



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Thayane Vieira de Sousa

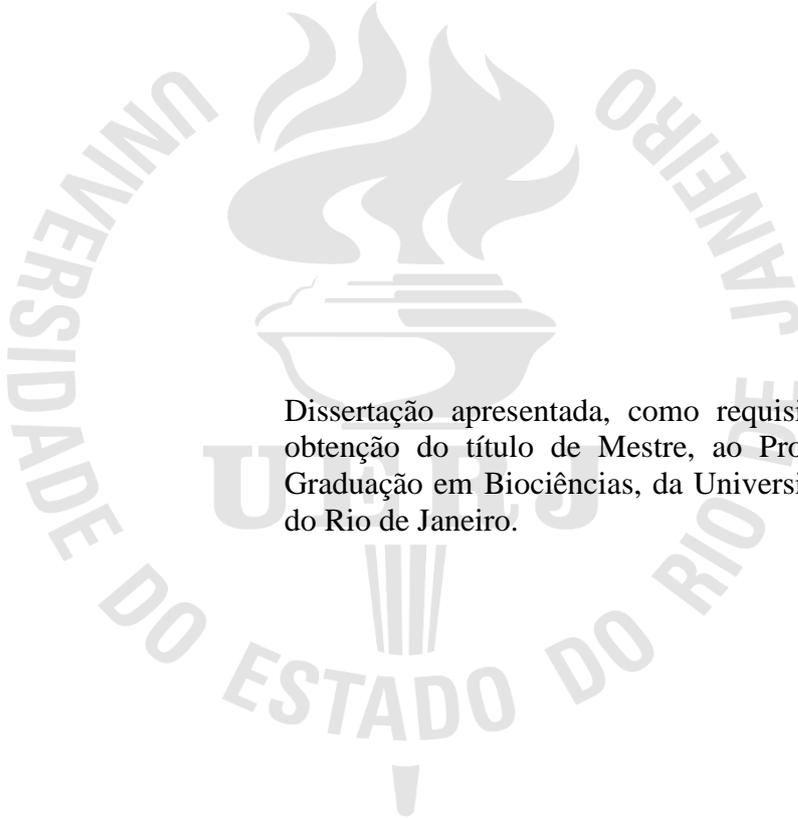
**Estudo da atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* de princípio ativo
isolado dos frutos de *Pterodon polygalaeiflorus***

Rio de Janeiro

2019

Thayane Vieira de Sousa

Estudo da atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* de princípio ativo isolado dos frutos de *Pterodon polygalaeiflorus*



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

Orientadora: Prof^a. Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho

Rio de Janeiro

2019

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

S725 Sousa, Thayane Vieira de.
Estudo da atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* de princípio ativo isolado dos frutos de *Pterodon polygalaeiflorus* / Thayane Vieira de Sousa. – 2019.
115 f.

Orientadora: Marsen Garcia Pinto Coelho.

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

1. *Pterodon polygalaeiflorus* – Teses. 2. Plantas medicinais – Uso terapêutico - Teses. 3. Inflamação - Teses. 4. Artrite Experimental. I. Coelho, Marsen Garcia Pinto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 633.88

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Thayane Vieira de Sousa

Estudo da atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* de princípio ativo isolado dos frutos de *Pterodon polygalaeflorus*

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

Aprovada em 26 de fevereiro de 2019.

Orientadora: Prof.^a Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Kátia Costa de Carvalho Sabino

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Ângela de Castro Resende

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Maria das Graças Muller de Oliveira Henriques

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e a todos aqueles que amo e que de alguma forma
contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida, pela saúde e por todas as graças que me permitiram chegar até aqui.

Aos meus pais, Claudia e Sergio, pelo amor e preocupação, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim. Sei que fizeram e fazem o que podem por mim e pelos meus irmãos. Cada página desse trabalho ou degrau que alcancei na vida foi graças a vocês. Muito obrigada!!!

Aos meus irmãos, Thiago e Geovanna, pelo amor, companheirismo e todos os momentos de apoio e alegria. Vocês são essenciais nisso tudo também.

À minha família Vieira e Sinato: à minha avó Regina por orar e torcer pela minha felicidade e de nossa família; aos meus avós, Zelina, Pedro e Maciel, que infelizmente se foram, mas sei que de onde estiverem estão intercedendo por nós; aos meus tios por sempre me apoiarem e desejarem meu melhor; aos meus primos pela amizade e por todos os momentos de alegria e bagunça que ocorrem quando estamos juntos; aos meus padrinhos por sempre estarem presentes em minha vida e torcerem pelo meu sucesso. Cada um de vocês, ao seu modo, me ajudou nessa caminhada.

À minha orientadora Prof^a. Marsen pela oportunidade que me deu no início da faculdade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e por toda disponibilidade, atenção e carinho que sempre dispõe durante sua orientação e na transmissão do seu conhecimento. Tenho orgulho de ser sua aluna e espero aprender cada vez mais com a senhora.

Aos amigos que fiz na Biologia 2012.2, Camila e Suráby, pela amizade desde o início da faculdade; à Isadora e Orlando pela amizade que começou na faculdade e tem se fortalecido na pós; e ao João que, apesar da distância, sempre me ajudou muito. Sem vocês, a biologia não teria a mesma graça. Obrigada pela amizade e parceria de sempre e pelos incontáveis risos até a barriga doer.

À minha amiga Nathália por sua parceria, pelo apoio de sempre e por me incentivar a acreditar na minha capacidade. Obrigada por me ajudar na minha caminhada científica e por estar sempre presente na vida, como alguém que sei que posso contar. Sua amizade foi um presente que a Bioquímica me deu.

Aos parceiros e amigos do Lab2 e do grupo *cruzi*: Jéssica, Girlaine e Mariana, Marcia Soares, Bruna, Felipe, Davi, Thayssa, Nemes, Mirela, Raquel, Rachel, Thiago, Suelen, Carol Vieira, Carol Machado, Jonathas e Francis. Cada um de vocês, ao seu modo, me ajudou muito

neste trabalho, seja diretamente nos experimentos, ensinamentos diários ou em momentos de descontração e risos, que felizmente, são constantes. Melhor departamento, sem dúvidas.

Aos técnicos do departamento: à Shirley por sempre estar disposta ajudar e cuidar de todos e pela ajuda nos experimentos; à Daniele por toda ajuda nos experimentos e cromatografia; ao Beto e Gustavo pela disponibilidade de ajudar sempre que precisamos e ao Paulinho, por toda a ajuda, solução de dúvidas envolvendo a rotina do laboratório e pelas conversas e conselhos; e aos técnicos do Biotério, Michele, Charles e Carol, por manterem os animais permitindo a realização dos experimentos *in vivo*.

À professora Dra. Kátia Sabino por sempre contribuir com seus conhecimentos científicos, pela ajuda na análise de citometria e pela revisão deste trabalho.

À professora Dra. Graça Justo pela disponibilidade em ajudar com relação aos experimentos de migração e citometria.

Ao professor Dr. Leosvaldo Velozo pela grandiosa contribuição na parte da fitoquímica e isolamento presente neste trabalho e pelo prazer de trabalhar com alguém tão apaixonado pelo que faz.

Ao Dr. Wilson Rosalém Junior por colaborar conosco na avaliação radiológica dos animais dos experimentos de artrite.

Ao professor Jorge Carvalho pela colaboração na coloração histológica dos experimentos de artrite e à Técnica do Laboratório de Ultraestrutura e Biologia Tecidual (LUBT), Ana Lúcia, pela disponibilidade e dedicação aplicada nos procedimentos de coloração das lâminas. Obrigada!

Aos componentes da banca examinadora, Prof.^a Dra. Kátia Costa de Carvalho Sabino, Prof.^a Dra. Ângela de Castro Resende, Prof.^a Dra. Maria das Graças Muller de Oliveira Henriques, Prof. Dr. Israel Felzenszwalb e Prof. Dr. Leosvaldo Salazar Marques Velozo, por aceitarem participar desta banca, engrandecendo este trabalho com todo seu conhecimento científico.

À UERJ, CNPq e FAPERJ pelo financiamento deste trabalho.

O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são.

Aristóteles

RESUMO

SOUSA, Thayane Vieira de. **Estudo da atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* de princípio ativo isolado dos frutos de *Pterodon polygalaeflorus***. 2019. 115 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

O gênero *Pterodon* (*Fabaceae*) compreende cinco espécies nativas do Brasil, conhecidas como “Sucupira branca”. Seus frutos são amplamente utilizados na medicina popular no tratamento de reumatismo, dor de garganta e outras desordens de natureza inflamatória. As atividades biológicas das espécies do gênero foram demonstradas em diversos trabalhos e muitos deles relacionam os efeitos anti-inflamatórios e analgésicos à sua composição de diterpenos furânicos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial anti-inflamatório de compostos desta classe, obtidos de frutos de *P. Polygalaeflorus*, através de modelos *in vitro* e *in vivo*. Frutos de *P. polygalaeflorus* foram macerados em diclorometano por 15 dias, obtendo-se o extrato diclorometano (EDPg) com 39% de rendimento. O EDPg foi fracionado e de suas frações foi isolado um composto a partir de um precipitado de cor branca, por técnicas de cristalização/recristalização, caracterizado por GC-MS, RMN 1H e 13H e por comparação com dados da literatura como o diterpeno 6 α ,7 β -diidroxivouacapano-17 β -oato de metila (Ppg-01). As análises cromatográficas indicaram tratar-se de um composto com elevado grau de pureza. Ppg-01 inibiu ($p < 0,01$) a produção de NO (58,2%), com 50 $\mu\text{g/mL}$, e a migração celular ($p < 0,001$) no modelo de *transwell* (59,8%), com 10 $\mu\text{g/mL}$, em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. *In vivo*, Ppg-01 diminuiu em até 53,8% ($p < 0,05$) o edema induzido por carragenina em camundongos SW, diminuindo o espessamento da derme e a infiltração de células inflamatórias na da pata, avaliado histologicamente. No modelo de artrite induzida por colágeno II (CIA), Ppg-01 diminuiu o índice de artrite em até 52,8% ($p < 0,01$), reduzindo o escore de severidade da doença. A análise radiográfica das patas revelou efeito protetor contra degradação óssea e anquiloses e a análise histológica da articulação femorotibial e tarsal revelou menor hiperplasia sinovial, com maior integridade articular e óssea. O peso corporal dos animais não foi afetado pelo tratamento com Ppg-1, assim como o peso relativo do fígado e rins. O peso relativo do timo ($p < 0,01$) e linfonodo poplíteo ($p < 0,05$) foi reduzido pelo tratamento com Ppg-01, assim como a contagem de células do baço ($p < 0,05$) e linfonodo poplíteo ($p < 0,01$). Na análise de linfócitos, Ppg-01 provocou redução ($p < 0,01$) no número total das subpopulações T CD8+ ativadas (CD8+CD69+) e B ativadas (CD19+CD69+) no linfonodo inguinal. No baço, o tratamento diminuiu o número total de linfócitos T CD4+ ($p < 0,05$), T CD4+ ativadas (CD4+CD69+) ($p < 0,001$) e CD19+CD69+ ($p < 0,05$). A análise comparativa dos parâmetros hematológicos dos animais de CIA revelou que o tratamento com Ppg-01 não alterou o hematócrito e o número total de linfócitos, e aumentou a contagem total de leucócitos, monócitos e segmentados. Esses resultados permitem concluir que o Ppg-01 apresenta potencial atividade anti-inflamatória aguda e crônica e sugere que este possa ser um dos princípios ativos responsáveis pelas atividades atribuídas às espécies *Pterodon*.

Palavras-chaves: *Pterodon polygalaeflorus*. CIA. Antiartrítico. Furano diterpeno.

ABSTRACT

SOUSA, Thayane Vieira de. ***In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activity study of active principle isolated from *Pterodon polygalaeflorus* fruits.** 2019. 115 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

The genus *Pterodon* (*Fabaceae*) comprises five native species to Brazil, known as "Sucupira branca". Its fruits are widely used in folk medicine to treat rheumatism, sore throat and other disorders of inflammatory nature. The biological activities of the species of the genus were demonstrated in several studies, and many of them relate the anti-inflammatory and analgesic effects to their constitution of furan diterpenes. Thus, this work aimed to evaluate the anti-inflammatory potential this class of compounds obtained from fruits of *P. polygalaeflorus* through *in vitro* and *in vivo* models. Fruits of *P. polygalaeflorus* were macerated in dichloromethane for 15 days, obtaining the dichloromethane extract (EDPg) with 39% yielding. EDPpg was fractionated and of its fractions was isolated a compound from a white precipitate, by crystallization/ recrystallization techniques, characterized by GC-MS, ¹H and ¹³H NMR and by comparison with literature data as the diterpene 6 α , methyl-7 β -dihydroxyivouacapane-17 β -oate (Ppg-01). Chromatographic analysis indicated a high purity compound. Ppg-01 inhibited ($p < 0.01$) the NO production (58.2%) with 50 $\mu\text{g/mL}$, and cell migration ($p < 0.001$) in the transwell model (59%), com 10 $\mu\text{g/mL}$, in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *In vivo*, Ppg-01 reduced up to 53.8% ($p < 0.05$) the carrageenan-induced edema in SW mice, reducing dermis thickening and inflammatory cell infiltration in the assessed paw tissue (histologically). In the collagen-induced arthritis (CIA) model, Ppg-01 decreased the arthritis index by up to 52.8% ($p < 0.01$), reducing the severity score of the disease. The radiographic analysis of the paws revealed a protective effect against bone degradation and ankyloses, and the histological analysis of the femorotibial and tarsal joint showed lower synovial hyperplasia, with greater joint and bone integrity. The body weight of the animals was not affected by the treatment with Ppg-1, as well as the relative weight of the liver and kidneys. The relative weight of the thymus ($p < 0.01$) and popliteal lymph node ($p < 0.05$) was reduced by treatment with Ppg-01, as well as the total cell count of the spleen ($p < 0.05$) and popliteal lymph node ($p < 0.01$). In the analysis of lymphocytes, Ppg-01 caused a reduction ($p < 0.01$) in the total number of activated T CD8+ (CD8+CD69+) and activated B cells (CD19+CD69+) in the inguinal lymph node. In the spleen, the treatment decreased the total number of T CD4+ cells ($p < 0.05$), activated T CD4+ (CD4+CD69+) ($p < 0.001$) and CD19+CD69+ cells ($p < 0.05$). The evaluation of hematological parameters of the CIA animals showed that the treatment with Ppg-01 did not change the hematocrit and total lymphocyte counts, and increased the total leukocyte, monocyte, and segmented counts. These results allow us to conclude that the Ppg-01 diterpene has potential acute and chronic anti-inflammatory activity and suggests that it may be one of the active principles responsible for the biological activities attributed to *Pterodon* species.

Keywords: *Pterodon polygalaeflorus*. CIA. Anti-arthritis. Furane diterpene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Pterodon spp.</i>	21
Figura 2 -	Os caminhos na inflamação aguda: resolução ou inflamação crônica?.....	29
Figura 3 -	Etapas da cascata de recrutamento de leucócitos.....	31
Figura 4 -	Fatores envolvidos no desenvolvimento da artrite reumatoide.....	33
Figura 5 -	Aspectos patogênicos da artrite reumatoide.....	35
Figura 6 -	Aspectos patogênicos da articulação em paciente com artrite reumatoide.....	38
Figura 7 -	Fluxograma do isolamento de Ppg-01 a partir do EDPpg.....	57
Figura 8 -	Análise do EDPpg (A) e Ppg-01 (B) por GC-MS.....	59
Figura 9 -	Análise do EDPpg e Ppg-01 por cromatografia em camada delgada de alta performance (HPTLC).....	60
Figura 10 -	Efeito do diterpeno Ppg-01 sobre a produção de nitrito e atividade redutora mitocondrial (ARM) de macrófagos da linhagem RAW 264.7.....	61
Figura 11 -	Efeito da Ppg-01 sobre a migração de macrófagos RAW 264.7 no ensaio de <i>transwell</i>	62
Figura 12 -	Efeito do diterpeno Ppg-01 sobre o edema de patas induzido por carragenina em camundongos SW machos.....	63
Figura 13 -	Variações histológicas induzidas pelo tratamento com Ppg-01 na pata de camundongos SW machos com edema induzido por carragenina.....	64
Figura 14 -	Efeito do diterpeno Ppg-01 na progressão da artrite induzida por colágeno II em camundongos DBA/1J machos.....	66
Figura 15 -	Avaliação macroscópica de patas de camundongos DBA/1J machos com artrite induzida por colágeno II tratados ou não com o diterpeno Ppg-01, em comparação com animais sadios.....	67
Figura 16 -	Avaliação radiológica de patas de camundongos DBA/1J machos com artrite induzida por colágeno II tratados ou não com o diterpeno Ppg-01, em comparação com animais sadios.	68

Figura 17 -	Representação histológica de regiões da pata de camundongos DBA/1J sadios.....	70
Figura 18 -	Representação histológica de regiões da pata de camundongos DBA/1J com CIA.....	71
Figura 19 -	Representação histológica de regiões da pata de camundongos DBA/1J com CIA, tratados com Ppg-01 ou metotrexato.	72
Figura 20 -	Varição do peso corporal e peso relativo do fígado e rins nos diferentes grupos de animais no modelo de CIA.....	73
Figura 21 -	Varição do peso relativo de órgãos linfoides no modelo de CIA.....	74
Figura 22 -	Varição da celularidade de órgãos linfoides no modelo de CIA.....	76
Figura 23 -	Efeito do tratamento com a Ppg-01 sobre o número de células das diferentes subpopulações de linfócitos dos linfonodos inguinais (LN ing) de animais com CIA.....	77
Figura 24 -	Efeito do tratamento com a Ppg-01 sobre as subpopulações de linfócitos do baço de animais com CIA.....	79
Figura 25 -	Efeito do tratamento com a Ppg-01 sobre dados hematológicos em animais com CIA.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR/EULAR	Colégio Americano de Reumatologia e Liga Europeia Contra o Reumatismo (<i>American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism</i>)
ACPA	Anticorpos antiproteínas citrulinadas (<i>autoantibodies against citrullinated peptides</i>)
AFC	Adjuvante de Freund completo
AIA	Artrite induzida por adjuvante completo de Freund
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC(s)	Célula(s) apresentadora(s) de antígeno(s) (<i>Antigen-presenting cells</i>)
APC	Alofitocianina (<i>Allophycocyanin</i>)
AR	Artrite reumatoide
ARM	Atividade redutora mitocondrial
CD	Molécula marcadora de superfície (<i>Cluster of differentiation</i>)
CD4+	Linfócitos T auxiliares
CD8+	Células T citotóxicas
CD19+	Linfócitos B
CD69+	Marcador específico de ativação de células T
CEUA	Comitê de ética para uso de animais de experimentação do IBRAG
CIA	Artrite induzida por colágeno (<i>Collagen-induced arthritis</i>)
CL ₅₀	Concentração letal para 50% da população
CII	Colágeno do tipo II
COX	Ciclooxigenase
CR	Receptor do complemento (<i>Complement Receptor</i>)
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos (<i>Damage-associated molecular pattern</i>)
DMARDs	Drogas antirreumáticas modificadoras de doença (<i>Disease-modifying antirheumatic drugs</i>)
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dubecco (<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido (<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>)
EC ₅₀	Concentração que produz um efeito 50% do máximo

EC	Epítopo compartilhado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EDPpg	Extrato diclorometânico de <i>P. polygalaeflorus</i>
EEPpg	Extrato etanólico de <i>P. polygalaeflorus</i>
EHPpg	Extrato hexânico de <i>P. polygalaeflorus</i>
EULAR	Liga Europeia Contra o Reumatismo (<i>European League Against Rheumatism</i>)
Fc	Fração cristalizável de imunoglobulinas
FcR	Receptor de Fc (<i>Fc receptor</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein isothiocyanate</i>)
FLS	Sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (<i>Fibroblast-like synoviocyte</i>)
FR	Fator reumatoide
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas (<i>Gas chromatography–mass spectrometry</i>)
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
HE	Coloração por Hematoxilina e Eosina
HLA	Antígeno leucocitário humano (<i>Human leukocyte antigen</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High performance liquid chromatography</i>)
HPTLC	Cromatografia em camada delgada de alta performance (<i>High-performance thin-layer chromatography</i>)
IA	Índice de artrite
i.p.	Tratamento por via intraperitoneal
i.d.	Tratamento por via intradérmica
IC50	Concentração que inibe 50%
IL	Interleucina
IFN- γ	interferon gama
iNOS	NO sintase induzível (<i>Inducible nitric oxide synthase</i>)
LD ₅₀	Dose letal para 50% da população
LN ing	Linfonodo inguinal
LPS	Lipopolissacarídeo de membrana de bactérias gram-negativas

