxicity.

Key-words: Cytokines, bioactives substances, rheumatoid arthritis.

¹ Parte da dissertação de Mestrado da primeira autora, no Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

² Docente UFAM, Instituto de Saúde e Biotecnologia do Médio Solimões, Coari, Amazonas

³ Docente UFAM, Laboratório Anatomia, Manaus, Amazonas, Doutoranda Bases Gerais da Cirurgia – UNESP – Botucatu -SP

⁴ Mestranda Pós Graduação Imunologia Básica e Aplicada, Manaus, Amazonas

⁵ Graduando em Medicina, UFAM, Manaus, Amazonas

⁵ Docente UFAM, Laboratório de Histologia. Orientador no Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – UFAM. Av. Gal. Rodrigo Otávio 3000, Coroado II, Manaus, Amazonas.



1. Introdução

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular com diversas funções metabólicas e endócrinas que participam da inflamação e resposta do sistema imune (ALDHAHI; HAMDY, 2003). Dividem-se em três famílias: as Interleucinas (IL); os Interferons (INF) e os Fatores de Necrose Tumoral (TNF).

Inicialmente eram denominadas linfocinas ou monocinas para indicar a sua origem celular, entretanto atualmente o termo citocinas é o melhor a ser empregado em função de praticamente todas as células nucleadas serem capazes de sintetizar estas moléculas (DINARELLO, 2000).

Algumas IL são produzidas pelas células T, monócitos (macrófagos e Células Apresentadoras de Antígenos – APCs) e células Natural Killer (NK). Os INF dos tipos α , β , e γ são produzidos por células NK e o TNF é produzido por macrófagos, células NK e Células T (MACKINNON, 1999). As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , e TNF- α estão presentes em níveis elevados nas articulações artríticas tanto em humanos como em animais, e desempenham papéis fundamentais nos processos inflamatórios (NAIR; SINGH; GUPTA, 2012).

O efeito antiartrítico de substâncias bioativas, de origem vegetal ou sintética, tem sido testado em modelos animais de artrite induzida e a expressão dos mediadores pró-inflamatórios constitui o método mais utilizado para demonstrar o valor terapêutico sobre Artrite Induzida por Adjuvante (AIA) (MA et al., 2010; NAIR; SINGH; GUPTA, 2011; NAIR; SINGH; GUPTA, 2010; PERERA et al., 2011).

Esta revisão de literatura tem como objetivo relacionar substâncias bioativas e discutir esse método utilizado para confirmação da atividade antiartrítica pelos níveis de citocinas pró-inflamatórias.

1.1 Citocinas pró-inflamatórias

O TNF- α e a IL-1 β são citocinas pleiotrópicas (habilidades de agir em diferentes tipos celulares) de caráter pró-inflamatório e desempenham papel chave na imunopatogenia da AIA, assim como na artrite reumatoide (AR)

gerando degradação da cartilagem e promovendo ativação endotelial e celular (BRENNAN; MCINNES, 2008) (BEVAART, 2010).

As citocinas são reguladores importantes da inflamação sinovial. Os TNF- α e IL-1 têm função de promover respostas inflamatórias induzindo a degradação de cartilagens. A IL-10 funciona principalmente como molécula anti-inflamatória. Embora essa molécula anti-inflamatórias estejam presentes nas articulações reumatoides, na AR progressiva seus níveis são demasiado baixos para neutralizar os efeitos deletérios de citocinas pró-inflamatórias (TAYLOR; MEHTA; TULL, 2010).

1.2. Citocinas na Artrite Reumatoide

As citocinas pró-inflamatórias desempenham papel fundamental nos processos que causam inflamação, destruição articular e comorbidades associadas em doenças como a AR e em modelos experimentais de AIA (BRENNAN; MCINNES, 2008).

No modelo de AIA ocorre proliferação sinovial e destruição da cartilagem e a compreensão do papel dessas citocinas torna-se primordial para o desenvolvimento de alvos terapêuticos na AR. Dentre essas citocinas, TNF α , IL-1 β e IL-6 são citocinas pró-inflamatórias amplamente citadas na literatura como marcadores de atividade anti-inflamatória e rastreamento de agentes antiartríticos (CAMPO et al., 2011; CHANG et al., 2011; NAIR; SINGH; GUPTA, 2012; SUN; WANG; ZHOU, 2011; WANG, J. et al., 2011).

1.3 Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica autoimune caracterizada pelo acúmulo de células inflamatórias na membrana sinovial e consequentemente destruição das articulações (DA MOTA et al., 2012; FUNOVITS et al., 2010; MOTA et al., 2011; WIENS; CORRER; PONTAROLO, 2011).

A característica final da AR é o irreversível dano articular causado pela destruição da cartilagem e erosão óssea das articulações artríticas. Embora o mecanismo molecular exato ainda não tenha sido elucidado, os estudos mostram que as citocinas pró-inflamatórias

desempenham um importante papel no processo patológico da artrite (SMOLEN; STEINER, 2003).

Na AR os fibroblastos sinoviais são ativados por citocinas pró-inflamatórias e proliferam para desenvolver um tecido hiperplásico (*pannus*) que causa danos irreversíveis nas articulações afetadas (NASU et al., 2000).

A caracterização por exames detalhados dos sintomas artríticos em artrite induzida por adjuvante incluem perfis de expressão desregulada de IL-1 β , IL-6 e TNF α , além de exames histológicos e radiológicos (CAI et al., 2006).

1.4 Modelos Experimentais

Segundo (HEGEN et al., 2008) a utilização dos modelos experimentais permite reproduzir aspectos básicos da doença articular humana, contribuindo desta forma para a compreensão do desenvolvimento e da fisiopatologia desta doença, oportunizando o direcionamento para novas condutas terapêuticas e ensaios pré-clínicos de novas terapias medicamentosas.

De acordo com a literatura (CARLSON; JACOBSON, 1999) (JACOBSON et al., 1999) o modelo animal proposto por Stoerk e Pearson tem sido amplamente utilizado na observação da artrite induzida por adjuvante, uma vez que é capaz de reproduzir de forma confiável as alterações inflamatórias e imunológicas, permitindo desta forma a avaliação dos potenciais terapêuticos utilizados no tratamento da artrite reumatoide.

A indução em modelos de AIA foi desenvolvida por Pearson em 1956, em ratos Wistar, sendo este o modelo mais aplicado e reconhecido na literatura (WHITEHOUSE, 2007). No ano de 2012 o modelo completou 56 anos e o número de citações da publicação original de Pearson atingiu a marca de 750 na literatura científica embasando pesquisas em todo o mundo.

Para alguns autores (TAYLOR; MEHTA; TULL, 2010) os modelos animais mais utilizados para AR são o AIA em ratos e Artrite Induzida por Colágeno (CIA) em ratos e camundongos, ressaltando outrora a existência de outros modelos experimentais para testes envolvendo AR.

Estudos realizados por Pearson, em 1956, demonstraram que a AIA pode ser induzida em ratos, camundongos e coelhos, através da inoculação de agentes imunogênicos tais como: *Mycoplasma arthritidis*, *Mycobacterium butyricum* e o *Mycobacterium tuberculosis*. Os microorganismos migram para as articulações e estabelecem uma infecção local, possivelmente, devido a um sítio específico de adesão molecular.

1.5 Artrite Induzida por Adjuvante (AIA)

A artrite induzida por adjuvante é iniciada pela inoculação de Adjuvante Completo de Freund (CFA) na base da cauda dos animais. O CFA é uma mistura viscosa e sem cor, constituída de 85% de óleo mineral, 15% do componente antigênico *Mycobacterium tuberculosis* inativados pelo calor e liofilizados (KNIGHT et al., 1992). A cepa H37Ra do *M. tuberculosis* é amplamente utilizada no preparo do CFA, embora outras cepas tenham sido utilizadas com sucesso (NUNES et al., 2009) (VAN EDEN; WAGENAAR-HILBERS; WAUBEN, 2001).

O modelo de AIA em ratos promove desenvolvimento de poliartrose simétrica, destruição articular, infiltrado inflamatório com envolvimento de células T e hiperplasia sinovial. O dano cartilaginoso é menos severo que na AR apresentando maior destruição óssea. Neste modelo experimental não há produção de fator reumatoide como na doença humana e, eventualmente, pode acometer a pele e o tubo digestório (BEVAART, 2010).

IL-1 β e TNF α desempenham papéis dominantes na mediação da progressão de muitas doenças inflamatórias articulares, incluindo AR no ser humano, AIA em ratos e CIA em ratos e camundongos. Esses dados foram comprovados a partir de estudos com moléculas combinadas anti-IL-1 e anti-TNF para tratamento de artrite autoimune as quais atingiram eficácia superior em comparação com a utilização de uma única classe de anticorpos anticitocina (FEIGE et al., 2000).

Para corroborar com a afirmação de que IL-1 e TNF são primordiais para o aparecimento dos sinais secundários da AR em modelos de AIA, sobretudo no que diz respeito à destruição da cartilagem, estudos comprovam que a citocina anti-inflamatória IL-10 inibe a resposta pró-inflamatória e a utilização da combinação desta



com a IL-4 de ação supressora das funções de macrófagos dependentes de $\text{INF}\gamma$ apresentam resultados positivos no tratamento da AR (VAN DE LOO et al., 1997).

AIA é um modelo animal típico, amplamente utilizado para estudos de doenças autoimunes, AR e inflamação. Este modelo tem sido utilizado para examinar e avaliar medicamentos e ou substâncias bioativas antiartríticas e investigar potenciais alvos terapêuticos para AR.

1.6 Bioprospecção

Prospecção da biodiversidade (bioprospecção) corresponde à pesquisa de substâncias bioativas de organismos selvagens como plantas, animais, micro-organismos e tem sido apontada como uma potencial fonte de financiamento para a conservação da biodiversidade (RAUSSER; SMALL, 2000).

A essência da pesquisa eficiente é a identificação de indícios que permitam o reconhecimento de pistas promissoras a fim de encontrar fontes candidatas para novos produtos.

As florestas tropicais são um dos *habitats* mais diversos e ameaçados do planeta. Esses ecossistemas também têm sido retratados como fonte de futuros remédios, ainda que, encontrar compostos úteis possa ser tanto científica quanto politicamente desafiador. Além disso, a realização de pesquisa em países tropicais com cientistas locais proporciona benefícios imediatos e duradouros para o uso sustentável da biodiversidade (COLEY et al., 2003).