MMP(s)	Metaloproteinase(s) de matriz
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos (<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>)
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (<i>Major histocompatibility complex</i>)
MLS	Sinoviócitos semelhantes a macrófagos (<i>Macrophage-like synoviocytes</i>)
MS	Espectros de massas (<i>Mass spectrum</i>)
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil 2H-tetrazólio
MTX	Metotrexato
NSAIDs	Anti-inflamatórios não-esteroidais (<i>Nonsteroidal anti-inflammatory</i>)
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B (<i>Factor nuclear kappa B</i>)
NK	Células <i>natural killer</i>
nNOS	NO sintase neuronal (Neuronal <i>nitric oxide synthases</i>)
NO	Óxido nítrico (<i>Nitric oxide</i>)
NOS	Óxido nítrico sintase (<i>Nitric oxide synthases</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPp	Óleo dos frutos de <i>P. pubescens</i>
P.c.	Peso corporal
PAF	Fator de agregação plaquetária (<i>Platelet-activating factor</i>)
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos (<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>)
PADI	Peptil arginina desaminase (<i>peptidyl arginine deiminase</i>)
PBS	Salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>) (fosfato de sódio 0,01 M, 0,9% NaCl pH 7,4)
PE	R-Ficoeritrina (<i>R-Phycoerythrin</i>)
PG(s)	Prostaglandina(s)
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
RI	Índice de retenção (<i>Retention index</i>)
RANK	Receptor ativador do NF-κB (<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B</i>)
RANKL	Ligante do receptor ativador do NF-κB (<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>)

NMR	Ressonância magnética nuclear (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive oxygen species</i>)
RPMI	Meio de cultura estabelecido pelo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RRP	Receptores de reconhecimento padrão
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SFB	Soro fetal bovino
s.c.	Tratamento por via subcutânea
SW	Linhagem heterogênea (<i>outbred</i>) de camundongo Swiss Webster
TCR	Receptor de células T (<i>T-cell receptor</i>)
TLC	Cromatografia em camada delgada (<i>Thin layer chromatography</i>)
Tfh	Células T auxiliares foliculares (<i>T follicular helper cell</i>)
TGF- β	Fator de necrose tumoral- β (<i>Transforming growth factor beta</i>)
Th	Linfócitos T auxiliares (Linfócitos T <i>helper</i>)
TLC	Cromatografia em camada delgada (<i>Thin layer chromatography</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)
Treg	Células T reguladoras
TXA ₂	Tromboxano A ₂
v.o.	Via oral
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1	Plantas Medicinais: Aspectos históricos e importância atual	18
1.2	Gênero <i>Pterodon</i>	20
1.2.1	<u>A espécie <i>Pterodon polygalaeiflorus</i> Benth.</u>	24
1.3	Imunidade inata e adaptativa	27
1.4	Inflamação	28
1.4.1	<u>Inflamação aguda</u>	29
1.4.2	<u>Inflamação crônica</u>	31
1.5	Artrite reumatoide: definição, epidemiologia e sintomas	32
1.5.1	<u>Patofisiologia da AR</u>	34
1.5.2	<u>Estratégias de tratamento da AR e busca por alternativas terapêuticas</u>	39
1.6	Artrite experimental como modelo na busca de novas alternativas terapêuticas	41
1.7	Artrite induzida por colágeno (CIA)	41
1.8	Considerações finais	42
2	OBJETIVOS	44
2.1	Objetivo geral	44
2.2	Objetivos específicos	44
3	MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1	Produto natural	45
3.2	Preparo do extrato	45
3.3	Fracionamento do EDPpg	46
3.4	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS)	46
3.5	Cultura de células RAW 264.7	47
3.6	Dosagem de nitrito em células RAW 264.7	48
3.7	Ensaio de citotoxicidade por redução de sal de tetrazólio	49
3.8	Ensaio de migração através de inserto (<i>transwell</i>)	49
3.9	Animais	50
3.10	Edema de pata induzido por carragenina	51

3.10.1	<u>Processamento histológico.....</u>	51
3.11	Artrite induzida por colágeno tipo II (CIA)	52
3.11.1	<u>Análise radiológica das patas traseiras dos animais com CIA.....</u>	53
3.11.2	<u>Processamento histológico das patas com CIA.....</u>	54
3.11.3	<u>Coleta e contagem de células do lavado medular.....</u>	54
3.11.4	<u>Processamento e contagem das células do baço e linfonodos.....</u>	55
3.11.5	<u>Fenotipagem das subpopulações de linfócitos do baço e linfonodos.....</u>	55
3.11.6	<u>Contagem de células do sangue</u>	56
3.12	Análise estatística.....	56
4	RESULTADOS.....	57
4.1	Isolamento e caracterização fitoquímica do Ppg-01 (6α,7β-diidroxivouacapano-17β-oato de metila).....	57
4.2	Análise da atividade do diterpeno Ppg-01 sobre a citotoxicidade e a produção de óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7.....	58
4.3	Análise da atividade do diterpeno Ppg-01 sobre migração de macrófagos RAW 264.7 em modelo de transwell.....	61
4.4	Estudo do potencial anti-inflamatório <i>in vivo</i> de Ppg-01 no modelo de edema de pata induzido por carragenina.....	62
4.4.1	<u>Análise histopatológica qualitativa das patas do modelo de edema de pata induzido por carragenina.....</u>	64
4.5	Estudo do potencial anti-inflamatório crônico do Ppg-01 através do modelo de artrite induzida por colágeno (CIA).....	65
4.5.1	<u>Efeito de Ppg-01 sobre o desenvolvimento e a severidade do CIA.....</u>	65
4.5.2	<u>Avaliação do efeito de 6α, 7β-diidroxivouacapano-17β-oato de metila (Ppg-01) sobre a integridade óssea dos animais com CIA.....</u>	67
4.5.3	<u>Análise histológica das patas de animais dos diferentes grupos do ensaio de CIA.....</u>	69
4.5.4	<u>Avaliação do efeito de Ppg-01 sobre o peso corporal e de órgãos dos animais submetidos ao CIA.....</u>	73
4.5.5	<u>Avaliação do efeito do Ppg-01 sobre a celularidade de órgãos linfoides primários e secundários.....</u>	75
4.5.6	<u>Análise do efeito do tratamento com Ppg-01 sobre as subpopulações de</u>	

	<u>linfócitos CD4, CD8 e CD19, e seus níveis de ativação (CD69+) nos linfonodos inguinal e no baço de camundongos no modelo de CIA.....</u>	75
4.5.7	<u>Avaliação do efeito do Ppg-01 sobre os parâmetros hematológicos dos animais do modelo de CIA.....</u>	79
5	DISCUSSÃO.....	82
	CONCLUSÕES.....	95
	REFERÊNCIAS.....	96

INTRODUÇÃO

A inflamação é um mecanismo protetivo da microcirculação que se inicia em resposta a uma infecção ou injúria tecidual e tem por objetivo o retorno da homeostase. Assim, as respostas inflamatórias locais e sistêmicas visam eliminar o estímulo inicial, promover o reparo tecidual e a cicatrização, e no caso de infecção, estabelecer memória imunológica de tal forma que uma nova exposição ao antígeno desencadeie uma resposta mais rápida e específica (Fullerton e Gilroy, 2016). Falhas nesses mecanismos resultam na predisposição ao desenvolvimento de inflamação crônica e autoimunidade, que estão envolvidos na patogênese de diversas doenças inflamatórias humanas (Lawrence e Gilroy, 2007; Sugimoto *et al.*, 2016; Scheet e Neurath, 2018), como a artrite reumatoide.

A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica autoimune de natureza incapacitante, que se caracteriza por sinovite, a qual leva a degradação articular e óssea, estando associada à comorbidades sistêmicas (Gabriel, 2008; Innala *et al.*, 2016; McInnes e Schett, 2017; Smolen, 2018). As falhas nas estratégias de tratamento atuais tornam necessária a procura por alternativas terapêuticas para a doença.

A pesquisa com produtos naturais, sobretudo plantas, é um dos alvos importantes, uma vez que elas apresentam em sua composição metabólitos secundários responsáveis pelos efeitos medicinais relatados desde a pré-história (Calixto e Siqueira, 2008).

Neste sentido, a espécie escolhida para este estudo é a *Pterodon polygalaeflorus*, uma planta nativa do Brasil, conhecida como “sucupira”, cujos frutos são utilizados na medicina popular para tratamento de reumatismo, dor de garganta e outras desordens inflamatórias.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Plantas Medicinais: Aspectos históricos e importância atual

Desde a pré-história, o ser humano busca nos recursos da natureza a cura de suas doenças, seja essa fonte obtida de plantas, animais ou minerais (Calixto e Siqueira, 2008). Diversas evidências, como documentos escritos ou monumentos preservados, revelam que a busca da saúde pelo uso de plantas é tão antiga quanto à existência da própria humanidade. Sabe-se também que as descobertas sobre a forma pela qual as plantas promoviam essa cura foi empírica. A partir daí, com base nas informações e experiências que foram passadas de geração em geração (Thomford *et al.*, 2018), esse conhecimento se propagou de forma que permitisse a comprovação científica de muitos desses achados antigos, permitindo o conhecimento dos mecanismos envolvidos na cura e o desenvolvimento de medicamentos usados na medicina atual (Gurib-Fakim, 2006; Petrovska, 2012; Mushtag *et al.*, 2018).

A evidência escrita mais antiga da utilização das plantas para a saúde humana é da Mesopotâmia e data de aproximadamente 2.600 a.C.. Em escrita cuneiforme, tábulas de argila registram diversas plantas e preparações, como óleos de *Cupressus sempervirens* (Cypress) e espécies de *Commiphora* (myrrh) que são até hoje utilizadas no tratamento de tosse, resfriados e inflamação. Outras civilizações como os egípcios, greco-romanos e chineses, utilizavam e registraram a utilização terapêutica das plantas (Gurib-Fakim, 2006; Calixto e Siqueira, 2008; Dias *et al.*, 2012).

Todo esse conhecimento, ainda que obtido com base na tentativa-erro, permitiu que as práticas medicinais tradicionais formassem as bases da maioria dos primeiros medicamentos, seguido dos estudos clínicos, farmacológicos e químicos subsequentes (Dias *et al.*, 2012).

Foi só no século XIX que se iniciou a procura por princípios ativos presentes nas plantas medicinais, criando-se assim, os medicamentos como conhecemos atualmente. Em 1806, investigações com *Papaver somniferum* L. (opium poppy), citada em registros sumérios e gregos como sendo medicinal, e em registros árabes como viciante, resultaram no isolamento do alcaloide morfina (Calixto e Siqueira, 2008; Dias *et al.*, 2012).

Entretanto, o exemplo mais importante da medicina tradicional na descoberta de medicamentos foi a descoberta da salicina, em 1829, a partir da planta *Salix alba*. Em 1839, realizou-se a primeira modificação estrutural da salicina, originando o ácido salicílico,

utilizado no tratamento da artrite reumatoide. Este isolamento é até hoje considerado um marco histórico no desenvolvimento da indústria farmacêutica mundial (Calixto e Siqueira, 2008; Dutra *et al.*, 2016).

Desde 2002 a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a medicina tradicional como importante nos cuidados de saúde. A instituição define medicina tradicional como o conhecimento, habilidades e práticas baseadas nas teorias, crenças e experiências da população e de diferentes culturas indígenas, explicáveis ou não, usadas na manutenção da saúde, bem como na prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento de doenças (WHO, 2013).

De acordo com a OMS, cerca 80% da população de países em desenvolvimento dependem essencialmente de plantas para seus cuidados de saúde primários devido à pobreza e à dificuldade de acesso à medicina moderna (Calixto, 2008; WHO, 2011; Fagg *et al.*, 2015). Até agora, mais de 20000 plantas medicinais têm sido listadas pela OMS e estima-se que até 2020 o mercado global de plantas medicinais possa ultrapassar cem bilhões de dólares, o que representa 20% do mercado total de medicamento (Zhu *et al.*, 2018).

O uso tradicional de fitoterápicos geralmente preserva a composição original e a integridade da planta de origem, de modo que a planta inteira, ou uma porcentagem desejada de seus componentes minimamente adulterados, é usada para fins medicinais (Falzon e Balabanova, 2017). A fitoterapia vem ganhando mercado crescente mundialmente devido a diversos fatores como: efeitos adversos de fármacos sintéticos, preferência dos consumidores por tratamentos “naturais”, crescente validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, desenvolvimento de novos métodos analíticos para o controle de qualidade, desenvolvimento de novas formas de preparações e administração dos produtos, e relativo baixo custo (Calixto, 2000; Souza-Moreira *et al.*, 2010).

Nas últimas décadas tem-se observado em todo o mundo um aumento no interesse em produtos medicinais derivados de plantas superiores, principalmente por parte dos países desenvolvidos, como EUA e países da Europa. Dessa forma, cada vez mais os compostos derivados de produtos naturais são empregados na medicina moderna, onde desempenham importante papel na síntese de moléculas mais complexas. Estima-se que aproximadamente 30% dos medicamentos avaliados são de fonte natural (plantas e micro-organismos), alcançando 60% nos medicamentos na área de oncologia (Calixto e Siqueira, 2008; dutra *et al.*, 2016).

Graças ao avanço de tecnologias como a cromatografia líquida de alta performance, espectroscopia de ressonância magnética nuclear e a espectrometria de massas, tem-se

observado um maior avanço no campo da química medicinal. Isso tem permitido a identificação de componentes fitoquímicos complexos e sua utilização para a descoberta de medicamentos (Zhu *et al.*, 2018; Thomford *et al.*, 2018).

No Brasil, pelo Ministério da Saúde, a primeira diretriz para avaliar a segurança, qualidade e eficácia dos medicamentos à base de plantas, comercializados no país, foi estabelecida apenas em 1994, tendo como base guias da OMS e diretrizes alemãs e francesas. Nas duas últimas décadas essas diretrizes vêm sendo melhoradas cada vez mais e novas estão sendo lançadas, visando melhorar tal avaliação (Dutra *et al.*, 2016). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autarquia vinculada ao Ministério da Saúde, é o principal órgão responsável pela regulamentação do uso de plantas medicinais no Brasil e é responsável por normatizar, controlar e fiscalizar produtos, substâncias e serviços de interesse para a saúde (Brasil, 1999; Calixto e Siqueira, 2008).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, distribuída em seis biomas: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Ministério do Meio Ambiente, 2017). A biodiversidade brasileira compreende mais de 50.000 espécies de plantas superiores que representam aproximadamente 20-22% do total existente no planeta. Em função disso, sobretudo devido à grande tradição do uso de plantas pela medicina popular no país, os estudos das suas propriedades medicinais vêm sendo explorado extensivamente pelos pesquisadores brasileiros e, mais recentemente, pela indústria farmacêutica, interessada em desenvolver novos medicamentos (Calixto e Siqueira, 2008; Dutra *et al.*, 2016).

Apesar do potencial de mercado e do grande interesse em plantas medicinais no Brasil recentemente, apenas um agente fitoterápico brasileiro (Acheflan®, produzido a partir do óleo de *Cordia verbenácea*) é encontrado na lista dos 20 produtos fitoterápicos mais vendidos no país. Este fato revela o baixo desenvolvimento nacional no que diz respeito a iniciativas de inovação em novos agentes fitoterápicos no país (Dutra *et al.*, 2016).

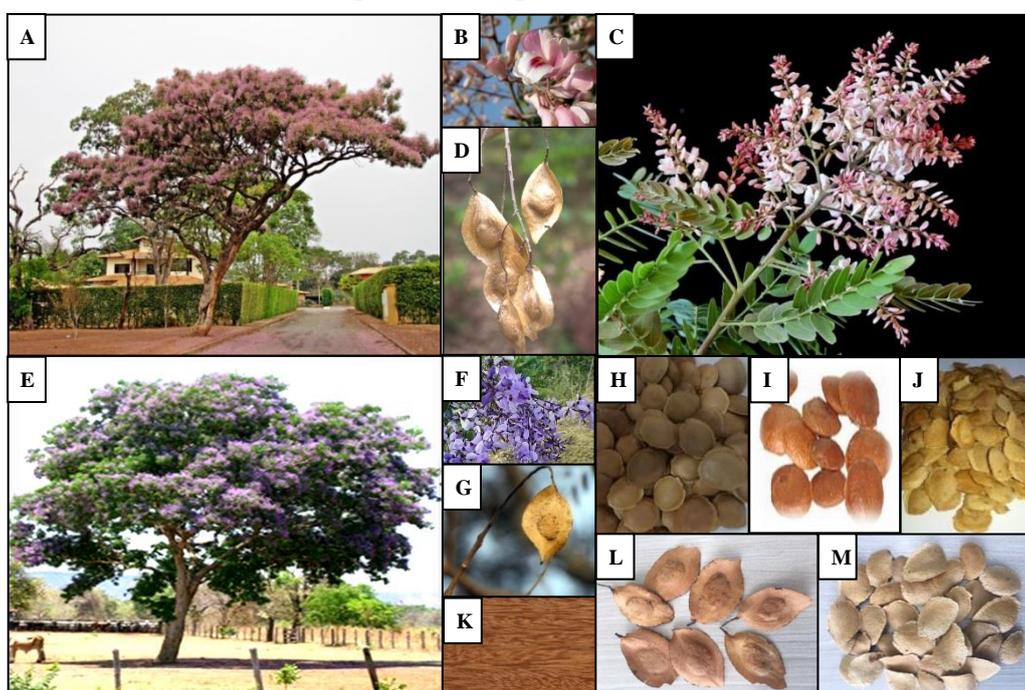
1.2. Gênero *Pterodon*

A espécie utilizada neste trabalho pertence ao gênero *Pterodon* spp., pertencente à família Fabaceae. O gênero *Pterodon* spp., compreende cinco espécies nativas do Brasil, sendo elas: *Pterodon abruptus* Benth., *Pterodon apparicioi* Pedersoli, *Pterodon pubescens* Benth., *Pterodon polygalaeflorus* Benth. e *Pterodon emarginatus* Vogel. Curiosamente, as

espécies *Pterodon emarginatus* e *Pterodon pubescens* foram descritas inicialmente como sendo espécies distintas. Entretanto, Vogel demonstrou que esta última espécie se tratava na verdade de *P. emarginatus*, nome que passou a ser considerado oficialmente para fazer referência às duas espécies (Hansen *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2016).

As espécies do gênero são popularmente conhecidas como sucupira e encontram-se amplamente distribuídos na região central do Brasil (Goiás, Minas Gerais e São Paulo), com suas árvores podendo alcançar de 5 a 10 m de altura (Dutra *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2010).

Figura 1 - Flores, frutos e exemplares das espécies *Pterodon*



Legenda: As imagens de A-D representam a espécie *Pterodon pubescens* e as de E-G a espécie *Pterodon polygalaeflorus*. K) madeira do tronco processada. H-J, frutos disponíveis no mercado. L-M, frutos da espécie *Pterodon polygalaeflorus* em estudo.

Fonte: A-K) <https://www.google.com.br/search>, acesso em 24/01/2019; L-M) arquivo pessoal.

Os frutos das espécies de *Pterodon* são amplamente utilizados na medicina tradicional no tratamento de diversas doenças, como reumatismo, dor de garganta, doenças respiratórias, e por apresentarem atividades farmacológicas diversas, como anti-inflamatória, analgésica, antirreumática, antiulcerogênica (Pio Correa, 1975; Duarte *et al.*, 1996; Dutra *et al.*, 2009; Fagg *et al.*, 2015). Sua utilização no tratamento de doenças foi descrita por naturalistas ainda no século XIX e atualmente seu uso ainda é bastante disseminado na população (Fagg *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016).

As avaliações sobre as atividades biológicas, bem como o isolamento de compostos presentes no gênero *Pterodon* começaram na década de 60, com o isolamento, por Mors e colaboradores, dos diterpenos 14,15-epoxigeranilgeraniol e do geranilgeraniol a partir do óleo obtido dos frutos de *P. pubescens*, efetivo como agente quimioprolifático na esquistossomose, com alta ação biológica contra a cercaria de *S. mansoni* (Mors *et al.*, 1967).

Na década de 70, diterpenos foram isolados a partir dos frutos de *P. emarginatus* (Mahajan e Monteiro, 1970; 1973). Outros estudos fitoquímicos com espécies do gênero *Pterodon* demonstraram a presença de isoflavonas, sesquiterpenos e diterpenos no óleo do fruto (Fascio, 1976; Arriaga *et al.*, 2000), isoflavonas e triterpenos na madeira do tronco (Braz-Filho, 1970, 1971; Marques, 1998); alcaloides, saponinas, glicosídeos, e esteroides na casca das árvores (Torrenegra *et al.*, 1989; Torrenegra *et al.*, 2010); e esteroides, sesquiterpenos, isoflavonas e saponinas em suas folhas (Santos *et al.*, 2010; Negri *et al.*, 2014; Hoscheid e Cardoso, 2015). Estudos químicos com *P. emarginatus* demonstraram a presença de compostos alcaloides na casca (Torrenegra *et al.*, 1989) e sesquiterpenos no óleo essencial dos frutos (Dutra *et al.*, 2008; 2009).

Algumas propriedades medicinais das espécies de *Pterodon*, como o tratamento da artrite reumatoide, foram estudadas baseadas no conhecimento popular da ingestão de infusões à base de vinho, principalmente, ingeridas em pequenas quantidades, em intervalos regulares (Pio Correa, 1975; Nunan, 1982, Cardoso *et al.*, 2008; Hoscheid e Cardoso, 2015; Mendes *et al.*, 2017).

Estudos desenvolvidos em nosso laboratório (LIA-BPPN-UERJ) demonstraram alta atividade antiartrítica do extrato hidroalcoólico de *P. pubescens* no modelo *in vivo* de artrite induzida por colágeno II (CIA). Foi observada, após o tratamento do tipo preventivo com o extrato, uma redução no índice de artrite, bem como na incidência de CIA. No tratamento do tipo terapêutico, a dose de 5 mg/kg foi capaz de inibir os mesmos parâmetros (Sabino *et al.*, 1999b).

Em trabalho publicado no mesmo ano, o extrato etanólico de *P. pubescens* foi avaliado quanto ao seu efeito toxicológico em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Foi demonstrada ausência de toxicidade aguda e de atividade mutagênica em camundongos DBA/1J e ausência de citotoxicidade para células mononucleares do sangue periférico, nas concentrações testadas (Sabino *et al.*, 1999a). Nosso grupo também mostrou que o tratamento diário de camundongos com CIA com 5 mg/kg do extrato hidroalcoólico de *P. Pubescens*, levou à inibição de 59% do índice de artrite. Adicionalmente, não foram observadas alterações nas análises

hematológicas, histopatológicas, peso relativo de órgãos ou parâmetros bioquímicos do soro, sugerindo ausência de toxicidade subaguda (Coelho *et al.*, 2001).

Atividade anti-inflamatória também foi demonstrada (Carvalho *et al.*, 1998), utilizando frutos de *P. emarginatus*. Estes autores demonstraram que o extrato hexânico desta espécie foi capaz de inibir a migração de neutrófilos e a formação de tecido granulomatoso, e relacionou esta atividade à presença de compostos terpênicos no extrato (Carvalho *et al.*, 1998). A atividade anti-inflamatória observada em *P. Pubescens*, demonstrada por Sabino e colaboradores (1999a, 1999b), também foi atribuída à presença de furanoditerpenos, que apresentam esqueleto de vouacapano, alguns isolados por Fascio *et al.* (1976).

A atividade antiedematogênica também foi demonstrada em *P. pubescens*, utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina e de edema de orelha induzido por óleo de cróton. Este trabalho, realizado por nosso grupo, demonstrou que o extrato oleaginoso dos frutos de *P. pubescens* apresenta atividade anti-inflamatória aguda e tópica. Além disso, sugeriu-se que outros compostos, além dos derivados de vouacapano, tivessem participação nessa atividade (Silva *et al.*, 2004).

O óleo dos frutos de *P. pubescens* e o geranilgeraniol, um isoprenoide natural dele isolado que apresenta propriedades anti-inflamatórias, foram avaliados quanto à ação na agregação plaquetária e formação de tromboxano A₂ (TXA₂) e prostaglandina E₂ (PGE₂). Observou-se que o geranilgeraniol interfere no metabolismo do ácido araquidônico inibindo a enzima ciclooxigenase 1 (COX-1) (Calixto *et al.*, 2007).

Utilizando o extrato etanólico dos frutos da mesma espécie, nosso grupo estudou seus efeitos sobre linfócitos T e B em camundongos saudáveis, tendo observado resposta imunossupressora celular e humoral *in vivo*, promovida por tratamento com o extrato por via oral, além de redução da produção *in vitro* de óxido nítrico por macrófagos (Cardoso *et al.*, 2008).

Além destas, outras atividades biológicas têm sido descritas para as espécies do gênero *Pterodon*. Em 1976, Neto demonstrou uma atividade microbida *in vitro* para *P. emarginatus*. Em 2008, Dutra e colaboradores investigaram o conteúdo fenólico dos frutos de *P. emarginatus* e observaram promissora atividade antioxidante das frações butanólica e metanólica (Dutra *et al.*, 2008). No mesmo ano, Menna-Barreiro e colaboradores (2008) demonstraram o potencial tripanocida do geranilgeraniol, um composto presente na fração hexânica do extrato etanólico de *P. pubescens*. Recentemente, Mendes e colaboradores (2017) demonstraram atividade microbida do óleo essencial e do extrato hidroalcoólico de *P. emarginatus* contra *Staphylococcus aureus*. Nanoemulsões do óleo também apresentaram

atividade antiparasitária contra monogenoideas de peixes (Valentim et al., 2018) e atividade larvicida contra Aedes aegypti, sendo esta última atividade relacionada à inibição reversível da acetil colinesterase, com ausência de toxicidade aguda em mamíferos (Oliveira *et al.*, 2016).

Nosso grupo também investigou a propriedade antileucêmica de *P. pubescens*. Foi demonstrado por Pereira e colaboradores (2010) o efeito inibidor do extrato etanólico de *P. pubescens* sobre o crescimento celular e indução de parada do ciclo celular na fase G1, em experimentos utilizando a linhagem leucêmica mieloide K562. Também foi demonstrado que a subfração SF5 do mesmo extrato, rica em terpenos e diterpenos, induzia apoptose de células K562 *in vitro*, através de modulação da expressão gênica (Pereira *et al.*, 2011; 2012). Martino e colaboradores (2014) revelaram efeito citotóxico desta mesma subfração sobre células de leucemia linfocítica (Jurkat), induzindo apoptose por via mitocondrial, não mostrando citotoxicidade para células mononucleares do sangue periférico, nas concentrações testadas.

1.2.1. A espécie *Pterodon polygalaeflorus* Benth.

Como nas demais espécies do gênero, os principais compostos isolados na espécie *Pterodon polygalaeflorus* Benth. são diterpenos, que pertencem à classe dos terpenoides, os quais constituem a maior classe de metabólitos secundários (Pimenta *et al.*, 2006; Hoscheid e Cardoso, 2015). Alguns desses constituintes foram identificados e isolados, assim como compostos de outras classes de metabólitos secundários, e seus efeitos biológicos foram demonstrados em diversos trabalhos, como descrito a seguir.

Diterpenos e triterpenos foram isolados e descritos em *P. polygalaeflorus*, bem como o flavonoide taxifolina (Nunan, 1985; Marques *et al.*, 1998; Arriaga *et al.*, 2000). Nunan (1982, 1985) demonstrou a atividade anti-inflamatória do furano diterpeno 6,7-dihidroxi-vouacapan-17-oato de sódio, isolado do óleo dos frutos de *P. polygalaeflorus*, utilizando o modelo de inflamação aguda de edema de pata, induzidos por carragenina. Em 1990, Campos e colaboradores isolaram, e identificaram a partir do extrato hexânico dos frutos de *P. polygalaeflorus*, os seguintes componentes: ilangeno, α -capaeno, β -cariofileno, α -humuleno, γ -elemeno e δ -cadineno (Campos *et al.*, 1990). Do extrato acetônico do cerne e do alburno do tronco foram isolados e identificados isoflavonoides e triterpenoides, que tiveram sua estrutura caracterizada por métodos espectrométricos (Marques *et al.*, 1998). Dentre os

terpenos isolados e identificados no extrato hexânico da espécie *P. Polygalaeflorus* estão o 6 α -hidroxivouacapano-7 β ,17 β -lactona, o ácido 6 α ,7 β -dihidroxivouacapano-17 β -oico e o 6 α ,7 β -dihidroxivouacapano-17 β -oato de metila, (Campos *et al.*, 1994). O composto 6 α ,7 β -dihidroxivouacapano-17 β -oato de metila, por sua vez, foi testado em modelo de contorção animal, onde foi demonstrado o envolvimento de aminas biogênicas no efeito antinociceptivo observado (Duarte *et al.*, 1996).

Os diterpenoides 6 α -hidroxivouacapano e 6 α ,7 β ,14 β ,19-tetrahidroxivouacapano, e o flavonoide taxifolina foram isolados a partir do extrato hexânico dos frutos de *P. polygalaeflorus* por Arriaga e colaboradores (2000), além do 6 α ,7 β -dihidroxivouacapano-17 β -oato de metila, já descrito neste extrato (Campos *et al.*, 1994).

Estudo fitoquímico com os extratos metanólico e hexânico dos frutos de *P. Polygalaeflorus*, realizado por Pimenta e colaboradores (2006), forneceu três diterpenos furânicos: vouacapano, relatado pela primeira vez como produto natural, 6- α -acetoxivouacapano e 6- α -hidroxivouacapano. O grupo avaliou a atividade larvicida dos extratos, do óleo essencial dos frutos e do 6 α -acetoxivouacapano, isolado do extrato metanólico, e observou promissora atividade no extrato hexânico, que apresentou CL₅₀ 23,99 \pm 0,75 μ g/mL em ensaios com larvas de *Aedes aegypti* de estágio três (Pimenta *et al.*, 2006). O extrato etanólico de *P. Polygalaeflorus* apresentou significativa atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (De Omena *et al.*, 2006), enquanto o extrato aquoso teve seu potencial antinociceptivo, anti-inflamatório e bronco dilatador avaliados (Leal *et al.*, 2000). Os autores observaram inibição de 50 e 55% (100 e 200 mg/kg) das contorções induzidas por ácido acético na segunda fase de resposta; de 34 e 41% (100 e 200 mg/kg) no modelo de dor induzida por formalina; inibição de 68% (200 mg/kg) do edema de pata induzido por carragenina e de 26 e 32% (200 e 400 mg/kg) do edema de pata induzido por dextrano; e foi demonstrada alta atividade bronco dilatadora em ensaio de relaxamento de traqueia isolada de cobaia, revelando um EC₅₀ de 1,7 mg/mL (Leal *et al.*, 2000).

Em estudos feitos por Evangelista e colaboradores (2007) foi demonstrado que o óleo essencial de *P. polygalaeflorus* é capaz de inibir a contração muscular de traqueia isolada de ratos, através de mecanismo de acoplamento eletromecânico. Leonhardt e colaboradores (2010) também mostraram efeito miorrelaxante e antiespasmódico do óleo essencial de *P. polygalaeflorus* e de seu constituinte β -cariofileno, sendo observada inibição da contratilidade do íleo isolado de ratos.

O óleo essencial dos frutos de *P. polygalaeflorus* foi avaliado por Coelho-de-Souza e colaboradores (2018) quanto ao seu efeito agudo tóxico, bem como atividade antinociceptiva e

antiedematogênica. O óleo apresentou dose letal (LD₅₀) de 3,4 g/kg, sendo classificado na categoria de baixa citotoxicidade. Quanto ao seu efeito farmacológico, reduziu o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, o número de lambidas no modelo de formalina na primeira e na segunda fase, e o tempo de latência, no modelo de placa quente. Esta atividade antinociceptiva foi atribuída em parte à atividade anti-inflamatória, uma vez que na segunda fase do modelo de formalina há o envolvimento de mediadores inflamatórios. Além disso, também apresentou atividade antiedematogênica nos modelos de edema de patas induzido por carragenina e dextrana.

Em 2013, em trabalho realizado por nosso grupo, estudou-se a composição do óleo essencial obtido dos frutos de *P. polygalaeiflorus* sendo avaliado seu efeito sobre a inflamação, e sobre a sobrevivência e proliferação de linfócitos. A caracterização química do óleo revelou a presença de β -cariofileno (34,95%) e β -elemeno (28,04%), como seus constituintes majoritários. Na avaliação anti-inflamatória, pelo modelo de bolha de ar, observou-se que a administração do óleo essencial foi capaz de inibir o recrutamento de leucócitos e a exsudação de proteínas para a cavidade da bolha. As análises macroscópicas das bolhas revelaram redução na vermelhidão e na vasodilatação do tecido, após tratamento. Além disso, demonstrou-se inibição da proliferação de linfócitos, com parada do ciclo celular na fase G1, além de indução de apoptose nessas células. Também foi observada uma modulação da ativação celular em nível de subpopulação de linfócitos, caracterizada por aumento da população de células B ativadas e redução na população total de células T CD8+ e na de células T CD8+ ativadas (Veloza *et al.*, 2013).

Continuando os estudos desta espécie, nosso grupo realizou análises fitoquímicas e farmacológicas dos extratos de *P. polygalaeiflorus*. Pinto e colaboradores (2013) caracterizaram os extratos etanólico (EEPpg), hexânico (EHPpg) e diclorometânico (EDPpg), os quais tiveram seus efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo avaliados. As análises fitoquímicas relevaram a presença de sesquiterpenos hidrocarbonados, sesquiterpenos oxigenados e furanoditerpenos nos extratos. Furanoditerpenos com grupo vouacapano estão presentes nos três extratos, constituindo 39%, 49% e 41% dos compostos em EHPpg, EDPpg e EEPpg, respectivamente. Os resultados obtidos mostram que todos os extratos são capazes de inibir a produção de nitrito em macrófagos murinos, sendo o EHPpg o mais eficiente, associado à baixa citotoxicidade. Observou-se uma redução na infiltração de neutrófilos no exsudato da bolha de ar, induzida no dorso de camundongos, sendo esta redução mais significativa para o EHPpg, cujo percentual de inibição foi de 62,3%. Esse dado foi corroborado pelas análises macroscópicas do tecido da bolha, onde o tratamento com o

extrato foi capaz de reduzir a vermelhidão e a vasodilatação, bem como o acúmulo de leucócitos na camada profunda do tecido (Pinto *et al.*, 2013).

Em trabalho recente do nosso grupo sobre a ação imunoreguladora e caracterização fitoquímica das frações (Fr1-4) do EHPpg, foi revelada a presença de diterpenos com esqueleto vouacapano nas frações Fr3 e Fr4, aos quais foram atribuídas as ações observadas. As frações Fr3 e Fr4 apresentaram efeito inibidor sobre a produção de NO e citocinas, por macrófagos, e sobre a migração *in vitro* e *in vivo* destas mesmas células, não havendo redução da viabilidade celular (Leal *et al.*, 2018).

Dada a importância dos efeitos farmacológicos da *P. polygalaeiflorus*, será abordado a seguir alguns aspectos de relevância da resposta imune e inflamatória.

1.3. Imunidade inata e adaptativa

O sistema imunológico, responsável pela resposta imunoinflamatória, é dividido em **imunidade inata e adaptativa**.

A **imunidade inata** é a primeira linha de defesa do organismo contra corpos estranhos ou micro-organismos. Ela consiste numa resposta rápida e estereotipada, inespecífica aos antígenos, os quais são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (RRP) presentes nas células efectoras. Esses receptores são capazes de reconhecer moléculas altamente conservadas em patógenos e moléculas indicadoras de estresse e morte celular. Esse reconhecimento desencadeia mecanismos que visam à eliminação da fonte do estímulo nocivo (Clark e Kupper, 2005; Turvey e Broide, 2010; Marshall *et al.*, 2018).

A imunidade inata é representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células efectoras (monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas mastócitos, basófilos, eosinófilos, células *natural killer* e células linfoides inatas), e moléculas solúveis, que estão presentes em todos os indivíduos, independente do contato prévio com imunógenos ou agentes agressores (Cruvinel *et al.*, 2010; Romo *et al.*, 2016; Marshall *et al.*, 2018).

A ampla variedade de estruturas antigênicas dos patógenos e sua capacidade de sofrerem mutações dificultam sua detecção pelo hospedeiro e impulsionaram a evolução da **imunidade adaptativa**. O sistema imune adaptativo depende de receptores que são selecionados em processos de recombinação somática de vários segmentos gênicos. Isso resulta em uma resposta altamente específica, flexível e com grande diversidade de

reconhecimento de antígenos. A resposta observada é caracterizada por autolimitação, tolerância a componentes próprios do organismo e memória imunológica, que permite ação mais rápida em caso de reexposição ao mesmo antígeno (Bonilla e Oettgen, 2010; Marshall *et al.*, 2018).

A imunidade adaptativa envolve a interação de células apresentadoras de antígenos (APCs) com linfócitos T e B, responsáveis pela resposta imune celular e humoral, respectivamente. Linfócitos T antígeno-específicos são ativados e proliferam em resposta ao contato com peptídeos antigênicos ligados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I ou II apresentados na superfície das APCs ao receptor de células T (TCR) e o correceptor (CD4 ou CD8). A apresentação de antígeno pelas moléculas de MHC classe I ativa as células T citotóxicas (CD8⁺), que são envolvidas na destruição de patógenos intracelulares e células tumorais, enquanto a apresentação pela molécula de MHC de classe II ativa linfócitos T *helper* (Th) (CD4⁺), envolvidos na modulação da atividade de outras células (Bonilla e Oettgen, 2010; Marshall *et al.*, 2018). A ativação dos linfócitos Th pode induzir diferentes tipos de respostas (resposta Th1, Th2, Th17, Treg) como consequência do repertório de citocinas do microambiente, da concentração do antígeno, do tipo de APCs e das moléculas coestimulatórias. Como resultado dessa diferenciação tem-se diferentes perfis de liberação de citocinas e influências sobre outros tipos celulares (Mosmann *et al.*, 1986; Luckheeram *et al.*, 2012; Marshall *et al.*, 2018).

Já os linfócitos B, uma vez ativados, ou se diferenciam em células plasmáticas produtoras de anticorpos ou em células de memória. Eles também podem atuar como APC (Bonilla e Oettgen, 2010; Marshall *et al.*, 2018).

1.4. Inflamação

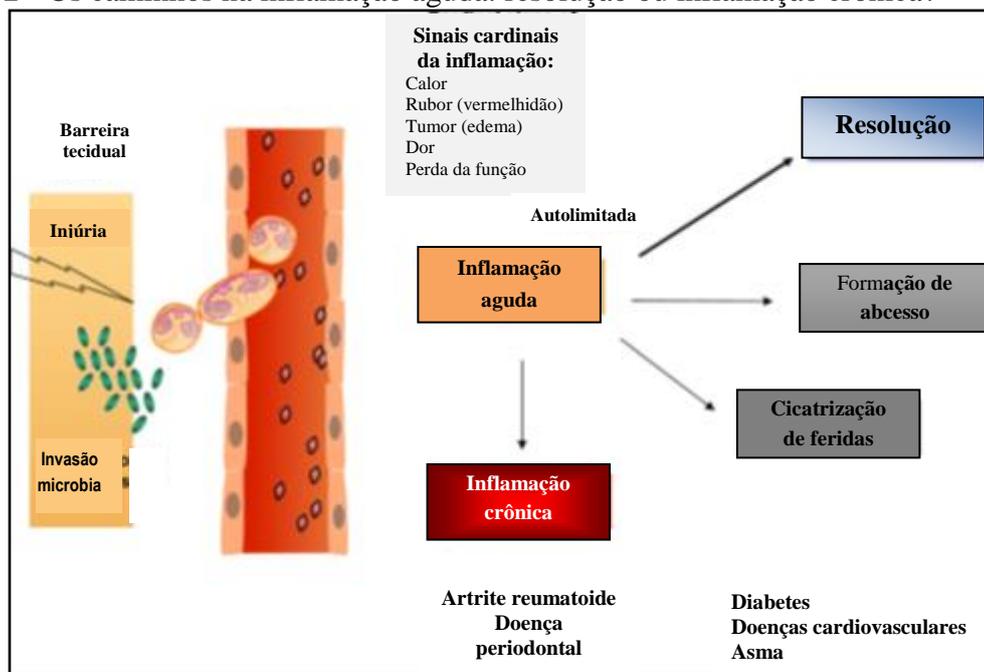
A inflamação é um processo fisiológico do organismo que ocorre em resposta a alguma infecção, desafio antigênico ou injúria tecidual. Sua principal função é a defesa do organismo visando a resolução do problema e restaurando a homeostase, através da eliminação do patógeno ou irritante e da potencialização do reparo tecidual (Figura 2). No entanto, esta resposta, quando em excesso, pode ser prejudicial, resultando na inflamação crônica, com injúria tecidual e disfunção de órgãos, podendo levar a doenças crônicas como

asma, diabetes, doenças cardiovasculares e artrite reumatoide (Figura 2) (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Pan *et al.*, 2010; Sehran *et al.*, 2010; Netea *et al.*, 2017).

A Figura 2 também mostra os cinco sinais cardinais que caracterizam a inflamação. A descrição dos quatro primeiros sinais: rubor (vermelhidão), tumor (inchaço, edema), calor e dor, por *Cornelius Celsus*, médico romano, no tratado *De Medica*, data do século I d.C.. O quinto sinal cardinal, a perda de função, foi relatado em 1858 por Rudolph Virchow, conhecido como o “pai da patologia moderna” em seu trabalho *Cellular pathologie* (Ryan e Majno, 1977; Medzhitov *et al.*, 2010).

De acordo com o tempo de duração e com suas características patológicas, a inflamação pode ser dividida em inflamação aguda e inflamação crônica.

Figura 2 - Os caminhos na inflamação aguda: resolução ou inflamação crônica?



Fonte: Adaptado de Sehran *et al.*, 2010.