Cerca de 50% dos medicamentos introduzidos no mercado nos últimos 20 anos são derivados direta ou indiretamente a partir de pequenas moléculas biogênicas. No futuro, os produtos naturais continuarão a desempenhar um papel importante como substâncias ativas, moléculas ou modelos para a descoberta e validação de alvos de drogas. O rastreamento de novas drogas derivadas de plantas implica em pesquisas de extratos para a descoberta de compostos novos e uma investigação das suas atividades biológicas (VUORELA et al., 2004).

2 Material e Método

Para esta revisão de literatura verificou-se as publicações dos últimos 12 anos na base de dados PUBMED, utilizando-se os seguintes descritores: “Adjuvant induced arthritis; interleukin-1; tumor necrosis fator”. Nesta busca foram encontrados 3983 artigos, acrescentando-se os operadores booleanos “and” chegou-se a um número de 165 publicações. Após análise dos “abstracts” selecionou-se 46 artigos que atendiam o objetivo desta Revisão: teste com substâncias utilizando-se o modelo AIA e contendo citocinas pró-inflamatórias no resultado.

3 Resultados e Discussões

Tabela 1. Publicações com teste de substâncias potencialmente ativas contra Artrite Induzida por Adjuvante (ANEXO I).

Para estudos com modelo de AIA a administração oral e intraperitoneal são as vias preferenciais para teste com substâncias bioativas. No entanto, a via transdérmica também tem sido utilizada para demonstrar propriedades farmacológicas de diversas plantas, por exemplo, em *Siegesbeckia orientalis*.

As substâncias testadas tiveram concentrações variando de 1 a 1000 mg/kg para administração por via oral, 0,5 e 10mg/kg para via intraperitoneal, sendo que dosagens acima de 500mg/kg também foram identificadas. Para as vias subcutânea e intramuscular foram encontradas doses variando entre 0,04 e 0,9 mg/kg.

O tempo de tratamento dos estudos relacionados foi no mínimo de 10 e no máximo de 30 dias após a indução de artrite e houve ação imunomoduladora para todas as substâncias testadas, marcando, no entanto, uma predileção pelo prazo de 14 dias, em doses diárias.

Este período foi evidenciado por Jiang and Xu, (2003) que observaram sinais de inflamação das articulações no 12º dia após injeção de CFA em 36 dos 39 ratos inoculados. Os ratos escolhidos aleatoriamente foram tratados por 14 dias com extrato aquoso do rizoma da *Smilacis glabrae* e sacrificados para análise imunohistoquímica da membrana sinovial. Os



resultados demonstraram que o tratamento inibiu a produção de citocinas por macrófagos peritoneais.

De fato, como demonstrou Guglielmotti e colaboradores (2002) tratando grupos de animais durante 12, 19 e 26 dias encontrou resultados positivos de 51, 67 e 61%, respectivamente, confirmando redução da atividade inflamatória a partir do 19º dia. AIA, portanto, constitui um modelo com tempo de experimentação relativamente rápido para serem testadas substâncias ativas para o tratamento da artrite.

Nair et al. (2012) avaliaram atividade antiartrítica de *Coriandrum sativum* tratando os animais durante 20 dias, com início no dia zero. Os níveis de citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 no soro foram avaliados, e os resultados mostraram que ratos tratados com o extrato hidro alcóolico produziu um aumento significativo nos níveis séricos de TNF- α dependente da dose em comparação com o controle. Entretanto, a imunohistoquímica da membrana sinovial revelou uma diminuição das citocinas IL-1 β e IL-6 e de TNF-R (receptor de TNF- α) nos animais tratados na dose de 32mg/kg em comparação com o controle, hipotetizando que a redução dos receptores de TNF- α na membrana sinovial inibe os danos da artrite mesmo que TNF- α sérico esteja aumentado.

Anteriormente, Nair et al., (2010) testando extrato hidro alcóolico de *Terminalia chebula* já havia demonstrado que a atividade antiartrítica, era em parte, devido ao seu efeito modulador sobre a expressão das citocinas pró-inflamatórias na sinóvia.

Sun e colaboradores (2011) trataram animais diariamente com extrato seco de *Caesalpinia sappan* a partir do 16º dia após a indução e continuou durante 10 dias consecutivos. Na quantificação de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α verificaram que a administração oral não só suprimiu a superprodução de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no soro, mas também suprimiu a expressão de COX-2 e Fator de transcrição (NF- $\kappa\beta$) na cartilagem das patas de ratos artríticos, sugerindo eficácia do extrato em AR e outras doenças artríticas.

O tratamento com Curcumina a partir do 21º dia após a indução da artrite, administrado em dose diária por duas semanas promoveu *down-*

regulation no escore clínico da artrite, na proliferação de células T esplênicas, e nos níveis de expressão de TNF- α e IL-1 β na articulação do joelho (MOON et al., 2010). Da mesma forma, Chen et al. (2010) também demonstraram diminuição dos níveis destas citocinas nos tecidos sinoviais, após tratamento com flavonoides da casca da laranja.

O tratamento com *Kalpaamruthaa* e extrato do leite da castanha de *Semecarpus anacardium* realizado por 14 dias diminuíram a inflamação nas articulações do joelho e a destruição da cartilagem e osso via *down-regulation* sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β (MYTHILYPRIYA; SHANTHI; SACHDANANDAM, 2009b).