1.4.1. Inflamação aguda

A inflamação aguda é um processo relativamente curto (horas a dias) com predominância de elementos da imunidade inata, onde as primeiras células envolvidas são neutrófilos e macrófagos (Cruvinel *et al.*, 2010). Durante uma infecção ou injúria tecidual, o

reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e/ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs) pelos RRP, presentes nas células da imunidade inata (ex. macrófagos residentes de tecido), iniciam uma cascata de sinalização que visa à produção e liberação de mediadores inflamatórios (Chen *et al.*, 2018). Esses mediadores são responsáveis pela produção de um exsudato inflamatório, formado por proteínas plasmáticas e leucócitos recrutados para o sítio da infecção ou injúria (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Medzhitov, 2008; Newton e Dixit, 2012). Após o extravasamento, os leucócitos seguem até o local da inflamação, atraídos por moléculas solúveis quimioatraentes. Entre os quimioatraentes estão produtos bacterianos, como peptídeos com terminal N-formil-metionil, leucotrienos e componentes do sistema complemento, como C5a (Kolaczkowska e Kubes, 2013). Todo esse processo ocorre em duas etapas denominadas eventos vasculares e celulares.

Os **eventos vasculares** caracterizam-se por alterações na superfície do endotélio que se iniciam por meio de constrição transitória de arteríolas, seguida por vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar, que são estimuladas por mediadores inflamatórios, como óxido nítrico (NO) e prostaglandinas vasodilatadoras (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Medzhitov, 2010; Kolaczkowska e Kubes, 2013). A vasodilatação resulta no aumento do fluxo sanguíneo local, e caracteriza-se clinicamente por vermelhidão e calor (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). O aumento da permeabilidade vascular é mediado por aminas vasoativas, histamina e serotonina, que são liberados por mastócitos e monócitos após a injúria (Cruvinel *et al.*, 2010), e permitem a exsudação de fluidos, proteínas e células para o tecido intersticial. O acúmulo de exsudado no tecido intersticial é caracterizado clinicamente pela formação do edema (Abbas *et al.*, 2010).

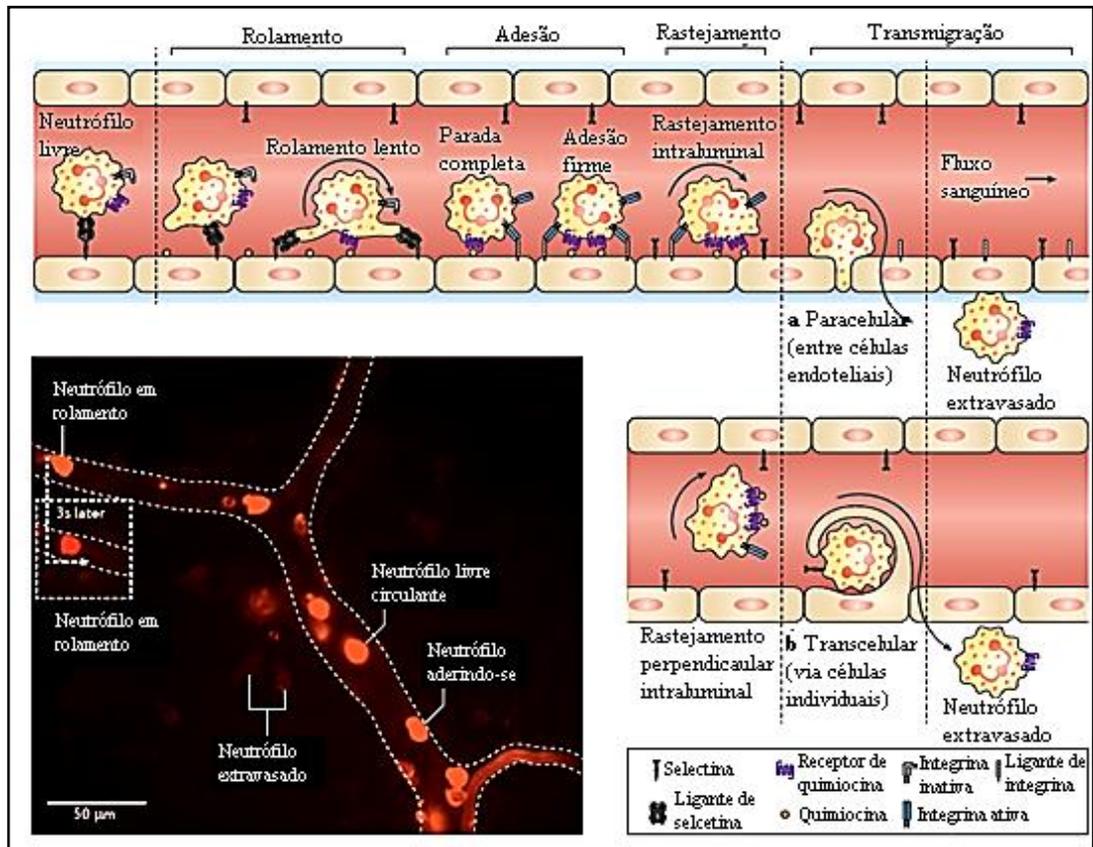
Os **eventos celulares** caracterizam-se pela ativação do endotélio, seguido de rolamento, adesão, rastejamento e transmigração de leucócitos, especialmente neutrófilos, para o tecido intersticial. Este extravasamento seletivo de leucócitos ocorre graças à ligação de selectinas, integrinas e à quimiotaxia promovida por quimiocinas (Figura 3) (Rottman, 1999; Pober e Sessa, 2007; Medzhitov, 2010).

1.4.2. Inflamação crônica

A incapacidade da eliminação do estímulo nocivo (bactérias intracelulares), a persistência de substâncias químicas, ou agentes físicos, como a radiação ultravioleta, traumas repetitivos, falhas na fase de resolução, insuficiente reparo tecidual ou doenças autoimunes levam ao estado de inflamação crônica (Cruvinel *et al.*, 2010; Medzhitov, 2008; 2010).

Trata-se de um processo mais prolongado (duração de semanas a meses ou anos) onde ocorre, simultaneamente, inflamação ativa, destruição tecidual e reparação por fibrose. Esse processo resulta da autoamplificação da resposta inflamatória por mecanismos de *feedback* positivo e da supressão de mecanismos de *feedback* negativos impedindo a fase de resolução. Como consequência, ocorre o recrutamento, ativação e transformação fenotípica e interação sinérgica de vários tipos de células, sustentando a produção de citocinas pró-inflamatórias no sítio inflamatório (Yao *et al.*, 2019).

Figura 3 - Etapas da cascata de recrutamento de leucócitos



Fonte: Adaptado de Kolaczowska e Kubers, 2013.

Assim, no tecido, o infiltrado de neutrófilos é substituído por macrófagos e, no caso de infecção, também por células T, que dependendo da classe efetora, vai determinar as características da inflamação crônica. Nesse processo, também pode haver a formação de granulomas e tecido linfóide terciário, cujo papel na patogênese da doença ainda não está esclarecido (Drayton *et al.*, 2006; Medzhitov, 2008).

Essa interação de fatores pode resultar em várias desordens debilitantes como doenças autoimunes, neurodegenerativas, doença vascular e metabólica, assim como o câncer, com ativação aberrante do sistema imune, tanto da resposta imune inata como adquirida.

1.5. Artrite reumatoide: definição, epidemiologia e sintomas

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença articular crônica de natureza autoimune que afeta cerca de 0,5 a 1% da população (Silman e Person, 2002; Smolen, 2018). Esta patologia caracteriza-se por destruição articular progressiva, que se manifesta clinicamente por artralgia, inchaço, vermelhidão e pode levar à limitação do movimento (Smolen, 2018; Guo, 2018). Além disso, é associada com comorbidades sistêmicas, como manifestações vasculares, metabólicas, ósseas e de domínio psicológico, que contribuem para redução da expectativa de vida dos pacientes (Gabriel, 2008; Innala *et al.*, 2016; McInnes e Schett, 2017; Smolen, 2018).

Devido a seus efeitos sistêmicos, a síndrome carrega um fardo socioeconômico substancial. Suas características incapacitantes reduzem a qualidade de vida dos indivíduos acometidos, afetando sua capacidade funcional e laboral, reduzindo, como consequência, sua participação econômica na sociedade (Sokka *et al.*, 2010; Cross *et al.*, 2014).

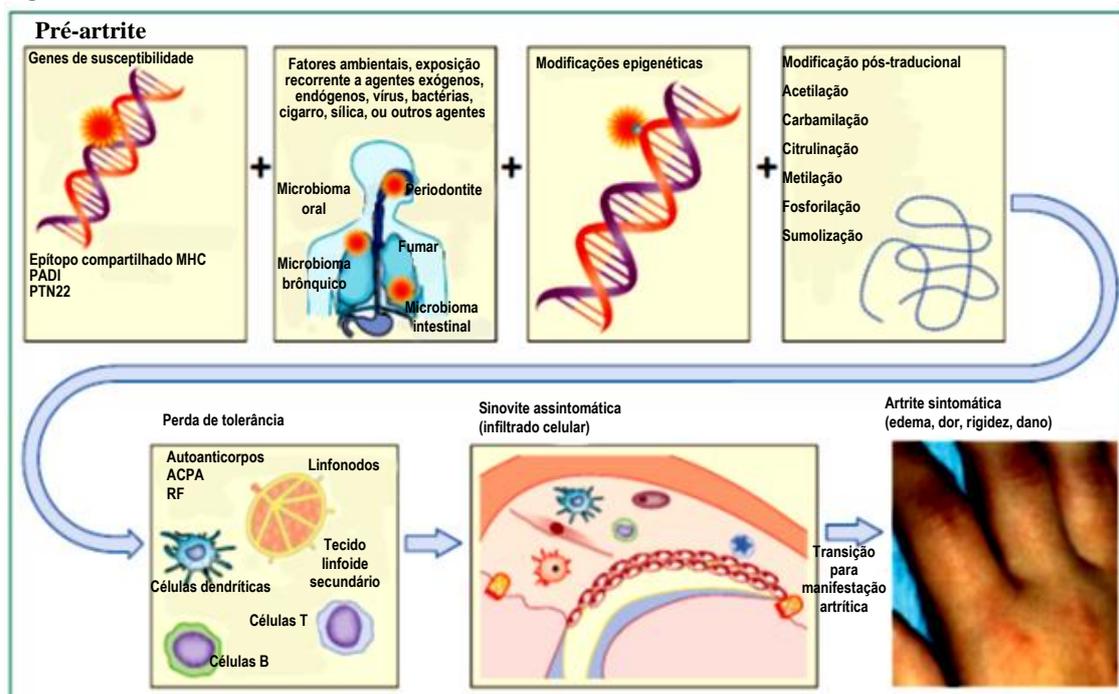
A incidência e a prevalência da AR tendem a aumentar com a idade até cerca de 70 anos, com posterior remissão (Wadekar *et al.*, 2015). As mulheres têm de duas a três vezes mais chances de desenvolver a doença quando comparadas aos homens, e apresentam esse risco mais elevado entre 40 e 50 anos de idade (Van Vollenhoven, 2009; Mota *et al.*, 2013).

A etiologia da artrite reumatoide é desconhecida, mas seu desenvolvimento está relacionado a uma associação de fatores genéticos, ambientais e epigenéticos. Esses fatores agindo conjuntamente podem resultar na desregulação do sistema imunológico, aumentando a susceptibilidade de desenvolvimento das manifestações clínicas (Kourilovitch *et al.*, 2014; Calabresi *et al.*, 2018).

Mais de cem *locus* gênicos foram associados com o risco e progressão da doença. No entanto a presença de epítipo compartilhado (EC) codificado pelo gene do antígeno leucocitário humano (HLA), especialmente HLA-DR1 e HLA-DR4, é o fator de maior influência. O EC representa até 40% da influência genética da doença e sua presença tem sido associada a um aumento na eficiência da apresentação aos linfócitos T, de peptídeos alterados por modificações pós-traducionais (Gregersen *et al.*, 1987; Yarwood *et al.*, 2016; Deane *et al.*, 2017; Firestein e McInnes, 2017).

Dentre os fatores ambientais envolvidos na AR, o tabagismo representa entre 20-30% de influência na doença. O fumo tem sido relacionado ao aumento da citrulinação de proteínas pela peptil arginina desaminase (PADI), principalmente em pacientes que apresentam o EC (Makrygiannakis *et al.*, 2008; Klareskog *et al.*, 2011). A PADI é a enzima responsável pela conversão pós-traducional de arginina a citrulina em peptídeos e suas isoformas são encontradas em diversos tecidos (Darrah e Andrade, 2018). Várias outras modificações pós-traducionais, como acetilação, metilação, sumoilação, também podem estar envolvidas na perda da tolerância imunológica (Figura 4). Outras condições, como exposição ocupacional à poeira de sílica, doenças periodontais (Bingham e Moni, 2013), baixa ingestão de vitamina D, alta ingestão de sódio e obesidade estão associadas ao risco e progressão da doença (Deane *et al.*, 2017).

Figura 4 - Fatores envolvidos no desenvolvimento da artrite reumatoide



Fonte: Adaptado de Smolen *et al.*, 2016.

Mecanismos epigenéticos, como metilação de DNA, modificação de histonas e expressão de micro-RNA, também têm sido implicados na AR (Firestein e McInnes, 2017). Esses fatores contribuem para a patogênese da doença provavelmente integrando fatores genéticos e fatores ambientais (Klein e Gay, 2015; Smolen *et al.*, 2016), como apresentado na Figura 4. O *background* genético de alto risco, as marcações epigenômicas, que contribuem para a hereditariedade e cronicidade da doença, e os fatores ambientais estocásticos que criam novos epítomos, atuam de forma conjunta. Desta forma, é desencadeada uma cascata de eventos que induzem a sinovite e levam à artrite destrutiva crônica, com suas manifestações articulares e extra-articulares (Firestein e McInnes, 2017).

1.5.1. Patofisiologia da AR

A artrite reumatoide é uma doença multifatorial cuja patogênese apresenta um amplo espectro de estágios, como apresentado na Figura 5, que pode se iniciar anos antes mesmo do início dos seus sintomas clínicos (Yarwood *et al.*, 2016). Essa patologia resulta da quebra de autotolerância do sistema imunológico, sistemicamente e em nível de tecido sinovial (Hitchon e El-Gabalawy, 2011).

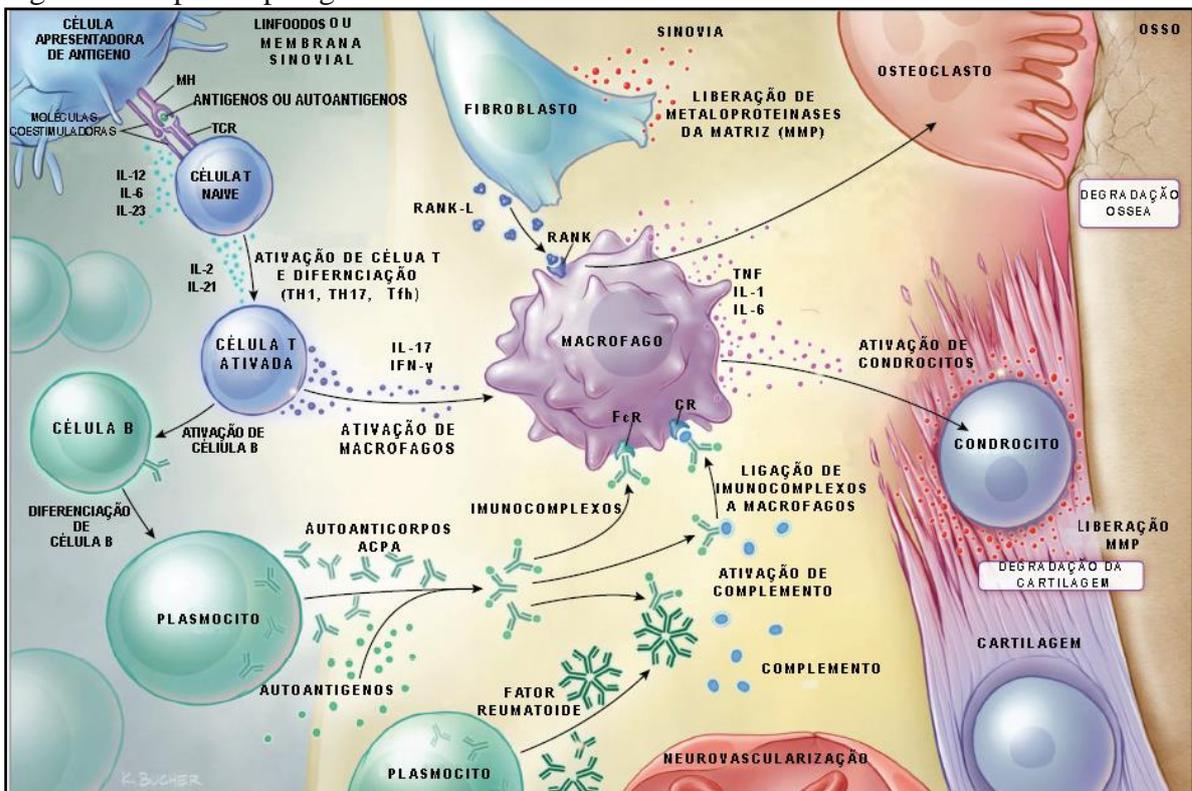
A fase de pré-artrite ocorre como consequência da interação dos fatores de predisposição. Peptídeos próprios, como fibrina, vimentina, fibronectina, colágeno tipo II, α -enolase e histonas, são alterados por processos de citrulinização de proteínas ou outras modificações pós-traducionais. Esses peptídeos se ligam a heterodímeros de MHC, principalmente os que contêm o EC, e são apresentados aos linfócitos T. Os linfócitos T, por sua vez, ativam e estimulam linfócitos B que iniciam a síntese de autoanticorpos, como anticorpos antiproteínas citrulinadas (ACPA), que se ligam aos neoepítomos formados pela citrulinização, e o Fator Reumatoide (FR), que se liga a porção Fc da IgG (Holers *et al.*, 2013; Muller e Radic, 2015). Durante o processo de ativação de macrófagos e linfócitos, todo um conjunto de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF-alfa, IL-12, IL-17) é secretado, ampliando a resposta imunoinflamatória e contribuindo para a cronicidade da doença (Figura 5) (Aletaha e Smolen, 2018).

A ligação dos autoanticorpos, incluindo os ACPA e fatores reumatoides, aos autoantígenos específicos, formam imunocomplexos, permitindo a ativação do sistema complemento (Smolen *et al.*, 2016). Por outro lado, a interação do RANK-L (ligante do

receptor ativador do fator nuclear κ B), liberado por fibroblastos, com o RANK (receptor ativador do fator nuclear κ B), na membrana do macrófago, ativa a diferenciação de macrófagos em osteoclastos, resultando em degradação do osso (Figura 5) (Smolen *et al.*, 2016).

Os autoanticorpos, principalmente os ACPAs, estão associados à grande atividade da doença, manifestações extra-articulares e maior dano articular (Firestein e McInnes, 2017) e sua presença é utilizada como marcador diagnóstico e prognóstico da doença. Essa soropositividade, bem como a presença de citocinas pró-inflamatórias circulantes e quimiocinas pode ser detectada em até dez anos antes da doença, na fase pré-clínica, e sugerem uma patologia inflamatória sistêmica subclínica (Nielen *et al.*, 2004; Deane *et al.*, 2010; Firestein e McInnes, 2017; Smolen *et al.*, 2016). Os níveis séricos de ACPA aumentam gradualmente ao longo dos anos, atingindo um pico no início da doença até o primeiro ano dos sintomas clínicos (Firestein e McInnes, 2017).

Figura 5 - Aspectos patogênicos da artrite reumatoide



Legenda: IL - Interleucina; IFN- γ - interferon gama; TNF - fator de necrose tumoral; TCR - receptor de célula T; MHC - complexo principal de histocompatibilidade; RANK receptor ativador do fator nuclear κ B; RANKL - ligante do RANK; ACPA - anticorpo antiproteínas citrulinadas; CR, receptor do complemento; FcR - receptor de Fc; TCR - receptor de células T; Tfh - células T-helper foliculares.

Fonte: Adaptado de Aletaha e Smolen, 2018.

Os ACPA são encontrados na sinóvia e na articulação de pacientes com AR e podem ser patogênicos devido à ativação de macrófagos ou de osteoclastos, promovendo a perda óssea, enquanto o FR é mais diretamente envolvido na ativação de macrófagos e indução de citocinas (Smolen *et al.*, 2016).

O local onde esta resposta imune é iniciada é incerto, mas acredita-se que a iniciação ocorra fora das articulações em sítios de inflamação local, provavelmente na superfície de mucosas. No entanto, essa autoimunidade transita para a articulação através de mecanismos pouco compreendidos (Holers, 2013).

Essa entrada pode ocorrer pela deposição de complexos imunes pré-formados da circulação na membrana basal das vênulas pós-capilares, podendo levar a vasculite. Outro possível mecanismo é a entrada direta de complexos imunes pré-formados ou autoanticorpos de citrulinação na sinóvia com ou sem vasculite associada; e finalmente, autoanticorpos podem entrar na cavidade sinovial e se ligarem diretamente a antígenos específicos na cartilagem (Hitchon e El-Gabalawy, 2011; Arend e Firestein, 2012).

O envolvimento articular na AR é caracterizado por inflamação da membrana sinovial e ativação imunológica em pequenas articulações simétricas, manifestando-se externamente por inchaço (Guo *et al.*, 2018).

A cartilagem articular normal é caracterizada por uma camada fina de tecido conjuntivo especializado, com propriedades viscoelásticas, avascular, composto de uma matriz extracelular (MEC) densa e distribuição espaçada de condrócitos, que sintetizam seus componentes. Esta cartilagem tem a função de fornecer uma superfície lisa e lubrificada para baixa fricção na articulação e facilitar a transmissão de cargas para o osso subcondral subjacente. A MEC é composta majoritariamente por colágeno e proteoglicanos. Este conteúdo contribui para a retenção de água na MEC, o que é essencial para a sua função. O colágeno é a macromolécula estrutural mais abundante na MEC, representando cerca de 60% do peso seco da cartilagem. O colágeno tipo II (CII), por sua vez, representa 90-95% desse conteúdo e forma fibrilas que se interconectam com os agregados de proteoglicanos. Os proteoglicanos são o segundo grupo de macromoléculas mais abundantes da MEC, representando cerca de 10 a 15% de seu peso seco (Fox e Bedi, 2009; Decker, 2017).

A cápsula articular é composta por duas camadas distintas: uma externa, composta por uma grossa camada de tecido conjuntivo fibroso, e uma interna, denominada membrana sinovial (ou sinóvia), que secreta o líquido lubrificante da cavidade articular (Iwanaga *et al.*, 2000). O tecido conjuntivo é pobremente demarcado e contém redes vasculares, poucos mastócitos e raríssimos linfócitos e não possui membrana basal verdadeira. Já a membrana

sinovial é formada por duas populações de células (sinoviócitos) que formam uma fina camada de até duas células de espessura: os sinoviócitos do tipo A (sinoviócitos semelhantes à macrófagos - MLS) e sinoviócitos do tipo B (sinoviócitos semelhantes à fibroblastos - FLS) (Tu *et al.*, 2018). Os FLS são mais abundantes que os MLS, produzem os componentes de matriz extracelular e o fluido sinovial e são importantes para a integridade da cartilagem e lubrificação da articulação (Amin *et al.*, 2017; Ospelt, 2017; Tu *et al.*, 2018).

Na artrite reumatoide o compartimento sinovial normal é infiltrado por leucócitos e o fluido sinovial é rico em mediadores pró-inflamatórios que interagem com as células para produzir uma cascata inflamatória. Esse processo é caracterizado pela interação de FLS com células infiltrantes da imunidade inata, como monócitos, macrófagos, mastócitos e células dendríticas; e da imunidade adquirida, como linfócitos T e B. Como consequência dessa interação tem-se uma sinovite crônica resultante da falha da resolução do processo inflamatório (Tan e Smolen 2016; McInnes *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2018). As três células mais abundantes na membrana sinovial durante esse processo são: FLS, células da linhagem monocítica e linfócitos T, mas os outros tipos celulares também são importantes na patogênese da doença (Amin *et al.*, 2017).

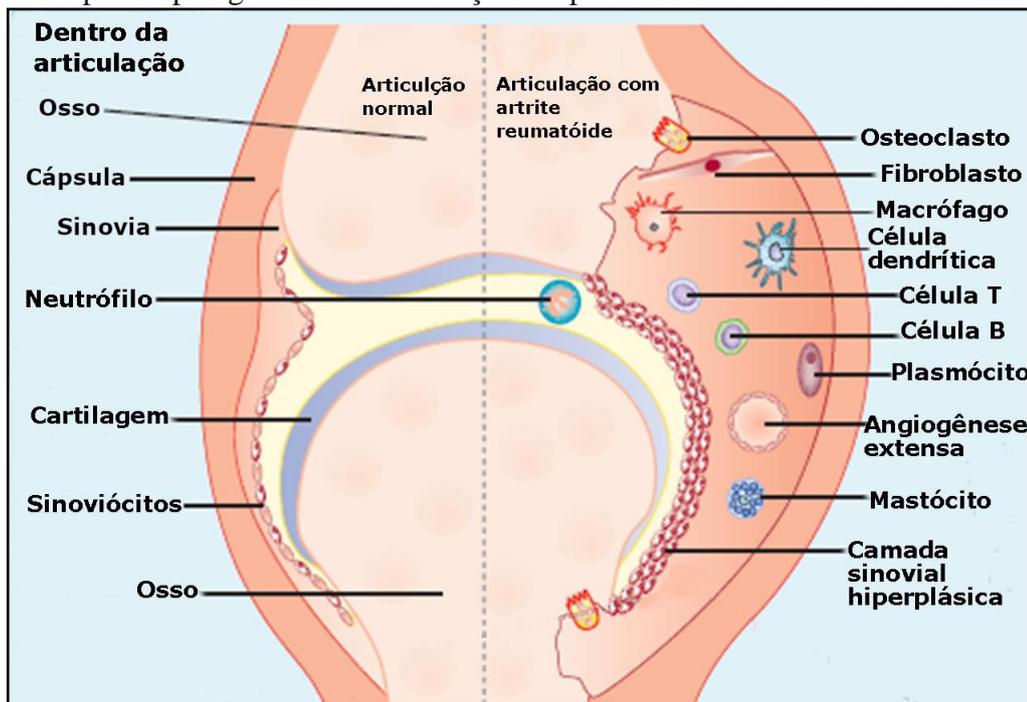
Nesse contexto, os FLS passam a secretar citocinas pró-inflamatórias, como Interleucina (IL)-6, em resposta à IL-1 e TNF- α produzidos pelos MLS. Essa resposta de secreção de citocinas estimula sua interação com outras células, como os MLS, que se ativam na polarização M1. Além disso, os FLS sofrem hiperplasia e adquirem um fenótipo de hiperproliferação e de longa-vida. O caráter invasivo da doença é facilitado pela produção de enzimas pelos FLS, como metaloproteinases de matriz (MMPs), que degradam a matriz extracelular, culminando na formação do *pannus* maduro (Figura 6). Essas células ainda contribuem para a patogênese da doença com a produção de fatores como fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), colagenases, catepsinas e RANKL (Müller-Ladner *et al.*, 2007; Ospelt, 2017; Amim *et al.*, 2017; Tu *et al.*, 2018).

Os MLS contribuem para o desenvolvimento e progressão da AR através da secreção de fatores, como espécies reativas de oxigênio, intermediários do NO e enzimas de degradação de matriz. Além disso, produzem citocinas que estimulam o recrutamento de monócitos e leucócitos, a ativação dos FLS e polarização de linfócitos T (Tu *et al.*, 2018). O influxo de monócitos e sua ativação em macrófagos é uma etapa crucial na patogênese da AR e a presença dessas células é relacionada com uma maior taxa de degradação óssea e erosão articular. No sítio inflamatório macrófagos ativados produzem citocinas, como o fator de

necrose tumoral-alfa (TNF- α), IL-1 β e IL-6, que são críticas para a patogênese da doença (Kinne *et al.*, 2000; McInnes e Sheet, 2017).

A AR caracteriza-se por um número aumentado de células T ativadas e de memória, que exibem marcadores de superfície de ativação recente (CD69) e tardia (MHC de classe II) (Brennan *et al.*, 2008). Essas células podem ser ativadas em outras partes do corpo e migrar para o tecido sinovial, ou podem ser ativadas localmente pelas APC profissionais ou pelos FLS.

Figura 6 - Aspectos patogênicos da articulação em paciente com artrite reumatóide



Fonte: Adaptado de Smolen *et al.*, 2016.

As células T CD4⁺ são as maiores desencadeadoras da imunidade exacerbada observada na AR (GUO *et al.*, 2018). Sua interação com monócitos leva à diferenciação e polarização para formas patogênicas de ambas as células, além da diferenciação celular em osteoclastos no tecido sinovial, e resulta na secreção de mediadores pró-inflamatórios e reabsorção óssea (Roberts *et al.*, 2015; Amin *et al.*, 2017).

Dentre os subtipos de células T CD4⁺, linfócitos Th1, Th17 e Treg são os encontrados no tecido sinovial inflamado, sendo as células Th1 de maior predominância. (Nevius *et al.*, 2016). No entanto, o papel central na patogênese da AR tem sido dado aos linfócitos Th17. A IL-17, produzida por essas células, induz respostas associadas ao recrutamento de leucócitos, ativação de células inflamatórias, e estão fortemente relacionadas à destruição tecidual e óssea. Além disso, recentes estudos demonstram a existência de células do subtipo T CD4⁺

periféricas, que induzem a diferenciação e produção local de autoanticorpos por linfócitos B (Rao *et al.*, 2017; Amin *et al.*, 2017).

Linfócitos regulatórios (Treg) são essenciais para a prevenção da autoimunidade (Amin *et al.*, 2017). Na AR no entanto, os altos níveis de TNF- α podem inibir a atividade supressiva dessas células sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias por células Th. Nessa condição, ocorre um desbalanço entre a razão Th17/Treg e resistência das Th17 à supressão, o que contribui para a patogênese da doença (Cooles *et al.*, 2013).

1.5.2. Estratégias de tratamento da AR e busca por alternativas terapêuticas

A reversão da inflamação é um alvo terapêutico relevante na AR. Nesse contexto, um tratamento de sucesso seria o que levasse a uma redução dos sintomas clínicos, do dano articular e ósseo, das incapacidades e comorbidades. Para isso é necessária uma avaliação constante da atividade da doença, durante a terapia, o que possibilita adaptações ou reavaliações da estratégia terapêutica, em caso de insucesso ou baixa remissão (Smolen *et al.*, 2016). Dessa forma, as estratégias de tratamento atuais para AR incluem as drogas antirreumáticas modificadoras de doença (DMARDs), os anti-inflamatórios não-esteroidais anti-inflamatórios não-esteroidais (NSAIDs), e os glicocorticoides (Wilsdon e Hill, 2017).

As DMARDs são drogas imunossupressoras que têm como alvo a inflamação. Elas interferem nos sinais e sintomas da doença, na melhora da função física e na progressão do dano articular (Aletaha e Smolen, 2018). Essas drogas são categorizadas como agentes sintéticos: metotrexato, leflunomida, hidroxicloroquina e sulfasalazina, ou como agentes biológicos: abatacept, etanercept, infliximab, rituximab, tocilizumab, entre outros (Wilsdon e Hill, 2017).

Os DMARDs sintéticos são administrados por via oral e interferem em vias críticas da cascata inflamatória. Nesse grupo, o metotrexato (MTX) apresenta papel de destaque, sendo considerado o pilar do tratamento da AR pelo EULAR, que o considera a abordagem ideal quando coadministrado com baixas doses de glicocorticoides de curta duração (Smolen *et al.*, 2016; Aletaha e Smolen, 2018).

O MTX é um análogo do folato que, nas doses empregadas para tratamento da AR, inibem a ativação de linfócitos T. No entanto, sua utilização pode produzir efeitos adversos, como náuseas, úlceras na boca, alopecia reversível, nódulos reumatoides, mielossupressão,

cirrose hepática e pneumonite alérgica. Alguns desses efeitos são minimizados pela suplementação com ácido fólico, mas se faz necessário o monitoramento do paciente através de exames (ex. hemograma completo, teste de função hepática e creatina) para garantir um tratamento seguro e eficaz (Wilsdon e Hill, 2017; Kumar e Banick, 2013).

Os DMARDs biológicos são anticorpos monoclonais que têm como alvo moléculas especiais ou intermediários das vias moleculares envolvidas na patogênese da AR. Essa terapia inclui inibidores de TNF- α , bloqueio e depleção de células B, bloqueio da coestimulação de células T, inibidores de IL-6 e IL-1, e inibidores de proteínas quinases (Rein e Mueller, 2017). No entanto, a terapia está associada ao maior risco de desenvolver infecções (Curtis *et al.*, 2007; Wilsdon e Hill, 2017).

Os glicocorticoides apresentam forte efeito anti-inflamatório e imunossupressor, atuando em nível celular e molecular. A terapia com baixas doses de glicocorticoides proporciona melhora dos sintomas e modificação da doença de forma rápida, mas é associada com efeitos colaterais em longo prazo. Seu uso crônico aumenta o risco de osteoporose e fraturas ósseas, sangramento gastrointestinal, úlcera péptica, diabetes *mellitus*, infecções, catarata e comprometimento da resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, além de efeitos cardiovasculares e susceptibilidade a infecções (Spies *et al.*, 2011; Kumar e Banik, 2013). Também é observada ausência de resposta ao tratamento por cerca de 30% dos pacientes, que pode estar relacionada à resistência (Sliwinska-Stanczyk *et al.*, 2007).

Os NSAIDs, como aspirina e ibuprofeno, são efetivos para o alívio da dor, inchaço e rigidez na AR (Crofford, 2013). Sua ação está relacionada à inibição da enzima ciclooxigenase (COX), levando ao bloqueio da síntese de prostaglandinas (PGs). A COX é expressa em duas isoformas: COX-1 e COX-2. A COX-1 é uma enzima constitutiva, expressa em condições basais e que está envolvida na síntese de PG que atendem às condições homeostáticas (Crofford, 2013). A COX-2 tem sua expressão aumentada em condições inflamatórias. Os efeitos clínicos dos anti-inflamatórios não esteroidais são avaliados de acordo com seus efeitos nas diferentes isoformas. A inibição de COX-2 está relacionada aos efeitos desejáveis da resposta anti-inflamatória e analgésica dos NSAIDs. Já a inibição da COX-1 representa um importante efeito indesejável associado a este tratamento, podendo resultar em ulceração e sangramento gastrointestinal e efeitos cardiovasculares (Wongrakpanich *et al.*, 2018).

1.6. Artrite experimental como modelo na busca de novas alternativas terapêuticas

A artrite reumatoide é uma doença multifatorial por isso se faz necessário um melhor entendimento dos aspectos relacionados ao seu desenvolvimento e progressão. Nesse contexto, os modelos animais, apesar de suas limitações, têm sido ferramentas úteis para aumentar a compreensão acerca dos mecanismos patogênicos da doença, fornecendo novos alvos terapêuticos e para o teste pré-clínico de novas drogas, permitindo a avaliação de sua potência, eficácia e segurança (Asquith *et al.*, 2009; Bevaart *et al.*, 2010; Choudhary *et al.*, 2018).

Os modelos experimentais podem ser desenvolvidos em uma variedade de espécies animais, sendo mais disseminada a utilização de roedores em função de fatores como o baixo custo, homogeneidade de *background* genético, além da facilidade de manuseio (Choudhary *et al.*, 2018).

Dentre os modelos experimentais de artrite temos: a) artrite induzida por hiperimunização de linhagens murinas susceptíveis com antígeno, como o colágeno tipo II (CIA); b) artrite induzida por adjuvantes (como adjuvante completo de Freund - AIA); c) artrite induzida por peptídeo glicano; d) artrite induzida por anticorpo; e) artrite induzida por zymosan; f) modelos manipulados geneticamente ou espontâneos, como o camundongo transgênico TNF- α , camundongo transgênico K/BxN e camundongo Skg (Wilder, 1999; Kannan *et al.*, 2005, Asquith *et al.*, 2009).

1.7. Artrite induzida por colágeno (CIA)

A CIA é o modelo experimental de artrite mais utilizado na pesquisa pré-clínica. Ele é realizado em linhagem de camundongo (ex. DBA1) ou rato com suscetibilidade genética associada à moléculas de MHC de classe II específicas (haplótipo $h-2^q$ $h-2^r$, no caso de camundongo DBA1) (Holmdahl *et al.*, 2002; Rosloniec *et al.*, 2010).

Neste modelo, os camundongos são injetados com colágeno tipo II heterólogo, o maior constituinte proteico da cartilagem articular, emulsificado em adjuvante completo de Freund

(AFC), sendo feita uma dose reforço, sem adjuvante, após 21 dias. No sítio de imunização, células dendríticas (CDs) capturam o CII heterólogo e, com o estímulo do lipopolissacarídeo (LPS) e peptídeoglicanos da micobactérias do AFC, amadurecem e migram para os linfonodos drenantes. Nos linfonodos drenantes as CDs apresentam peptídeos de CII associados à molécula de MHC de classe II, os linfócitos T virgens, ativando-os. Essa interação também permite a ativação de linfócitos B virgens que passam a produzir anticorpos direcionados contra CII, principalmente IgG2a e Ig2b (Holmdahl *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2007). Na articulação esses anticorpos se ligam aos seus epítomos de CII, permitindo a ativação da cascata do complemento, que resulta no recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o tecido articular. Ao se ativarem, essas células secretam quimiocinas e citocinas (ex. TNF-a, IL-6, NO) que ativam fibroblastos e macrófagos sinoviais e recrutam outras células, como células NK (*natural killer*), linfócitos T e B. A interação dessas células e o microambiente de citocinas e moléculas efetoras por elas produzidas leva à degradação articular e óssea semelhante ao observado na AR humana (Wang *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2007). Essas alterações se manifestam histologicamente como infiltração de células imunes, levando a formação de *pannus* e hiperplasia de membrana sinovial (Choudhary *et al.*, 2018).

1.8. Considerações finais

A falta de responsividade às estratégias de tratamento atuais, a redução da eficácia ao longo do tempo, o alto custo do tratamento e a existência de efeitos adversos associados ao tratamento (Smolen *et al.*, 2016; Malekzadeh, 2017; Aletaha e Smolen, 2018) tornam necessária a busca por alternativas terapêuticas para a AR. Nesse contexto, os produtos naturais são considerados agentes promissores (Farzaei *et al.*, 2016), e as plantas, sobretudo, são consideradas fontes de moléculas de grande importância para a saúde humana, sendo por isso, alvos do interesse de diversas pesquisas para a elucidação de seus metabólitos secundários, e atividades biológicas (Dias *et al.*, 2012; Shen, 2015).

Os metabólitos secundários são compostos químicos sem função vital para as plantas, mas de importante função para sua adaptação ao ambiente, sendo sua síntese, portanto, influenciada por fatores ambientais (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). São divididos, de acordo com sua via biossintética, em três classes: terpenoides, compostos fenólicos e alcaloides (Bourgaud *et al.*, 2001; Peres, 2016). A diversidade estrutural e química única

desses metabólitos representam uma possibilidade de descoberta de novas drogas para diversas doenças, como a artrite reumatoide (Rates *et al.*, 2001; Calixto e Siqueira, 2008; Dias *et al.*, 2012; Shen, 2016).

Desta forma, este trabalho vem contribuir com o estudo de um metabólito secundário obtido da espécie *Pterodon polygalaeiflorus* na busca de potenciais alternativas terapêuticas no tratamento da artrite experimental.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Uma vez que a espécie *Pterodon polygalaeflorus* é usada popularmente para tratamento de desordens inflamatórias, e considerando que diversos trabalhos relacionam suas atividades biológicas à presença de diterpenos furânicos em sua composição, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo* de compostos desta classe obtidos do extrato diclorometano dos frutos de *Pterodon polygalaeflorus*.

2.2. Objetivos específicos

- a) Realizar o isolamento de compostos da classe dos diterpenos a partir do extrato diclorometano dos frutos de *Pterodon polygalaeflorus*;
- b) Avaliar o efeito do composto isolado em ensaios *in vitro* de viabilidade celular, produção de NO e migração celular de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS;
- c) Avaliar o potencial anti-inflamatório do composto isolado nos seguintes ensaios *in vivo*:

— modelo de inflamação aguda induzida por carragenina, avaliando o edema e as alterações histológicas nas patas dos animais.

— modelo de inflamação crônica de artrite induzida por colágeno II (CIA), analisando os seguintes parâmetros: índice de artrite, escore clínico de severidade, alterações radiológicas e histológicas das patas, variação do peso corporal e de órgãos, imunofenotipagem das populações de linfócitos T e B e sua ativação, além de alterações hematológicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Produto natural

Foram utilizados frutos da espécie *Pterodon polygalaeflorus*, que pertencem à família Fabaceae. A identificação botânica da espécie foi confirmada por Haroldo Cavalcante Lima, do Departamento de Botânica Sistemática do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, onde uma exsicata foi depositada (R350278, julho 1999).

3.2. Preparo do extrato

Os frutos de *Pterodon polygalaeflorus* foram lavados em água corrente e secos à temperatura ambiente. Em seguida, foram pesados (100 g) em balança analítica (Micronal B200, Brasil) e pulverizados com nitrogênio líquido em um gral metálico, sendo transferidos para cartuchos de papel de filtro, com o auxílio de uma espátula. O material contido nos cartuchos foi submetido à maceração em diclorometano (grau HPLC, Tedia Brazil Ltda., Brasil) por 15 dias, sendo acomodados em frascos de vidro de cor âmbar ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Após esse período, o cartucho foi retirado e descartado, o macerado foi transferido para um balão de fundo redondo previamente pesado (peso inicial (Pi)), sendo submetido à evaporação em evaporador rotativo (IKA® RV10, Alemanha). Após a completa evaporação do solvente, obteve-se o extrato diclorometânico de *Pterodon polygalaeflorus* (EDPpg). O peso do balão foi aferido após a evaporação do solvente para se calcular a massa obtida (peso final balão – Pi) e o rendimento da extração ((peso extrato após evaporação/peso fruto pulverizado) x 100). O procedimento foi repetido até se obter uma massa suficiente para realização dos ensaios.