Testes de viabilidade celular usando a técnica de MTT (Azul de Tetrazólio) em culturas de sinoviócitos foram usados para avaliar a ação da proteína do colágeno tipo II de *Zaocys utilis* e Imunoglucan, um beta-(1,3/1,6)-D-glucan (PANG et al., 2009) e glucosídeos de *Paeoniae radix* Zhu et al., (2005). Ambos inibiram as atividades do TNF- α e da IL-1 β .

O tratamento com kireanol isolado do extrato de *Siegesbeckia orientalis* foi aplicado topicamente na superfície plantar com início 24h antes da injeção de CFA e prosseguiu até 12 dias após a indução e os resultados demonstraram efeito anti-inflamatório similar ao efeito do piroxican gel usado como controle (WANG et al., 2011).

Yeom e colaboradores (2006) iniciaram tratamento com injeção subcutânea de *Ephedra sinica* no 12º dia após a injeção do adjuvante aplicando-se, em ambas as patas, uma vez por dia, durante 15 dias consecutivos o acupoint ST36 (localizado perto da articulação do joelho da pata traseira). Constataram redução da expressão de RNAm de TNF- α , IL-1 β e IL-6 na articulação do joelho de ratos artríticos tratados comparados com ratos artríticos não tratados. Concluíram que o efeito antiartrítico da técnica de erva acupuntura foi atribuída não apenas a ação farmacológica, mas também pela estimulação da injeção no acuponto.

4 Conclusões

Citocinas pró-inflamatórias desempenham papéis importantes na patogênese da AR e a modulação de suas sínteses pode ser eficaz na terapia para tratamento de doenças autoimunes.



A chamada terapia biológica, tem ainda, efeito supressivo (não-curativo), com possível toxicidade, alto custo e inconveniência por tratar-se de proteínas necessariamente parenterais (WOOD; O'DELL, 2004). Isto, talvez justifique o interesse, sobretudo dos países em desenvolvimento, por produtos naturais com ação imunomoduladora para AR.

Ensaio pré-clínicos (fase I) publicados na última década têm mostrado um interesse crescente em testes com substâncias potencialmente ativas contra AR, utilizando-se o modelo AIA. Dentre essas substâncias, os compostos de origem vegetal merecem destaque, considerando o fato de que países como: Índia, Coréia, China e Paquistão fazem da utilização da biodiversidade uma alternativa para tratar doenças sistêmicas como artrite reumatoide.

Desta forma, demonstrar a supressão de citocinas pró-inflamatórias em modelos de artrite tem sido uma preocupação da comunidade científica a fim de desenvolver novos fármacos para tratar artrite reumatoide com o máximo de eficiência e baixa toxicidade.

Divulgação

Este artigo é inédito e, portanto, não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

ALDHAHI, W.; HAMDY, O. Adipokines, inflammation, and the endothelium in diabetes. **Current diabetes reports**, v. 3, n. 4, p. 293-298, 2003.

BAUEROVA, K. et al. Study of new ways of supplementary and combinatory therapy of rheumatoid arthritis with immunomodulators. Glucosaminan and Imunoglukan® in adjuvant arthritis. **Toxicology and Industrial Health**, v. 25, n. 4-5, p. 329-335, 2009.

BEVAART, L. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, n. 8, p. 2192-2205, 2010.

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

CAI, X. et al. The comparative study of Sprague-Dawley and Lewis rats in adjuvant-induced arthritis. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 373, n. 2, p. 140-147, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00210-006-0062-5>>.

CAI, X. et al. Suppressive effects of QFGJS, a preparation from an anti-arthritic herbal formula, on rat experimental adjuvant-induced arthritis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 337, n. 2, p. 586-594, 2005.

CAMPO, G. M. et al. Hyaluronan reduces inflammation in experimental arthritis by modulating TLR-2 and TLR-4 cartilage expression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, 2011.

CARLSON, R. P.; JACOBSON, P. B. Comparison of adjuvant and streptococcal cell wall-induced arthritis in the rat. **In vivo models of inflammation**. Basel: Birkhauser Verlag, p. 1-50, 1999.

CHANG, Y. et al. Effects and mechanisms of total glucosides of paeony on synoviocytes activities in rat collagen-induced arthritis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 43-48, 2009.

CHANG, Y. et al. Paeoniflorin inhibits function of synoviocytes pretreated by rIL-1 [alpha] and regulates EP4 receptor expression. **Journal of ethnopharmacology**, 2011.

CHEN, D.; MENG, M.; GU, L. Experimental study on anti-arthritis effect of jiawei mufangji decoction in rats. **Chinese journal of integrated traditional and Western medicine**, v. 25, n. 8, p. 727, 2005.

CHEN, G.; YIN, Z.; ZHENG, X. Effect and mechanism of total flavonoids of orange peel on rat adjuvant arthritis. **China journal of Chinese materia medica**, v. 35, n. 10, p. 1298, 2010.

COLEY, P. D. et al. Using ecological criteria to design plant collection strategies for drug discovery. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 1, n. 8, p. 421-428, 2003.

DA MOTA, L. M. H. et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. **Rev Bras Reumatol**, v. 52, n. 2, p. 135-174, 2012.



DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **CHEST Journal**, v. 118, n. 2, p. 503-508, 2000.

DONGMEI, Y. et al. Prostaglandin E 2 binding peptide screened by phage displaying: a new therapeutic strategy in rheumatoid arthritis. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, 2011.

FAN, A. et al. Effects of an acetone extract of *Boswellia carterii* Birdw.(Burseraceae) gum resin on adjuvant-induced arthritis in lewis rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 101, n. 1-3, p. 104-109, 2005.