3.3. Fracionamento do EDPpg

Foram utilizados para o fracionamento solventes grau HPLC da Tedia Brazil Ltda. (Brasil). O extrato foi fracionado em coluna aberta contendo a resina de gelfiltração Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich, EUA) medindo 48 cm de altura e 3,5 cm de diâmetro. Foram aplicados 2 g EDPpg em etanol, utilizando como eluente o etanol grau HPLC (400 mL), sendo coletados 32 eluatos (10 mL/tubo).

Os eluatos foram aplicados em placas de cromatografia de camada delgada (TLC) de sílica gel 60 de 7 cm x 20 cm (AlugranSil G, Macherey-Nagel, Alemanha) a 1 cm da origem. Após a aplicação as amostras foram colocadas em cuba vertical com a fase móvel metanol e diclorometano (2:98 v/v) para o desenvolvimento da corrida cromatográfica. Posteriormente, a placa foi retirada da cuba e deixada à temperatura ambiente para secar. A revelação para terpenoides foi realizada como descrito por Wagner e Bladt (2001). A solução de ácido sulfúrico 10% em etanol e vanilina 1% em etanol (Sigma-Aldrich, EUA) (1:1 v/v) foi borrifada na placa por inteiro. Após secar, a placa foi incubada a 100°C por 10 min para revelação das amostras e fotografada (Máquina fotográfica digital, modelo DSC-H50, Sony, Brasil).

Os eluatos foram reunidos de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico em cinco grupos: Grupo I (E1-5), Grupo II (E6-10), Grupo III (E11-13), Grupo IV (E14-16) e Grupo V (E17-32). No grupo III observou-se a formação de precipitado de cor branca, e após técnicas de cristalização/recristalização com CH_2Cl_2 , os cristais foram isolados e denominados Ppg-01 (9 mg).

3.4. Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS)

As análises qualitativas do EDPpg e o Ppg-01 foram realizadas em um cromatógrafo a gás Shimadzu 17A acoplado a espectrômetro de massas Shimadzu QP 2010 Plus, com detector de MS com fonte de ionização por elétrons - impacto de elétrons (IE) a 70 eV (Shimadzu, Japão). Para a separação dos constituintes da amostra, foi utilizada uma coluna capilar de gel de sílica fundida Rtx®-5MS, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura da fase (Restek Corporation, EUA). O gás de arraste utilizado

foi hélio ultrapuro.

Para a análise do EDPpg o injetor foi operado a 260°C e a temperatura do forno foi programada como se segue: 50 °C durante 3 min, com aumento de 3°C por minuto até 290°C, e assim permanecendo por mais 1 min, totalizando 84 min de corrida. A amostra foi solubilizada em metanol, sendo injetado 1 µL (1mg/mL) no modo Split de 10:1. O fluxo da coluna foi de 1,58 mL e os espectros de massa foram registrados em uma faixa de 40 a 500 Da em modo Scan com energia de ionização por impacto de elétrons de 84 kV.

Para análise do Ppg-01, o injetor foi operado a 260°C e a temperatura do forno inicial foi de 100°C com aumento de 7°C por minuto até alcançar 300°C, onde permaneceu por mais 1,43 min, totalizando 30 min de corrida. A amostra foi solubilizada em diclorometano, sendo injetado 1 µL (1 mg/mL) no modo Split de 10:1. O fluxo da coluna foi de 1,5 mL/min. Os espectros de massa das leituras foram registrados em uma faixa de 40 a 500 Da em modo Scan com energia de ionização por impacto de elétrons de 84 kV.

A identificação das substâncias foi realizada pela comparação dos seus índices de retenção e espectros de massas (MS) com dados da literatura e da biblioteca WILEY 275 e NIST 3.0, fornecidas pelo sistema GC-MS (Shimadzu 17A - Shimadzu QP2010 Plus). Os resultados também foram confirmados comparando a ordem de eluição dos compostos com seus índices de retenção relativo relatados na literatura (Adams, 2001).

3.5. Cultura de células RAW 264.7

A linhagem de macrófagos RAW 264.7 consiste em tumor induzido pelo vírus da leucemia murina de Abelson, em camundongos BALB/c. É negativa para a expressão de imunoglobulinas Ia e Thy 1.2 em sua superfície e foi comprada no Banco de Células do Rio de Janeiro em outubro de 2000. É mantida criopreservada em nitrogênio líquido (-196°C) no Departamento de Bioquímica, UERJ. Após o descongelamento, as células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Vitrocell, Brasil) em estufa incubadora com 5% CO₂ em atmosfera úmida (COM-17AC, Sanyo, EUA), a 37°C, sendo as passagens realizadas a cada 48 h.

3.6. Dosagem de nitrito em células RAW 264.7

O potencial anti-inflamatório *in vitro* de Ppg-01 foi avaliado através de sua capacidade de redução da produção de nitrito, produto mais estável do óxido nítrico (NO), que é um importante mediador inflamatório. A dosagem do nitrito foi realizada pela reação de Griess (Green *et al.*, 1982) no sobrenadante de cultura de macrófagos RAW 264.7 ativados com lipopolissacarídeo de membrana de bactérias gram-negativas (LPS; Sigma-Aldrich, EUA), cultivados ou não na presença das amostras.

Nesta reação, o nitrito reage com o ácido sulfanílico (Sigma), em condições ácidas, formando um cátion diazônico em uma reação no escuro. Este cátion, por sua vez, reage com o dihidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina (Sigma) formando um composto de coloração violeta (Tsikas, 2007).

As células foram contadas em câmara de Neubauer (Boeco, Alemanha) e transferidas para placas de cultura de células de 96 poços (50 μL /poço, contendo 5×10^4 células), fundo plano e com tampa (Falcon, Becton Dickinson Labware, EUA), e mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO_2 e 95% de umidade por 24 h para que as células pudessem aderir antes da realização dos ensaios (5×10^4 /poço). Após a adesão por 24 h, adicionou-se às culturas LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para estimulação, e diferentes concentrações das amostras (volume final 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$), e incubou-se as placas novamente por 24 h a 37°C, 5% de CO_2 e 95% de umidade. Após a incubação, 50 μL do sobrenadante de cada poço foram retirados e transferidos para outra microplaca de 96 poços, onde foram adicionados 25 μL de ácido sulfanílico (Sigma-Aldrich, EUA) 10 mg/mL . A reação ocorreu durante 10 min ao abrigo de luz e após esse período, foram adicionados 25 μL de dihidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina (Sigma-Aldrich, EUA) 1 mg/mL . Após mais 10 min de incubação, a placa foi lida em espectrofotômetro de microplacas a 550 nm (μQuant , Bio-Tek Instruments Inc., EUA).

A curva padrão foi construída utilizando uma solução de nitrito de sódio (0,78 μM – 100 μM). Os resultados foram calculados a partir do coeficiente de extinção específico obtido na curva padrão e expressos em concentração de nitrito (μM).

3.7. Ensaio de citotoxicidade por redução de sal de tetrazólio

A citotoxicidade das amostras foi avaliada através do teste de redução do sal tetrazólico: brometo de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil 2H-tetrazólio (MTT; Sigma-Aldrich, EUA) a cristais de formazana, por desidrogenases mitocondriais, sendo esta redução um marcador de viabilidade celular (Mosmamm, 1983).

As células RAW 264.7 foram contadas em câmara de Neubauer e transferidas para placas de 96 poços (50 µL/poço, contendo 5×10^4 células) e mantidas a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade por 24 h para que as células pudessem aderir antes da realização dos ensaios. Após esse período, as amostras foram adicionadas aos poços na presença ou ausência de estímulo com LPS (1 µg/mL) e as placas foram incubadas por 24 h (volume final 100 µL/poço), nas mesmas condições do ensaio de produção de nitrito. Em seguida, aplicou-se 10 µL/poço de MTT 5 mg/mL em tampão fosfato de sódio 0,01 M, 0,9% NaCl pH 7,4 (PBS). Após 2 h de incubação, foram adicionados 100 µL de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS; Sigma-Aldrich, EUA) em HCl 0,01N para a dissolução dos cristais de formazan formados.

No dia seguinte, as placas foram lidas em leitor de microplacas no comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos como percentual da atividade redutora mitocondrial (ARM), em relação ao controle, cuja absorvância foi considerada como 100%.

3.8. Ensaio de migração através de inserto (*transwell*)

Este ensaio consiste em uma primeira etapa de tratamento das células com as amostras e uma segunda etapa de migração celular através do inserto de *transwell*, com membranas de policarbonato de porosidade de 8 µm (Becton Dickinson & Company, EUA), sendo realizado segundo descrito por Zigmond e Hirsch (1973.)

As células RAW 264.7 foram cultivadas em microplacas de 24 poços (5×10^5 células/500 µL/poço) em meio DMEM 10% SFB e as placas foram mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade por 24 h para que as células confluíssem. Após esse período de incubação, adicionou-se 0,07% dimetil sulfóxido (DMSO) em DMEM 10% SFB ao controle negativo, indometacina 1 µg/mL em DMEM 10% SFB ao controle positivo, ou Ppg-01 10 µg/mL, todos num volume padronizado de 250 µL. Além disso, o controle

negativo recebeu 250 μL de DMEM 10% SFB, enquanto os outros pontos receberam LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), em igual volume. As placas foram novamente incubadas por 24 h. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e os poços foram lavados com PBS. Em seguida, foram adicionados a cada poço 500 μL de meio DMEM 2% SFB e as células foram soltas com auxílio de um raspador de células (*cell scraper*, Corning). As suspensões celulares foram transferidas para microtubos do tipo Eppendorf e mantidas no gelo para contagem em câmara de Neubauer.

Em uma nova placa, insertos de *transwell* foram aplicados, com auxílio de uma pinça, em cada poço contendo 500 μL de meio DMEM suplementado com 10% SFB. As células previamente tratadas foram então suspensas em DMEM sem soro e transferidas para o interior dos insertos (2 x 10⁴ células/200 μL). A placa foi incubada por 3 h em estufa a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade. Posteriormente, os insertos foram lavados com PBS e as células que migraram através do gradiente de SFB foram fixadas com paraformaldeído 2% por 2 min e em seguida, lavadas com PBS. As células foram fixadas com metanol por 20 min, lavadas com PBS, e coradas com panótico rápido, segundo o protocolo: 30 s no panótico I, 30 s no panótico II, 2 min no panótico III, e lavagem com PBS para retirar o excesso de corante. Finalmente, as imagens dos insertos foram visualizadas por microscopia de luz (modelo CKX41, Olympus, Japão) em aumento de 10x e fotografadas (IX2-SLP Olympus, Japão) para posterior contagem das células que migraram. Os resultados estão expressos em percentual de migração, tomando a migração estimulada com LPS como 100%.

3.9. Animais

Foram utilizados nos experimentos *in vivo* camundongos machos da linhagem Swiss Webster (SW) e da linhagem DBA/1J de 20 g a 30 g criados no biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas, em temperatura controlada (24°C), com ciclo de luminosidade de 12 h sendo alimentados com água e ração *ad libitum*. A higienização e desinfecção das caixas foram realizadas em dias alternados, com hipoclorito de sódio, sendo utilizada maravalha de pinho branco estéril ou sabugo de milho triturado para a forração.

Os experimentos foram realizados seguindo os padrões éticos para o uso de animais de experimentação e aprovados pelo Comitê de Ética do IBRAG-UERJ – Protocolos CEUA/007/2013, CEUA/011/2018 e CEUA/012/2018.

3.10. Edema de pata induzido por carragenina

Este modelo, descrito por Winter e colaboradores (1962), consiste na indução de resposta inflamatória aguda localizada, por injeção do agente flogístico de carragenina na pata, resultando na formação do edema. Camundongos SW machos (25-30 g) foram distribuídos em cinco grupos (cinco animais/grupo) e a pata esquerda de cada animal teve seu volume mensurado (tempo 0 h) em pletismômetro (Insight, Brasil). Este equipamento considera o volume de solução (Tween 20 a 0,04% em água destilada) deslocado após a imersão da pata no recipiente como sendo o volume da pata do animal.

Após a medição do volume no tempo 0 h, os animais foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) com 100 µL de Ppg-01 (0,002, 0,02 ou 0,2 mg/kg), indometacina (10 mg/kg) ou DMSO 1% em salina 0,9% (controle negativo). Uma hora após o tratamento, administraram-se 50 µL de carragenina (6 mg/mL) (Sigma Aldrich, EUA) por injeção intraplantar na pata esquerda. A partir daí, os animais tiveram o volume das patas medido de hora em hora, nas quatro horas seguintes. O resultado foi expresso em índice de edema, que representa o percentual de aumento do volume da pata no tempo analisado (x), comparado ao tempo 0 (índice de edema_x = [(V_x - V₀) / V₀] x 100).

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e suas patas foram retiradas para posterior processamento e análise histológica.

3.10.1. Processamento histológico

As patas foram removidas ao final dos experimentos de edema de pata induzido por carragenina e fixadas por sete dias em formaldeído 10% tamponado (tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,4). Após esse período, o material foi lavado em água corrente durante 30 min e descalcificado em solução de ácido nítrico 10% até que perdesse a rigidez. Em seguida, as

patas foram lavadas durante 30 min, seccionadas ao meio (corte sagital) e submetidas à desidratação em concentrações crescentes de etanol (70%, 90% e 100%) em banhos de 1 h de duração cada. Um novo banho em etanol 100% foi feito durante 1 h e em seguida, as patas foram clarificadas em xilol por 30 min. Para inclusão das peças, as patas foram colocadas em cassetes e submetidas a dois banhos de parafina de 1 h cada. Posteriormente, as peças foram imersas em blocos de parafina e resfriadas. Os blocos foram cortados em um micrótomo rotativo (modelo RM2125RT, LEICA Microsystems, Alemanha), com cortes histológicos de 5 µm de espessura e foram dispostos em lâminas de vidro, que foram colocadas em estufa a 60°C por 1 h para derreter a parafina.

Para a coloração, as lâminas foram submersas em três banhos de xilol (1 min/banho). Em seguida, foram hidratadas com concentrações decrescentes de etanol (100%, 90% e 70%) por aproximadamente 1 min a cada banho e lavadas com água destilada por 1 min. Posteriormente, as lâminas foram submetidas a banho de hematoxilina durante 5 min, e lavadas em água corrente durante 2 min. Para a coloração citoplasmática, as lâminas foram colocadas em banho com eosina, durante 6 min e depois lavadas com água destilada por 1 min. Em seguida, foram submetidas à desidratação em etanol 70%, 90% e 100%, sequencialmente, seguido de três banhos em xilol com duração de 1 min cada. Finalmente, as lâminas foram montadas, secas e analisadas por microscopia de campo claro (microscópio modelo BX51WI com sistema de captura TX72, Olympus, Brasil). As fotomicrografias foram avaliadas de forma qualitativa quanto aos parâmetros: infiltrado inflamatório e espessamento da derme. Os procedimentos para análise histológica foram realizados segundo Gartner e Hiatt (2003).

3.11. Artrite induzida por colágeno tipo II (CIA)

A avaliação do efeito antiartrítico foi realizada através do modelo de artrite induzida por colágeno do tipo II, desenvolvido segundo Wooley e colaboradores (1981) e previamente adaptada no laboratório (Sabino *et al.*, 1999).

Camundongos DBA/1J machos (20-30 g), divididos em grupos de sete animais/grupo, foram imunizados com uma injeção intradérmica (i.d.) de colágeno tipo II (CII) purificado de cartilagem de galináceo. Foram injetados no dorso 100 µL de CII a 2 mg/mL emulsificado em adjuvante completo de Freund (AFC, Thermo Fisher Scientific). Vinte e um dias após, os

animais receberam uma injeção reforço, por via intraperitoneal (i.p.) de 100 µL CII 4 mg/mL diluído em ácido acético 0,05 M. Neste dia, iniciou-se o tratamento diário por via oral (100 µL) com o veículo (DMSO 1% em salina fisiológica), controle positivo (metotrexato 2 mg/kg, MTX) ou Ppg-01 (0,02 e 0,2 mg/kg), utilizando sonda orogástrica metálica (IC800, Insight, Brasil).

Os animais foram pesados três vezes por semana e o desenvolvimento da artrite foi avaliado através da análise por pletismografia, a fim de mensurar o volume da pata, que é apresentado como índice de artrite (IA) e representa o percentual de aumento do volume da pata mais edemaciada no tempo X, comparado ao tempo 0, calculado como para o índice de edema (item 3.10).

As alterações macroscópicas das quatro patas foram avaliadas através de escore clínico, sendo: 0 – pata normal; 1 – edema e/ou eritema detectável e/ou limitado aos dígitos; 2 – vermelhidão e edema moderado no tornozelo ou em outra junta; 3 – edema severo com vermelhidão e edema desde o tornozelo; 4 – edema máximo com envolvimento de múltiplas juntas e/ou deformações (anquiloses) e com perda de função (adaptado de Suszko *et al.*, 2013). O resultado foi expresso pela soma dos escores das quatro patas.

O pico da artrite no grupo controle determinou o fim do experimento. Ao término, os animais foram eutanasiados, exsanguinados e órgãos foram coletados para análises posteriores.

3.11.1. Análise radiológica das patas traseiras dos animais com CIA

Visando avaliar possíveis alterações ósseas foi realizada a avaliação radiológica *ex vivo* das patas traseiras de animais representativos de cada grupo experimental. Para isto, foi utilizado o aparelho de Raios-X em Spectro 70X Eletronic coluna móvel, com potência de 70 kV e amperagem 8 mA. As imagens das patas foram capturadas a uma distância de exposição de 8 cm, com tempo de exposição 0,3 s, utilizando um sensor digital de microimagem FIT t2. As imagens foram adquiridas pelo Software Dental Master DICOM do consultório do Dr. Wilson Rosalém Júnior e as alterações ósseas foram avaliadas qualitativamente.

3.11.2. Processamento histológico das patas de animais com CIA

Os procedimentos de fixação, descalcificação, desidratação, clarificação, inclusão dos blocos em parafina, bem como o preparo das lâminas foram realizados de acordo com protocolo descrito em 2.10.1. O procedimento de coloração foi realizado em colaboração com o Professor Dr. Jorge de Carvalho, do Laboratório de Ultraestrutura e Biologia Tecidual (LUBT) do Departamento de Histologia e Embriologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Para visualização dos aspectos morfológicos e a infiltração de células inflamatórias no tecido sinovial foi utilizada coloração histológica de rotina hematoxilina-eosina. O resultado apresenta núcleo celular corado de roxo e a matriz cartilaginosa apresenta coloração rosada (Schmitz *et al.*, 2010).

As lâminas desparafinizadas foram submetidas a três banhos de xilol de 3 min cada. Em seguida, foram hidratadas em três banhos de etanol (100%, 90% e 70%), seguido de um banho de 30 s em água destilada. Posteriormente foram submetidas a um banho de hematoxilina de Harris (4 min), seguido de lavagem em água corrente. Em seguida, foram coradas com eosina Y (4 min), e novamente lavadas. Finalmente, as lâminas foram desidratadas em etanol (70%, 90% e 100%), clarificadas em xilol, montadas e secas para visualização e captura de imagens em microscópio de campo claro (modelo CBA, Olympus, Japão). As fotomicrografias foram avaliadas de forma qualitativa quanto aos parâmetros: hiperplasia sinovial, presença de *pannus*, comprometimento articular e erosão óssea.

3.11.3. Coleta e contagem de células do lavado medular

Com auxílio de tesoura e pinça, o fêmur da pata menos edemaciada foi exposto e removido. A região interna do osso foi lavada com um 1 mL de PBS contendo 5% de SFB gelado. O lavado foi, em seguida, centrifugado (400 x g/3 min) e o sedimento celular suspenso em 1 mL de meio DMEM contendo 10% de SFB. As células foram contadas em câmara de Neubauer por microscopia de contraste de fase (modelo CKX41, Olympus, Japão).

3.11.4. Processamento e contagem das células do baço e linfonodos

As células do baço e dos linfonodos inguinal e poplíteo foram dispersas, manualmente, em 15 mL ou 2 mL de meio de cultura estabelecido pelo *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) diluído com PBS (1:2 v/v) contendo 5% SFB, respectivamente, com auxílio de um bastão de borracha estéril e uma rede cilíndrica de aço. A suspensão celular foi centrifugada (400 x g/5 min), em seguida o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular suspenso no mesmo meio (10 mL para baço e 2 mL para linfonodo). As células totais viáveis foram contadas em câmara de Neubauer por microscopia de contraste de fase (modelo CKX41, Olympus, Japão).

3.11.5. Fenotipagem das subpopulações de linfócitos do baço e linfonodos

Para a fenotipagem das populações de linfócitos, as células ($0,5$ a $1,5 \times 10^6$ /poço) foram incubadas no escuro por 30 min em banho de gelo com anticorpos da BD Pharmigen (EUA): anti-CD4 conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-CD8 conjugado a R-ficoeritrina (PE), anti-CD19 conjugado alofococianina (APC) e anti-CD69 conjugado a APC e cianina-7(Cy7), para marcação quádrupla ($0,75 \mu\text{g}$ de cada anticorpo/marcação). Em seguida, as células foram lavadas com $500 \mu\text{L}$ de PBS ($400 \times \text{g}/5 \text{ min}$) e suspensas em $400 \mu\text{L}$ de paraformaldeído 2%. A análise (50.000 eventos) foi realizada em citômetro de fluxo (Gallios, Beckman Coulter, Biosciences, EUA; modelo Facs calibur Becton, Dickinson & Company, EUA) e as fluorescências da FITC, da PE, do APC e do APC-Cy7 foram detectadas nos canais FL-1 ($530 \pm 15 \text{ nm}$), FL2 (banda $585 \pm 15 \text{ nm}$) e FL6 ($650 \pm 15 \text{ nm}$) e FL-8 ($750 \pm 15 \text{ nm}$), respectivamente. Debris celulares foram retirados das análises demarcando-se uma região no citograma FSC x SSC contendo as células a serem analisadas. Os percentuais das subpopulações de células TCD4⁺ e TCD8⁺ foram obtidos a partir de citogramas do tipo FL1 x FL2 e a subpopulação CD19⁺ em citogramas FSC x FL-6. Para obter os percentuais de células TCD4⁺, TCD8⁺ e CD19⁺ ativadas (CD69⁺), tais subpopulações foram analisadas no canal do CD69⁺ (FL-8). Para as análises por citometria de fluxo foi utilizado o software FlowJo LCC, Data analysis, v10. Os resultados estão expressos em número absoluto de cada subpopulação, calculado multiplicando-se o número total de células do linfonodo inguinal ou

do baço de cada animal pelos percentuais obtidos de cada subpopulação, a partir da análise citofluorimétrica.

3.11.6. Contagem de células do sangue

O sangue da artéria carótida foi coletado dos camundongos. Gotas do sangue foram utilizadas para montagem de esfregaço, que foram corados com corante panótico e as lâminas analisadas por microscopia de campo claro (modelo CBA, Olympus, Brasil) para a realização da contagem de segmentados, monócitos e linfócitos.

O restante do sangue foi colhido em EDTA 0,2% (ácido etilenodiamino tetra-acético) e as hemácias foram lisadas com líquido diluente de Turk (solução aquosa de 3% ácido acético glacial, 0,01% violeta de genciana), que foi utilizado para contagem dos leucócitos totais.

3.12. **Análise estatística**

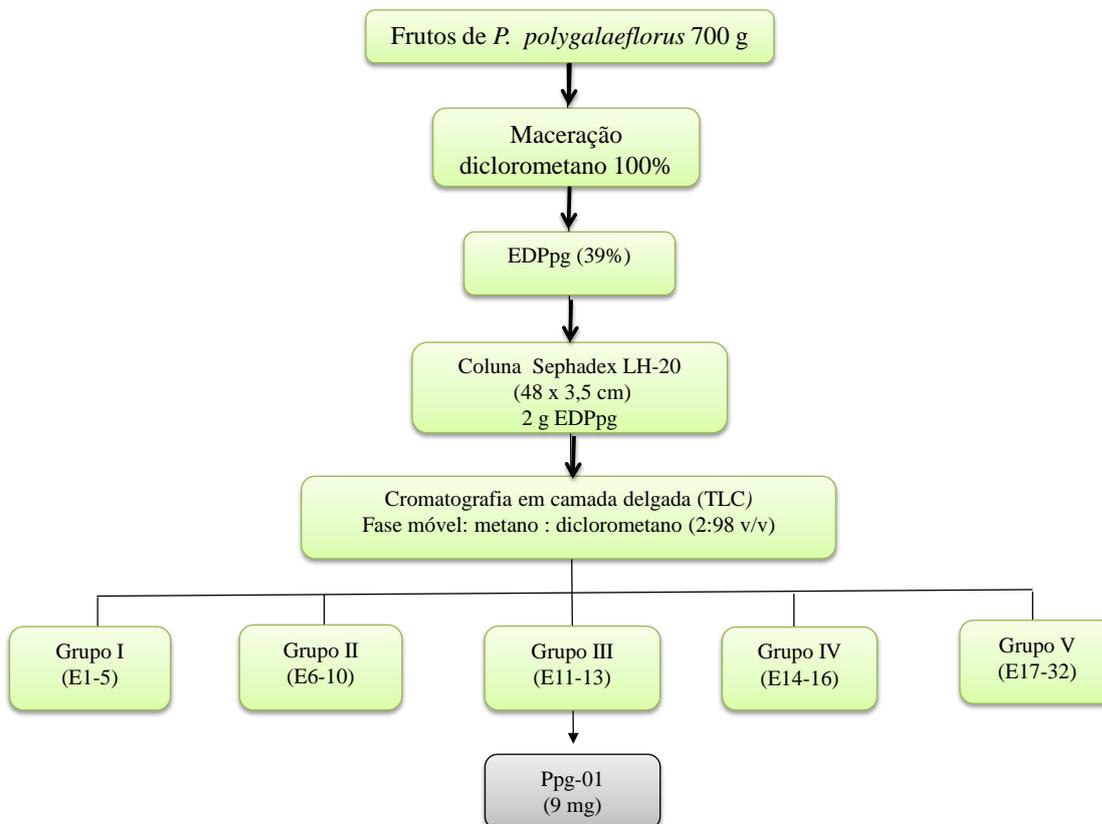
Análises descritivas das variáveis foram realizadas (média e desvio padrão). A variância dos dados foi analisada pelo teste One-way ANOVA, e a significância da diferença entre os grupos foi avaliada pelos pós-testes Dunnett ou Tukey. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$ (Dawson-Saunders e Trapp, 1994), e utilizados os programas Microsoft® Office Excel e GraphPad Prism® 5 ou 6 for Windows, para análise dos dados.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e caracterização fitoquímica do Ppg-01 (6 α ,7 β -diidroxivouacapano-17 β -oato de metila)

A maceração dos frutos de *P. polygalaeflorus* em solvente diclorometano durante 15 dias resultou no extrato diclorometano (EDPpg) que apresentou rendimento de 39%. O fracionamento deste extrato em coluna de gel-filtração, seguida de reunião dos eluatos (E) por semelhança de bandas cromatográficas em HPTC, resultou no isolamento de Ppg-01, como pode ser observado na Figura 7.

Figura 7 - Fluxograma do isolamento de Ppg-01 a partir do EDPpg



Fonte: A autora, 2019.

A análise do EDPpg por GC-MS (Figura 8A) revelou a presença de picos distintos distribuídos ao longo da corrida, predominantes entre os tempos de retenção (T_R) de 27 min e 41 min e entre 70 min e 81 min. O fracionamento deste extrato em coluna Sephadex LH-20, seguido da reunião de eluatos de perfis de banda semelhantes por HPTLC resultou no isolamento de Ppg-01, que apresentou rendimento de 0,45%.

Ppg-01 foi caracterizado por GC-MS (Figura 8B), por ressonância magnética nuclear (NMR) de ^1H e ^{13}C (dados não mostrados), e por comparação com dados da literatura (Fascio *et al.*, 1976; Arriaga *et al.*, 2000; Spindola *et al.*, 2009), sendo identificado como o diterpeno furânico $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan-17 β -oato de metila. No cromatograma (Figura 8B) observa-se a presença de um único pico de intensidade, sugerindo tratar-se de um composto com alto percentual de pureza.

A análise comparativa da distribuição de bandas do extrato bruto EDPpg e de Ppg-01 em placa de HPTLC com revelação para terpenoides ratifica a eficiência do processo do fracionamento e isolamento. Na Figura 9 pode-se observar a presença de diversas bandas de menor intensidade localizadas ao longo da corrida cromatográfica do EDPpg, enquanto para Ppg-01 apenas uma única banda de maior intensidade (mais concentrada) pode ser observada.

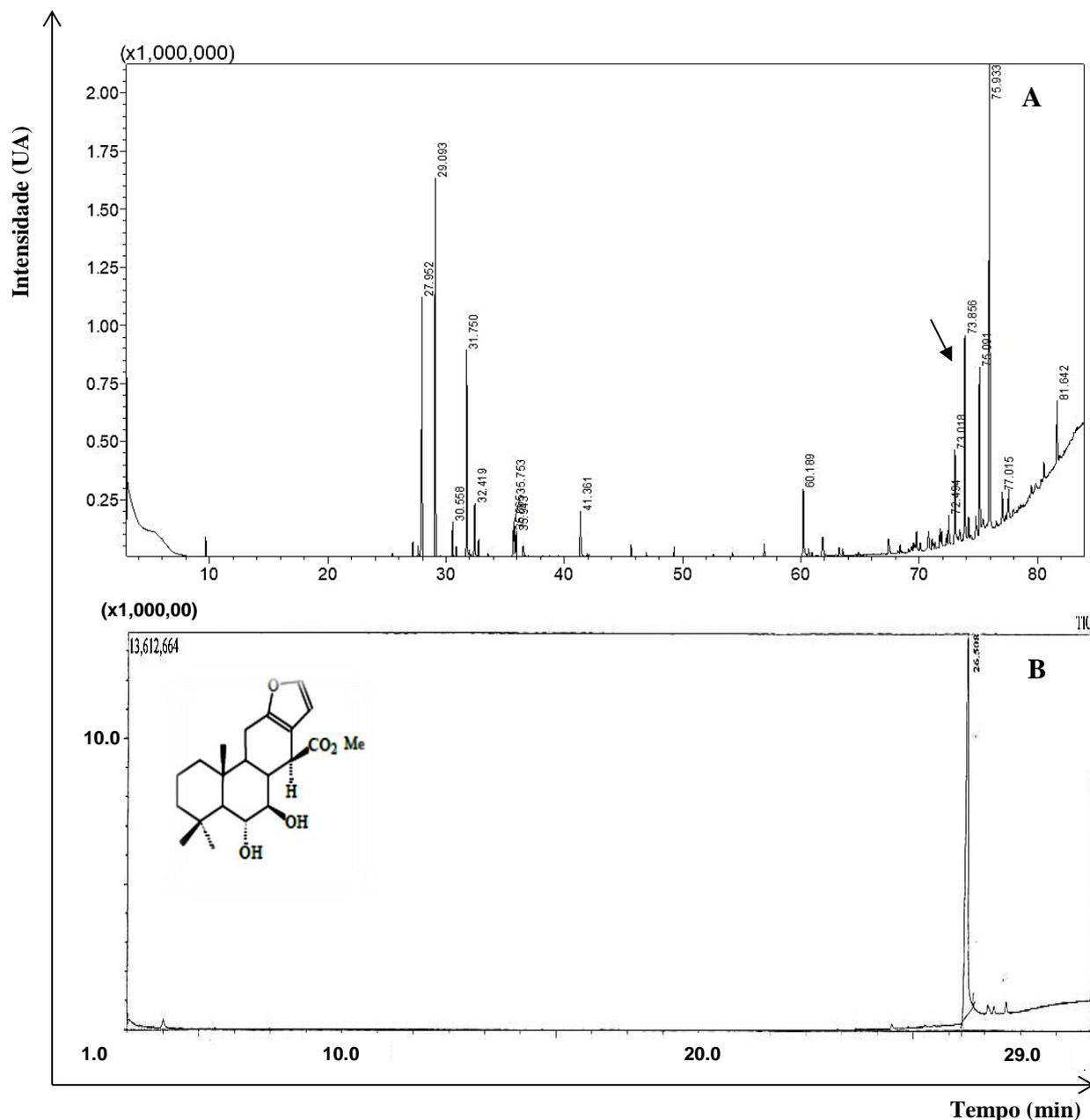
4.2. Análise da atividade do diterpeno Ppg-01 sobre a citotoxicidade e a produção de óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7

Visando iniciar os estudos da atividade biológica deste diterpeno, foram realizados ensaios com células RAW 264.7 estimuladas com LPS, para avaliar sua citotoxicidade e seu efeito sobre a produção de nitrito, um intermediário estável do óxido nítrico (NO) (Figura 10).

A Figura 10A apresenta o potencial citotóxico de Ppg-01 sobre as células. A incubação com a amostra levou à redução da atividade redutora mitocondrial (ARM) a partir da concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, com inibições de 9,2%, 10,5%, 19,4% e 39,5%, para as concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. No entanto, a concentração capaz de reduzir 50% da ARM (IC_{50}) foi de 85,3 $\mu\text{g/mL}$.

Uma vez que a produção exacerbada de NO e seu metabólitos está relacionada a diversos distúrbios inflamatórios, a mensuração dos níveis de nitrito pela reação de Griess representa uma alternativa rápida para rastreamento de atividade anti-inflamatória *in vitro* (Dirsch *et al.*, 1998).

Figura 8 - Análise do EDPpg (A) e Ppg-01 (B) por GC-MS



Legenda: A seta em (A) com $T_R = 73.018$ min representa o composto $6\alpha, 7\beta$ -diidroxivouacapan-17 β -oato de metila (Ppg-01), cuja estrutura química está apresentada em (B). A cromatografia por fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas foi realizada em coluna capilar Rester RTX – 5 MS (30 m x 0,5 mm d.i. e 0,25 μ m d.f.), empregando hélio como gás de arraste. Foram aplicados 2 μ L de amostra a 1 mg/mL. O programa de temperatura para o EDPpg foi: injetor 260°C, detector 290°C, coluna aquecida de 50°C até 290°C (3°C/min), no modo Split por impacto eletrônico e o fluxo foi de 1,58 mL/min. Para o Ppg-01 a coluna foi aquecida de 100°C até 300°C (7°C/min), permanecendo por 4 min a 300°C e o fluxo foi de 1,5 mL/min. A análise foi processada no modo de impacto de elétrons com uma energia de ionização de 84 kV. O composto Ppg-01 com T_R 26.508 min (B) foi caracterizado por NMR de 1H e ^{13}C (dados não mostrados) e por comparação com dados da literatura (Fascio *et al.*, 1976; Duarte, 1992; Arriaga *et al.*, 2000; Spindola *et al.*, 2009).

Fonte: A autora, 2019.

Figura 9 - Análise do EDPpg e Ppg-01 por cromatografia em camada delgada de alta performance (HPTLC)

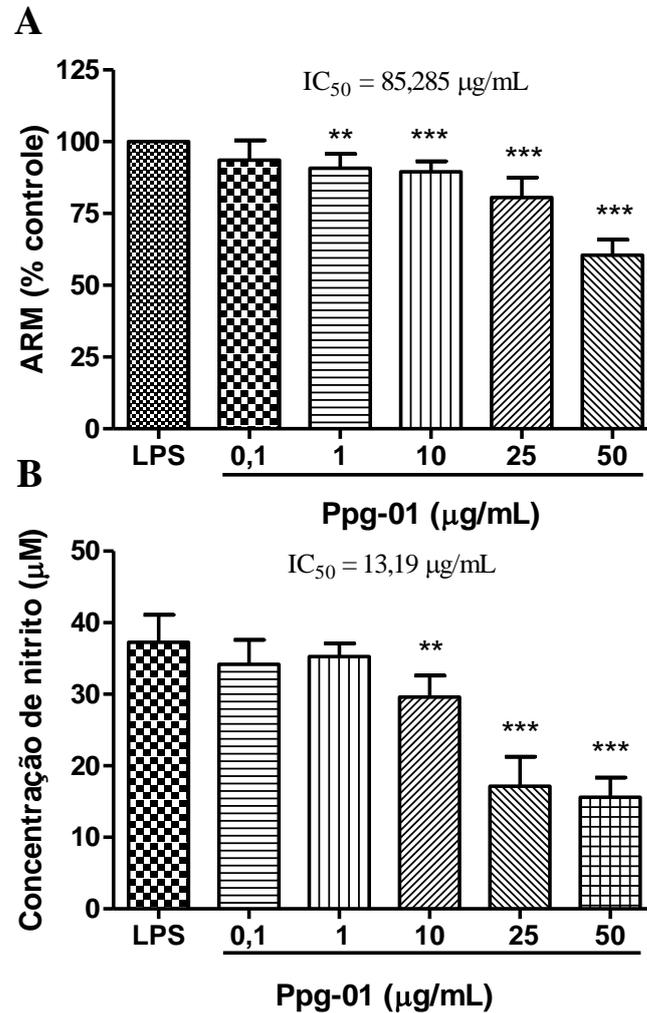


Legenda: A HPTLC foi desenvolvida em placa de sílica gel 60 de alta resolução, utilizando diclorometano: acetato de etila (9:1 v/v) como fase móvel. As placas foram reveladas para terpenoides com o reagente vanilina-sulfúrico (1% vanilina em etanol:10% ácido sulfúrico em etanol 1:1 v/v).

Fonte: A autora, 2019.

A Figura 10B apresenta a concentração de nitrito liberado pelas células RAW 264.7 no sobrenadante das culturas. O estímulo com LPS induziu a produção de 37,29 μM de nitrito pelas células. No entanto, a incubação com Ppg-01 provocou uma redução significativa da produção de nitrito nas concentrações de 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, com percentuais de inibição: 20,6%, 54,0% e 58,2%, respectivamente. Foi determinado um IC_{50} de 13,2 $\mu\text{g/mL}$ para a inibição da produção de nitrito, mostrando baixa relação com a citotoxicidade.

Figura 10 - Efeito do diterpeno Ppg-01 sobre a produção de nitrito e atividade redutora mitocondrial (ARM) de macrófagos da linhagem RAW 264.7



Legenda: A) Viabilidade celular. B) Produção de nitrito. Células RAW 264.7 foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) e incubadas na ausência e presença de diferentes concentrações (0,1 a 50 µg/mL) de Ppg-01 durante 24 h. A concentração de nitrito, expressa em µM, foi avaliada através da reação de Griess. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT e expressa em percentual de atividade redutora mitocondrial (ARM), comparada ao controle (LPS). Os dados representam a média ± DP de três experimentos independentes. **p<0,01, ***p<0,001 em relação ao grupo controle (LPS) (teste One-Way ANOVA seguido de Tukey).

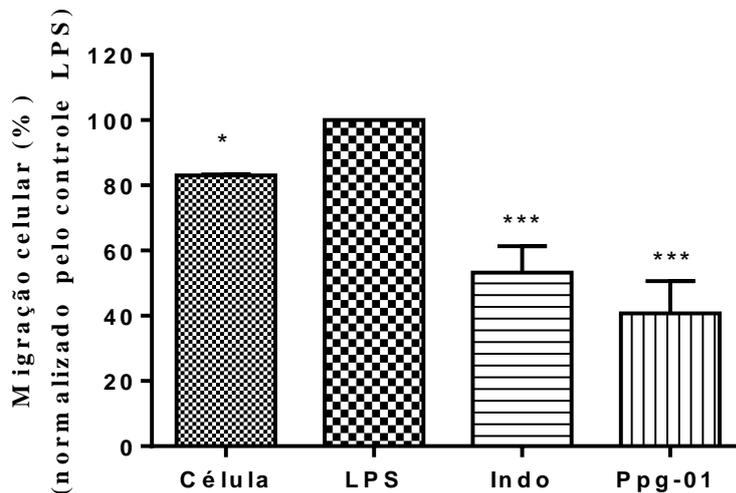
Fonte: A autora, 2019.

4.3. Análise da atividade do diterpeno Ppg-01 sobre migração de macrófagos RAW 264.7 em modelo de *transwell*

Uma vez que a quimiotaxia e a migração celular apresentam função crucial no processo inflamatório, a atividade de Ppg-01 sobre a migração celular de macrófagos foi avaliada *in vitro* no modelo de *transwell*. Neste modelo, células RAW 264.7 foram previamente estimuladas com LPS e tratadas com a Ppg-01, e posteriormente avaliou-se a capacidade de migração destas células, utilizando-se um gradiente quimiotático de soro fetal bovino (Figura 11). As incubações com indometacina (1 µg/mL) e com Ppg-01 (10 µg/mL)

reduziram significativamente o percentual de células na parte inferior dos insertos, indicando percentuais de inibição de migração de 47,7% e 59,8%, respectivamente.

Figura 11 - Efeito da Ppg-01 sobre a migração de macrófagos RAW 264.7 no ensaio de *transwell*



Legenda: As células (5×10^5) foram incubadas na ausência (controle) ou na presença de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), indometacina (Indo) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou LPS e Ppg-01 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 h a 37°C, 5% de CO_2 e 95% de umidade, conforme descrito na metodologia. Os resultados estão expressos em porcentagem de migração, considerando a migração das células incubadas com LPS como 100% de migração. Os dados representam a média \pm DP de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ em relação ao LPS (teste One-Way ANOVA seguido de Dunnett).

Fonte: A autora, 2019.