FEIGE, U. et al. Anti-interleukin-1 and anti-tumor necrosis factor- α synergistically inhibit adjuvant arthritis in Lewis rats. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, n. 10, p. 1457-1470, 2000.

FUNOVITS, J. et al. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: methodological report phase I. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 69, n. 9, p. 1589-1595, 2010.

GAO, Q. et al. Therapeutic effects of daphnetin on adjuvant-induced arthritic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 259-263, 2008.

GUGLIELMOTTI, A. et al. Amelioration of rat adjuvant arthritis by therapeutic treatment with bindarit, an inhibitor of MCP-1 and TNF- α production. **Inflammation Research**, v. 51, n. 5, p. 252-258, 2002.

HEGEN, M. et al. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 67, n. 11, p. 1505-1515, 2008.

JACOBSON, P. B. et al. A new spin on an old model: in vivo evaluation of disease progression by magnetic resonance imaging with respect to standard inflammatory parameters and histopathology in the adjuvant arthritic rat. **Arthritis & Rheumatism**, v. 42, n. 10, p. 2060-2073, 1999.

JAWED, H. et al. N-(2-hydroxy phenyl) acetamide inhibits inflammation-related cytokines and ROS in adjuvant-induced arthritic (AIA) rats. **International immunopharmacology**, v. 10, n. 8, p. 900-905, 2010.

JIANG, J.; XU, Q. Immunomodulatory activity of the aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 85, n. 1, p. 53-59, 2003.

JIANG, J. B. et al. Therapeutic effects of astragalus polysaccharides on inflammation and synovial apoptosis in rats with adjuvant-induced arthritis. **International journal of rheumatic diseases**, v. 13, n. 4, p. 396-405, 2010.

KNIGHT, B. et al. Induction of adjuvant arthritis in mice. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 90, n. 3, p. 459-465, 1992.

LEE, C.; BUTT, Y. A lipid extract of *Perna canaliculus* affects the expression of pro-inflammatory cytokines in a rat adjuvant-induced arthritis model. **European Annals of Allergy and Clinical Immunology**, v. 40, n. 4, p. 148-155, 2008.

LEE, J. D. et al. Flavonol-rich RVHxR from *Rhus verniciflua* Stokes and its major compound fisetin inhibits inflammation-related cytokines and angiogenic factor in rheumatoid arthritic fibroblast-like synovial cells and in vivo models. **International immunopharmacology**, v. 9, n. 3, p. 268-276, 2009.

LEVY, A.; SIMON, O. Six-shogaol inhibits production of tumour necrosis factor alpha, interleukin-1 beta and nitric oxide from lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **West Indian Medical Journal**, v. 58, n. 4, p. 295, 2009.

LI, H. et al. Therapeutic effect of tripterine on adjuvant arthritis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 479-484, 2008.

LI, R. et al. Suppression of adjuvant arthritis by hesperidin in rats and its mechanisms. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 2, p. 221-228, 2008.

LI, W. D. et al. Dynamic effects of leflunomide on IL-1, IL-6, and TNF- α activity produced from peritoneal macrophages in adjuvant arthritis rats. **Acta Pharmacol Sin**, v. 23, n. 8, p. 752-756, 2002.

LIU, Y. et al. Suppression of complete Freund's adjuvant-induced adjuvant arthritis by cobra toxin. **Acta pharmacologica sinica**, v. 30, n. 2, p. 219-227, 2009.

MA, Y. et al. (Z)-5-(4-methoxybenzylidene) thiazolidine-2, 4-dione ameliorates the adjuvant-induced arthritis via inhibiting the migration of macrophage and down-regulating the cytokine mRNA expression. **International immunopharmacology**, v. 10, n. 11, p. 1456-1462, 2010.

MACKINNON, L. T. **Advances in exercise immunology**. Human Kinetics Publishers, 1999.



MAHAJAN, S. G.; MALI, R. G.; MEHTA, A. A. Protective effect of ethanolic extract of seeds of *Moringa oleifera* Lam. against inflammation associated with development of arthritis in rats. **Journal of immunotoxicology**, v. 4, n. 1, p. 39-47, 2007.

MOON, D. O. et al. Curcumin attenuates inflammatory response in IL-1 [beta]-induced human synovial fibroblasts and collagen-induced arthritis in mouse model. **International immunopharmacology**, v. 10, n. 5, p. 605-610, 2010.

MOTA, L. M. H. et al. 2011 Consensus of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and early assessment of rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 3, p. 207-219, 2011.

MYTHILYPRIYA, R.; SHANTHI, P.; SACHDANANDAM, P. Ameliorating effect of Kalpaamruthaa, a Siddha preparation in adjuvant induced arthritis in rats with reference to changes in proinflammatory cytokines and acute phase proteins. **Chemico-biological interactions**, v. 179, n. 2-3, p. 335-343, 2009a.

MYTHILYPRIYA, R.; SHANTHI, P.; SACHDANANDAM, P. Ameliorating effect of Kalpaamruthaa, a Siddha preparation in adjuvant induced arthritis in rats with reference to changes in proinflammatory cytokines and acute phase proteins. **Chemico-biological interactions**, v. 179, n. 2, p. 335-343, 2009b.

NAIR, V.; SINGH, S.; GUPTA, Y. Evaluation of the disease modifying activity of *Colchicum luteum* Baker in experimental arthritis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 303-307, 2011.

NAIR, V.; SINGH, S.; GUPTA, Y. K. Evaluation of disease modifying activity of *Coriandrum sativum* in experimental models. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 135, n. 2, p. 240, 2012.

NAIR, V.; SINGH, S.; GUPTA, Y. K. Anti-arthritis and disease modifying activity of *Terminalia chebula* Retz. in experimental models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 12, p. 1801-1806, 2010.

NASU, K. et al. Adenoviral transfer of cyclin-dependent kinase inhibitor genes suppresses collagen-induced arthritis in mice. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 12, p. 7246, 2000.

NUNES, M. V. et al. Comparação do Perfil de Anticorpos Anti-imunoglobulina G em murinos imunizados com IgG humana associada a diferentes

adjuvantes. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 1, 2009.

PANG, J. et al. The effect of the type II collagen protein from *Zoocys* on cytokines production by synoviocytes in rats with adjuvant arthritis. **Journal of Chinese medicinal materials**, v. 32, n. 4, p. 556, 2009.

PERERA, P. K. et al. Ex vivo and in vivo effect of Chinese herbal pill Yi Shen Juan Bi (YJB) on experimental arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 1, p. 171-175, 2011.

RAUSSER, G.; SMALL, A. Valuing research leads: bioprospecting and the conservation of genetic resources. **Available at SSRN 200528**, 2000.

SIRISH KUMAR, I. et al. Swertia chirayita Mediated Modulation of Interleukin-1 β Interleukin-6, Interleukin-10, Interferon- γ , and Tumor Necrosis Factor- α in Arthritic Mice. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 25, n. 4, p. 573-583, 2003.

SMOLEN, J. S.; STEINER, G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 6, p. 473-488, 2003.

SONG, Y.; LI, Y.; ZHANG, H. Therapeutic effect of syringin on adjuvant arthritis in rats and its mechanisms. **Acta pharmaceutica Sinica**, v. 45, n. 8, p. 1006, 2010.

SUN, S. Q.; WANG, Y. Z.; ZHOU, Y. B. Extract of the dried heart wood of *Caesalpinia sappan* L. attenuates collagen-induced arthritis. **Journal of ethnopharmacology**, 2011.

TAYLOR, P. C.; MEHTA, P.; TULL, T. Aetiopathology of rheumatoid arthritis. **Medicine**, v. 38, n. 4, p. 163-166, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135730390900365X>>.

TEKEOGLU, I. et al. Effects of thymoquinone (volatile oil of black cumin) on rheumatoid arthritis in rat models. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 9, p. 895-897, 2007.

VAN DE LOO, F. et al. Interleukin-6 reduces cartilage destruction during experimental arthritis. A study in interleukin-6-deficient mice. **The American journal of pathology**, v. 151, n. 1, p. 177, 1997.

VAN EDEN, W.; WAGENAAR-HILBERS, J. P. A.; WAUBEN, M. H. M. Adjuvant Arthritis in the Rat. In: (Ed.). **Current Protocols in Immunology**: John Wiley & Sons, Inc., 2001.



VUORELA, P. et al. Natural products in the process of finding new drug candidates. **Current medicinal chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1375-1389, 2004.

WANG, J. et al. Topical anti-inflammatory and analgesic activity of kirenol isolated from *Siegesbeckia orientalis*. **Journal of ethnopharmacology**, 2011.

WANG, L. et al. Effects of yunke (technetium 99 conjugated with methylene diphosphate; 99Tc MDP) and/or colloidal chromic phosphate phosphonium 32, alone and in combination, in rats with adjuvant arthritis. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, n. 1, p. 23-28, 2008.

WHITEHOUSE, M. Adjuvant arthritis 50 years on: The impact of the 1956 article by CM Pearson, 'Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants'. **Inflammation Research**, v. 56, n. 4, p. 133-138, 2007.

WIENS, A.; CORRER, C. J.; PONTAROLO, R. Aspectos Clínicos e Terapêuticos da Artrite Reumatoide. **Visão Acadêmica**, v. 10, n. 1, 2011.

WOOD, A. J. J.; O'DELL, J. R. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 25, p. 2591-2602, 2004.

YEOM, M. J. et al. Anti-arthritis Effects of *Ephedra sinica* S TAPF Herb-Acupuncture: Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Adjuvant-Induced Polyarthritis. **Journal of pharmacological sciences**, v. 100, n. 1, p. 41-50, 2006.

YONGHONG, H. et al. Effect of triptolide on expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand in rat adjuvant induced arthritis. **Journal of Huazhong University of Science and Technology--Medical Sciences--**, v. 26, n. 3, p. 344-346, 2006.

ZHANG, R. X. et al. Extract of the Chinese herbal formula Huo Luo Xiao Ling Dan inhibited adjuvant arthritis in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 121, n. 3, p. 366-371, 2009.

ZHENG, Y. Q.; WEI, W. Total glucosides of paeony suppresses adjuvant arthritis in rats and intervenes cytokine-signaling between different types of synoviocytes. **International immunopharmacology**, v. 5, n. 10, p. 1560-1573, 2005.

ZHU, L. et al. Effects and mechanisms of total glucosides of paeony on joint damage in rat collagen-induced arthritis. **Inflammation Research**, v. 54, n. 5, p. 211-220, 2005.

ANEXO I

Quadro 1. Publicações com teste de substâncias potencialmente ativas contra Artrite Induzida por Adjuvante.

Referência	Substância Testada	Via/Método	Dose de administração	Resultado
(NAIR; SINGH; GUPTA, 2012)	Extrato hidroalcoólico de semente de <i>Coriandrum sativum</i>	Oral	8, 16 e 32 mg/kg	A expressão sinovial de citocinas pro-inflamatórias mostrou-se inferior nos grupos tratados com CSHE.
(CHANG et al., 2011)	Paeniflorina	Oral	2.5, 12.5, 62.5 µg/ml	Tratamento diminuiu a produção de IL-1 e TNF- α .
(WANG et al., 2011)	Kirenol isolado do extrato de <i>Siegesbeckia orientalis</i>	Transdérmica	0.3g creme a 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% e 0.5%	O efeito anti-inflamatório do Kirenol foi similar ao efeito do piroxicam gel.
(CAMPO et al., 2011)	Hialuronan	Intra-peritoneal	1.0 mL/kg	O tratamento diminuiu todos os parâmetros que haviam sofrido regulação positiva pela CIA.
(SUN; WANG; ZHOU, 2011)	Extrato seco do cerne da <i>Caesalpinia sappan L.</i>	Oral	1.2, 2.4 e 3.6 g/kg	Atenuou a CIA e reduziu os níveis séricos de IL-1 β , IL-6, TNF- α .
(DONGMEI et al., 2011)	Prostaglandina E(2)	Intra-peritoneal	10, 20, e 40 µg/kg	A expressão de TNF- α e IL-1 β foi reduzida após o tratamento.
(PERERA et al., 2011)	Yi Shen Juan Bi (YJB)	Intra-peritoneal	0.6, 1.2 e 2.4g/kg	Diminuiu a produção de macrófagos peritoneais atraídos por TNF- α , IL-1 e NO.
(NAIR; SINGH; GUPTA, 2012)	<i>Colchicum luteum</i>	Oral	17, 34 e 68 mg/kg	O nível de TNF- α sérico foi reduzido de maneira dose-dependente em todos os grupos tratados.
(NAIR; SINGH; GUPTA, 2010)	Extrato hidroalcoólico de <i>Terminalia chebula</i>	Oral	2.000 mg/kg	O tratamento reduziu o nível de TNF- α sérico e a expressão sinovial de TNF-R1, IL-6 e IL-1 β .
(MA et al., 2010)	(Z)-5-(4-metoxbenzilideno) tiazolidino-2, 4-diona	Oral	50 mg/kg	Houve inibição da produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 séricas.
(JIANG et al., 2010)	Polissacarídeos ativos da raiz de astragalus (<i>Radix astrogali</i>)	Oral	1000, 500 e 250 mg/kg	O tratamento reduziu indicadores de artrite nas articulações e concentrações de TNF- α e IL1- β séricos de maneira dose-dependente.
(JAWED et al., 2010)	N-(2-hidroxifenil) acetamida	Intra-peritoneal	5 e 10mg/kg	Os níveis de IL-1 beta e TNF- α séricos foram reduzidos.
(SONG; LI; ZHANG, 2010)	Siringina	Oral		Houve supressão da proliferação de linfócitos e produção de IL-2 por linfócitos esplênicos. O tratamento causou regulação negativa de IL-1 β , TNF- α .

Continuação do Quadro 1

(MOON et al., 2010)	Curcumina	Intra-peritoneal	50mg	Regulação negativa no escore clínico da artrite, proliferação de células T esplênicas, níveis de expressão do TNF- α e IL-1 β na articulação do joelho.
(CHEN; YIN; ZHENG, 2010)	Flavonoides da casca da laranja (TFO)	Indisponível	75 e 150mg/kg	A elevação anormal de TNF- α , IL-1 β e PGE2 séricos e a expressão de COX-2 em tecidos sinoviais foram reprimidos.
(LEVY; SIMON, 2009)	6-shogaol (composto do gengibre)	<i>in vitro</i>	2, 10 e 20 μ g	O tratamento inibiu a produção de NO, IL-1 β e TNF- α a partir de macrófagos RAW264.7 LPS ativados.
(MYTHILYPRIYA; SHANTHI; SACHDANANDA M, 2009a)	<i>Kalpaamrutha</i> e extrato do leite da castanha de <i>Semecarpus anacardium</i>	Oral	150 mg/kg	Ambos regularam a inflamação nas articulações do joelho e a destruição de cartilagem e osso via regulação negativa sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β .
(BAUEROVA et al., 2009)	Glucomanan isolado da <i>Candida pleurotus ostreatus</i>	Oral	15 mg/kg	Efeito imunomodulador positivo sobre todos os níveis de citocinas no plasma.
(PANG et al., 2009)	Proteína do colágeno tipo II de <i>Zoocys utilis</i> e Imunoglucono	Oral	Indisponível	O tratamento com baixas e altas doses suprimiu a atividade de TNF- α e IL-1 β produzidos por sinoviócitos.
(LEE et al., 2009)	<i>Rhus verniciflua</i>	Oral	50, 100 e 200 mg/kg	Atividades anti-inflamatórias sobre a permeabilidade vascular, migração de leucócitos e imunidade celular.
(LIU et al., 2009)	Cobratoxina	Intra-peritoneal	8.5 e 17.0 μ g/kg	Reduziu a produção de TNF- α , IL-1, e IL-2 mas, aumentou a produção de IL-10.
(ZHANG et al., 2009)	Extrato de 11 ervas (HLXL)	Oral	2.3 e 4.6 g/kg	Diminuiu os escores de artrite e os níveis de TNF- α e IL-1 β .
(CHANG et al., 2009)	Glicosídeos do paeoni (extraído da <i>Paeonialacti flora Pall</i>)	Cultura de Células	12,5; 62,5 e 312,5 μ g/ml	O extrato bioativo inibiu a proliferação de sinoviócitos, diminuiu a produção de IL-1, TNF- α e PGE(2) e elevou os níveis de cAMP.
(LEE; BUTT, 2008)	Extrato lipídico de <i>Perna canaliculus</i> (Liprinol)	Oral	25 mg/kg	Diminuição dos níveis de expressão de TNF- α e IFN- γ . Os níveis de IL-6 e IL1- α também foram diminuídos.
(GAO et al., 2008)	Dafnetina	Oral	2.25 e 4.5mg/kg	Redução na produção de IL-1, TNF- α e MIF (Fator inibitório de migração) no soro.

Continuação do Quadro 1

(LI et al., 2008)	<i>Tripterygium wilfordii</i> Hoog f.	Oral	5, 10 e 20 mg/kg	Efeitos associados com a redução da expressão de mRNA de IL-1 β na membrana sinovial da articulação do joelho e a expressão de mRNA de TNF- α nas patas homogeneizadas de ratos com AIA.
(LI et al., 2008)	Hesperidina	Oral	40 mg/kg	Restaurou a supressão proliferativa de Linfócitos T e produção de IL-2, e causou regulação negativa da produção de IL-1, IL-6 e TNF- α pelos macrófagos peritoneais.
(WANG et al., 2008)	yunke (techcetium 99 conjugado com disfonato de metileno; 99T MDP)	Intra-articular e Intra-peritoneal	0.0025 μ g/kg	O tratamento combinado foi mais efetivo em diminuir o TNF sérico e IL-1 β do que o coloide isolado (32)P.
(MAHAJAN; MALI; MEHTA, 2007)	Extrato etanólico da semente de <i>Moringa oleifera</i> Lam.	Indisponível	Indisponível	Níveis séricos de TNF- α , IL-1 e IL-6 mostraram-se diminuídos.
(TEKEOGLU et al., 2007)	Timoquinona (extraído da semente de <i>Nigella sativa</i>)	Oral	2.5 mg/kg e 5 mg/kg	Timoquinona confirmou clínica e radiologicamente, a supressão da AIA em ratos.
(YONGHONG et al., 2006)	Triptolídeo	Intra-muscular	0.04 mg/kg	Os níveis de expressão de RANKL no líquido sinovial e no osso, e o nível de OPG (osteoprotegerina) no líquido sinovial foram inferiores no grupo tratado.
(YEOM et al., 2006)	<i>Ephedra sinica</i> STAPF	Injeção subcutânea na articulação do joelho	50 μ L	As expressões dos genes mRNA de TNF- α e IL-6 foram restaurados para os níveis normais durante o tratamento.
(CAI et al., 2005)	QFGJS (preparação farmacêutica de ervas)	Oral	0.97, 1.94, e 3.89 g/kg	Os níveis séricos de TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram diminuídos.
(FAN et al., 2005)	Extrato de <i>Boswellia carterii</i> Birdw. (Burseraceae)	Subcutânea e Oral (i.g)	0.90 g/kg	O tratamento diminuiu o escore da artrite e também suprimiu TNF- α e IL-1 β de tecidos locais.
(ZHENG; WEI, 2005)	Paeoni (TGP) extraído da raiz de <i>Paeonialacti flora</i> Pall.	Oral	25, 50 e 100 mg kg	Diminuiu a produção de IL-1, PGE2 TNF- α por sinoviócitos macrófagos-like.
(CHEN; MENG; GU, 2005)	<i>Jiawu mufangji</i> por decocção	Oral	Indisponível	Inibiu a proliferação de sinóvia, e diminuiu os níveis séricos de IL-1 β e TNF- α .
(ZHU et al., 2005)	Paeoni (TGP)	Oral.	25, 50, 100 mg/kg	Os níveis de IL-1 e TNF- α produzidos por sinoviócitos macrófago-like foram inferiores nos ratos tratados.
(SIRISH KUMAR et al., 2003)	Extrato aquoso de <i>Swertia chirayita</i>	Oral	Indisponível	Redução do TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IFN- γ e/ou pela elevação de IL-10.



Continuação do Quadro 1

(JIANG; XU, 2003)	Extrato aquoso do rizoma da <i>Smilacis glabrae</i>	Intra-peritoneal	400 e 800 mg/kg	A produção de IL-1, TNF e NO lipopolissacarídeo induzidos, por macrófagos peritoneais foi reduzida.
(LI et al., 2002)	Leflunomide (LEF)	Oral	10, 25 mg/kg	A produção de IL-1, IL-6 e TNF- α foi aumentada na cultura sobrenadante de PMphi (macrófagos peritoneais).
(GUGLIELMOTTI et al., 2002)	Bindarit	Oral	10 ml/kg	Reduziu o aumento de MCP-1 e TNF- α sem afetar os níveis de IL-1 e IL-6.