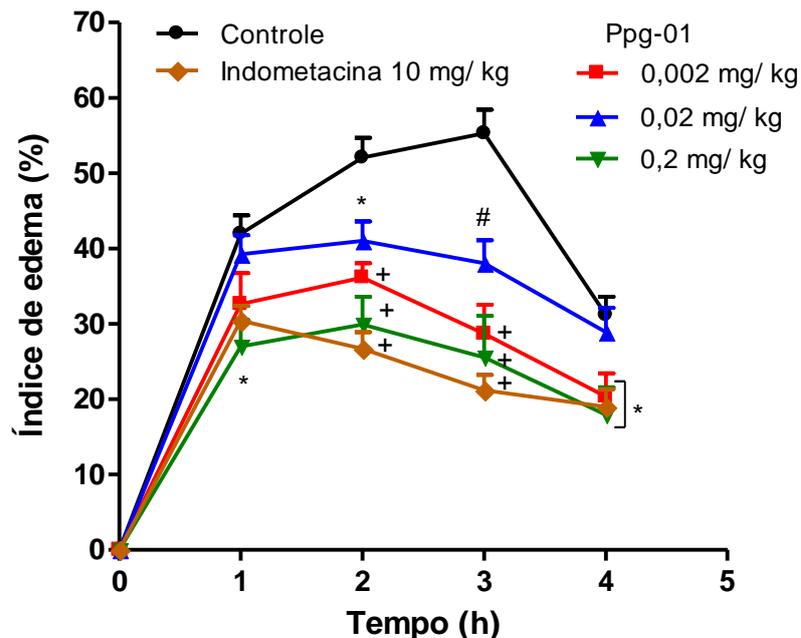
4.4. Estudo do potencial anti-inflamatório *in vivo* de Ppg-01 no modelo de edema de pata induzido por carragenina

Com o intuito de avaliar o efeito anti-inflamatório agudo de Ppg-01 foi utilizado o modelo de edema de pata induzido por carragenina. Neste modelo, o uso da carragenina como agente flogístico resulta em uma resposta inflamatória aguda, com desenvolvimento de edema na pata como resultado do extravasamento de fluidos e proteínas e acúmulo de leucócitos no sítio inflamatório (Posadas *et al.*, 2004).

Como pode ser observado na Figura 12 a injeção de carragenina na pata promoveu um efeito edematogênico no grupo controle, com um pico no índice de edema (55,3%) em 3 h, seguida de posterior remissão. No entanto, o pré-tratamento com indometacina e Ppg-01

(0,002, 0,02 e 0,2 mg/kg) resultou na redução significativa do índice de edema ao longo do tempo, quando comparados ao grupo controle.

Figura 12 - Efeito do diterpeno Ppg-01 sobre o edema de patas induzido por carragenina em camundongos SW machos



Legenda: Os animais foram tratados por via intraperitoneal (100 μ L) com diferentes doses de Ppg-01 e 1 h depois, receberam injeção (s.c.) intraplantar de carragenina (50 μ L a 6 mg/mL). O volume da pata foi medido no tempo zero e nas 4 h subsequentes à injeção de carragenina. O edema da pata foi avaliado por índice de edema (%). Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes n= 6/grupo. *p<0,05, #p<0,01 e +p<0,001 em relação ao grupo controle (teste One-way ANOVA seguido de Tukey).

Fonte: A autora, 2019.

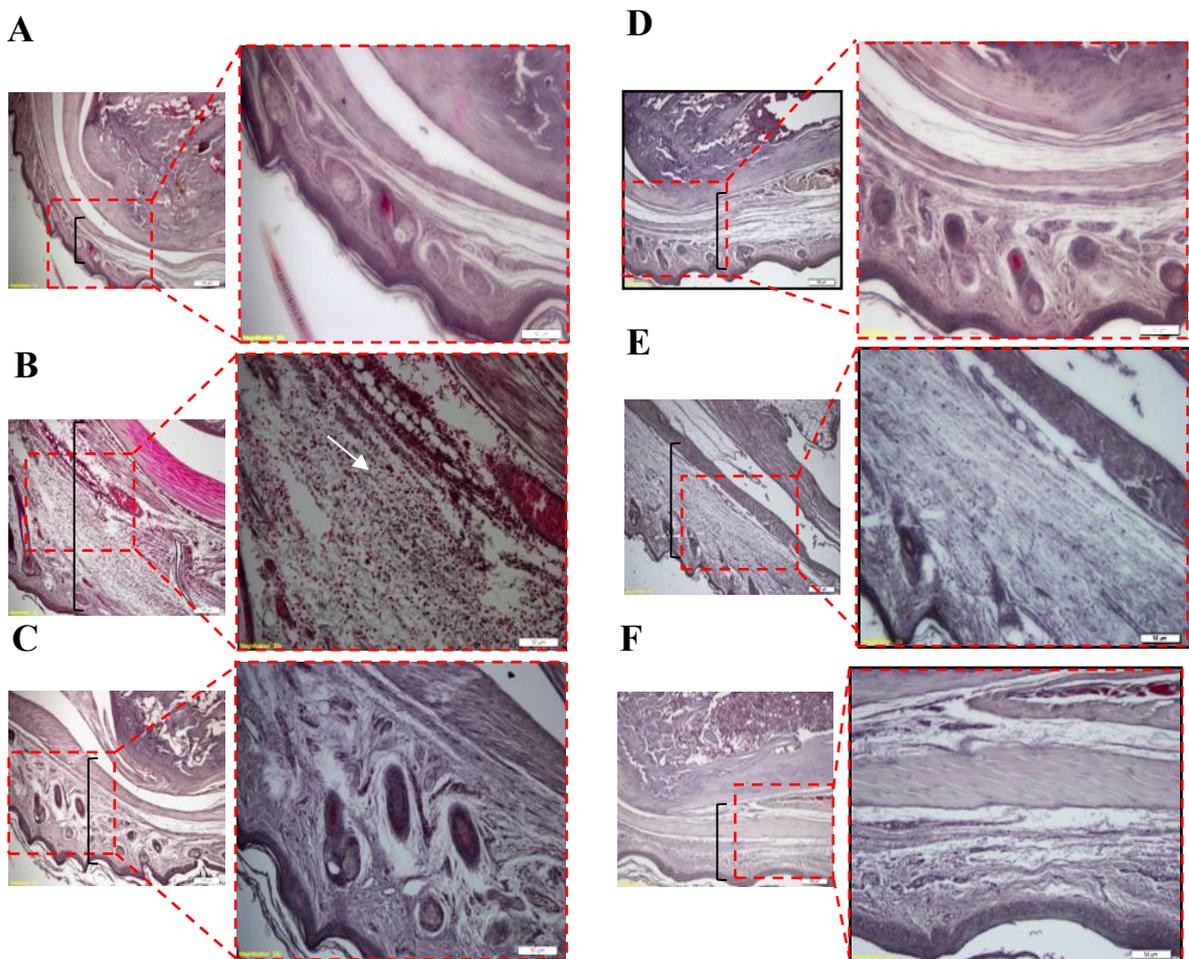
O tratamento com a indometacina promoveu uma inibição do edema a partir da segunda hora de tratamento, apresentando uma inibição de 61,7% no tempo de 3 h (pico de inflamação no controle). O tratamento com a dose 0,002 mg/kg Ppg-01 foi capaz de diminuir o edema a partir de 2 h, com percentual de inibição de 48,1% no pico de 3 h. A dose intermediária (0,02 mg/kg) exibiu inibição significativa em 2 h e 3 h, sendo sua inibição no tempo de 3 h de 31,2%. A maior dose avaliada (0,2 mg/kg) mostrou-se mais efetiva em reduzir significativamente os índices de edema já a partir da primeira hora após a indução, sendo seu percentual de inibição de 53,8% em relação ao grupo controle, no pico da resposta inflamatória.

4.4.1. Análise histopatológica qualitativa das patas no modelo de edema de pata induzido por carragenina

As patas dos animais do modelo de edema de pata induzido por carragenina foram retiradas, submetidas ao processamento histológico, coradas com hematoxilina-eosina e analisadas.

Conforme mostra a Figura 13, a administração de carragenina provocou alterações morfológicas no grupo controle (Figura 13B), em relação ao grupo sadio (Figura 13A). Após 4 h da injeção intraplantar de carragenina, pode-se observar a presença de infiltrado celular, além de espessamento da camada da derme.

Figura 13 - Variações histológicas induzidas pelo tratamento com Ppg-01 na pata de camundongos SW machos com edema induzido por carragenina



Legenda: (A) Animal sadio; (B) CIA controle; (C) Indometacina 10 mg/mL; (D) Ppg-01 0,002 mg/kg; (E) Ppg-01 0,02 mg/kg; (F) Ppg-01 0,2 mg/kg. Imagens representativas de cada grupo. As chaves representam a espessura da camada da derme e a seta o infiltrado celular.

Fonte: A autora, 2019.

O tratamento com a indometacina (10 mg/mL) foi capaz de reduzir os efeitos provocados pela carragenina, com redução de infiltrado celular e do espessamento da derme (Figura 13C). Redução desses parâmetros também pode ser observada nas Figuras 13D, 13E e 13F, com o tratamento com o Ppg-01 nas doses 0,002 mg/kg, 0,02 mg/kg e 0,2 mg/kg, respectivamente.

4.5. Estudo do potencial anti-inflamatório crônico do Ppg-01 no modelo de artrite induzida por colágeno (CIA)

4.5.1. Efeito de Ppg-01 sobre o desenvolvimento e a severidade do CIA

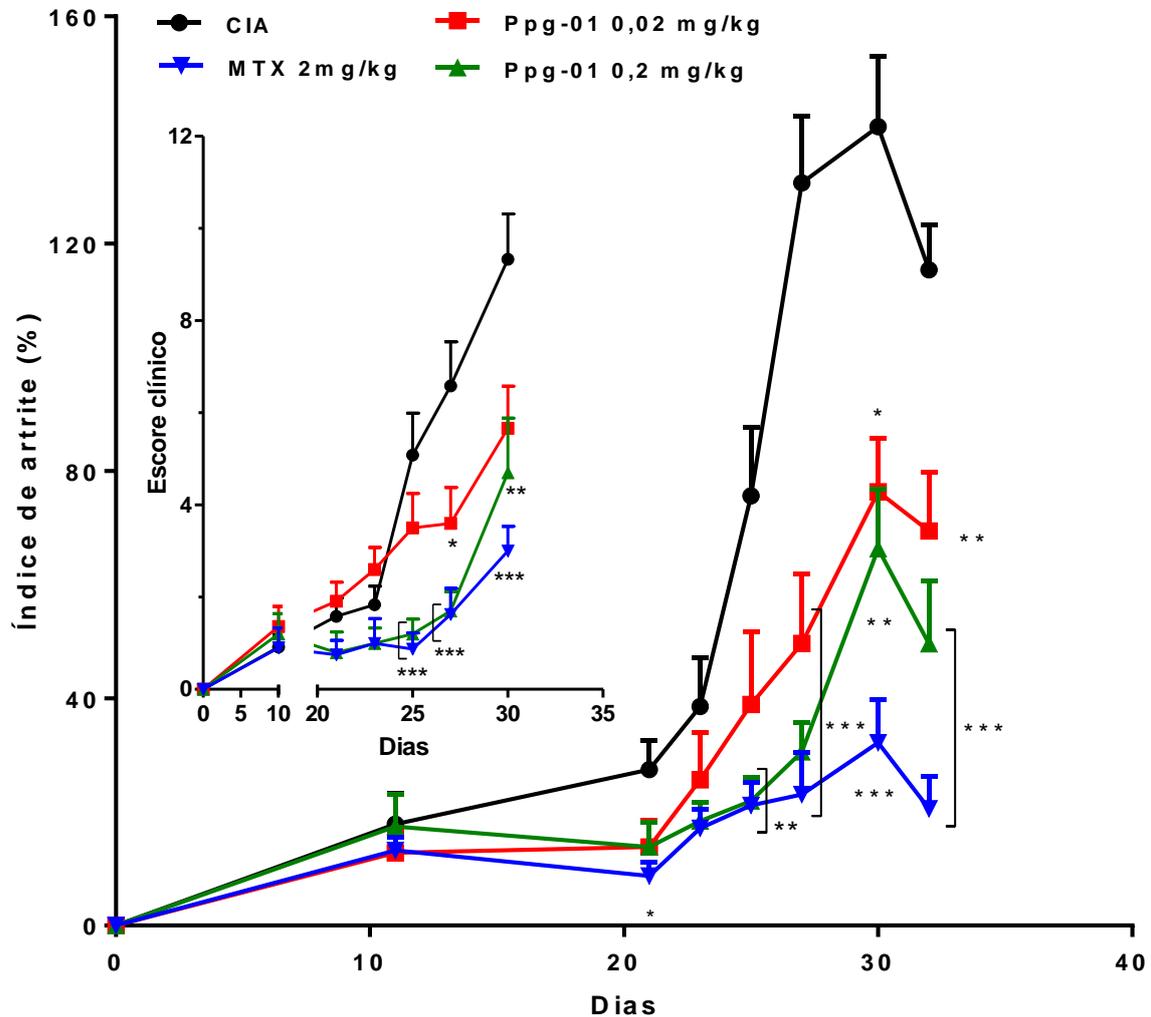
O modelo de CIA é um modelo arquetípico indicado para estudo experimental da artrite reumatoide, induzido por imunização ativa ao colágeno tipo II (CII), sendo escolhido para avaliar a atividade antiartrítica do Ppg-01. A injeção de CII heterólogo em camundongos DBA/1J, que apresentam susceptibilidade genética, resulta em uma poliartrite erosiva que compartilha muitas características com a AR humana (Caplazi *et al.*, 2015).

O desenvolvimento da artrite foi avaliado através da mensuração do volume das patas traseiras (Figura 14) e por escore clínico (inserto Figura 14). Como podemos observar, a imunização com CII promoveu o desenvolvimento da inflamação articular com índice de artrite de 140,1% no 30º dia de experimento (pico da doença).

O tratamento com metotrexato (2 mg/kg) reduziu de maneira significativa o índice de artrite, apresentando um percentual de inibição de 77,1% no pico de artrite. Os tratamentos com Ppg-01 0,02 mg/kg e 0,2 mg/kg também induziram redução significativa no índice de artrite, apresentando percentuais de inibição de 45,7% e 52,8%, respectivamente (Figura 14).

Na avaliação das alterações macroscópicas por escore, os tratamentos com Ppg-01 e MTX mostraram-se efetivos ao induzirem redução dos parâmetros clínicos de vermelhidão, inchaço, anquilose, ou seja, deformação da extremidade óssea, e perda de função (inserto Figura 14).

Figura 14 - Efeito do diterpeno Ppg-01 na progressão da artrite induzida por colágeno II (CIA) em camundongos DBA/1J machos



Legenda: Os animais foram imunizados (i.d.) no tempo zero com colágeno II em AFC (2 mg/mL) e no dia 21 receberam uma dose reforço (i.p) (4 mg/mL). O grupo controle com CIA (tratado com o veículo), Ppg-01 0,02 mg/kg, Ppg-01 0,2 mg/kg e metotrexato (MTX) 2 mg/kg foram tratados diariamente com 100 μ L (v.o.). O índice de artrite e seu grau de severidade (gráfico inserido), que avalia os parâmetros de edema, vermelhidão, deformações e perda de função foram avaliados três vezes por semana. Os resultados (n = 2) são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle CIA (teste One-Way ANOVA seguido de Dunnett).

Fonte: A autora, 2019.

Imagens representativas de patas de camundongos saudáveis (A), com CIA (B), ou com CIA tratados com Ppg-01 0,02 mg/kg (C), ou Ppg-01 0,2 mg/kg (D) ou metotrexato 2 mg/kg (E) estão apresentadas na Figura 15. Camundongos com CIA apresentam edema e vermelhidão da pata e falanges (B-C), com anquilose (C), que não foram observados em camundongos com CIA responsivos ao tratamento com Ppg-01 (D) ou metotrexato (E).

Figura 15 - Avaliação macroscópica de patas de camundongos DBA/1J machos com artrite induzida por colágeno II tratados ou não com o diterpeno Ppg-01, em comparação com animais saudios



Legenda: A) animal sadio; B) animal com CIA (tratado com o veículo); C) animal com CIA tratado com Ppg-01 0,02 mg/kg; D) animal com CIA tratado com Ppg-01 0,2 mg/kg; E) animais com CIA tratados com MTX 2 mg/kg.

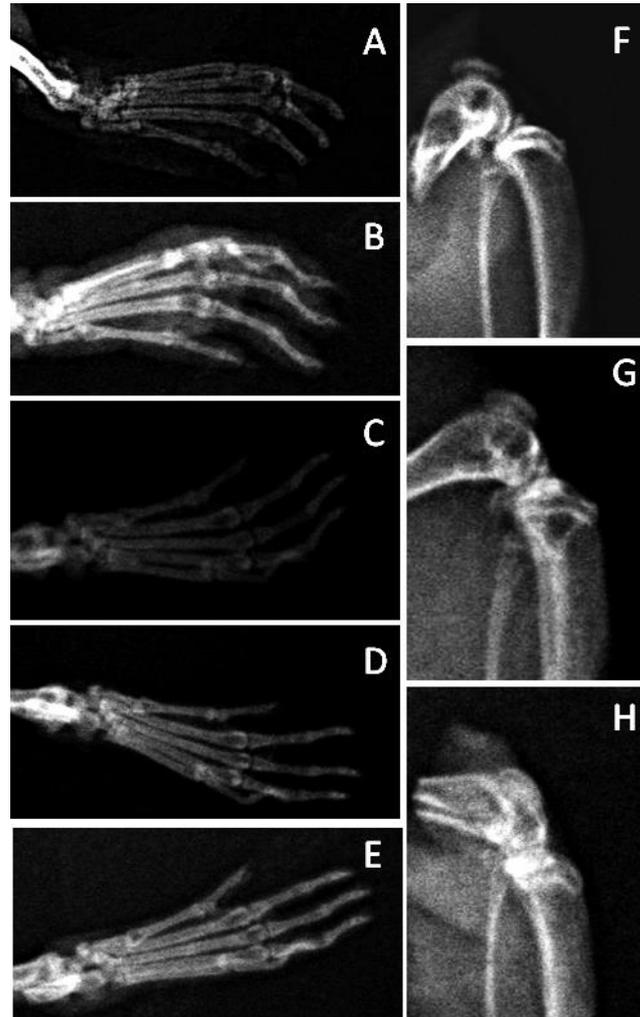
Fonte: A autora, 2019.

4.5.2. Avaliação do efeito do Ppg-01 sobre a integridade óssea dos animais com CIA

A análise *ex vivo* das patas traseiras de camundongos representativos dos diferentes grupos do experimento de CIA está apresentada na Figura 16.

Pode-se observar que a indução da CIA acarretou anquiloses (an) e erosões com elevado metabolismo ósseo (er), além de alterações articulares (aa) (Figuras 16B, 16G), comparado ao animal sadio (Figura 16A, 16F). Estes sinais foram reduzidos nos grupos tratados com Ppg-01 (Figuras 16C, 16D, 16H) e metotrexato (Figura 16E).

Figura 16 - Avaliação radiológica de patas de camundongos DBA/1J machos com artrite induzida por colágeno II tratados ou não com o diterpeno Ppg-01, em comparação com animais sadios



Legenda: Imagens obtidas por radiografia digital. A) e F) animais sadios; B) e G) animais com CIA; C) animais com CIA tratados com Ppg-01 0,02 mg/kg; D) e H) animais com CIA tratados com Ppg-01 0,2 mg/kg; E) animais com CIA tratados com MTX 2 mg/kg.

Fonte: A autora, 2019.

4.5.3. Análise histológica das patas de animais dos diferentes grupos do ensaio de CIA

Visando avaliar os efeitos dos tratamentos sobre os aspectos histológicos nos animais com CIA comparado aos sadios, ao término dos experimentos as patas traseiras dos animais foram retiradas e processadas histologicamente e coradas com hematoxilina-eosina (HE). As articulações femorotibiais e tarsais foram analisadas qualitativamente.

A Figura 17 apresenta micrografias representativas de animais do grupo sadio. Pode-se observar a estrutura articular típica do joelho de camundongo DBA/1J sadio com aumento de 4x (Figura 17A) e 10x (Figura 17B). Nota-se a membrana sinovial constituída por poucos sinoviócitos em espessura (seta preta), e camada subsinovial rica em tecido adiposo e fibroso. A região da articulação tarsal (Figura 17C) e das falanges (Figura 17D) são apresentadas em aumento de 4x e 10x, respectivamente. Em ambas as figuras nota-se espaços articulares claramente identificados, com ausência de sinais de inflamação ou degradação da cartilagem ou óssea.

A injeção de colágeno II nos camundongos induziu artrite, com desenvolvimento de alterações histológicas características do modelo. A Figura 18 apresenta fotomicrografias representativas dos animais do grupo CIA. Cortes histológicos da articulação femorotibial podem ser observados em A e C (4x), e B e D (10x). Hiperplasia da membrana sinovial (setas pretas), massiva infiltração inflamatória (seta branca) e degradação articular e óssea podem ser observados nessas imagens. A região da articulação tarsal é apresentada nas Figuras 18E, 18F e 18G em aumento de 4x, 4x e 10x, respectivamente. Nota-se também a presença de hiperplasia sinovial (seta preta), com massiva infiltração de células inflamatórias (seta branca), estreitamento do espaço articular, comparado ao animal sadio (Figura 17C), e formação de *pannus* invasivo (asterisco), promovendo a degradação da cartilagem e do osso subcondral. A Figura 18H apresenta a região da articulação interfalangeana proximal da pata dianteira acometida de um animal do grupo CIA, com aumento de 10x. Nesta imagem pode ser observada hiperplasia sinovial com massiva infiltração celular, e formação de *pannus* invasivo com degradação articular e óssea.

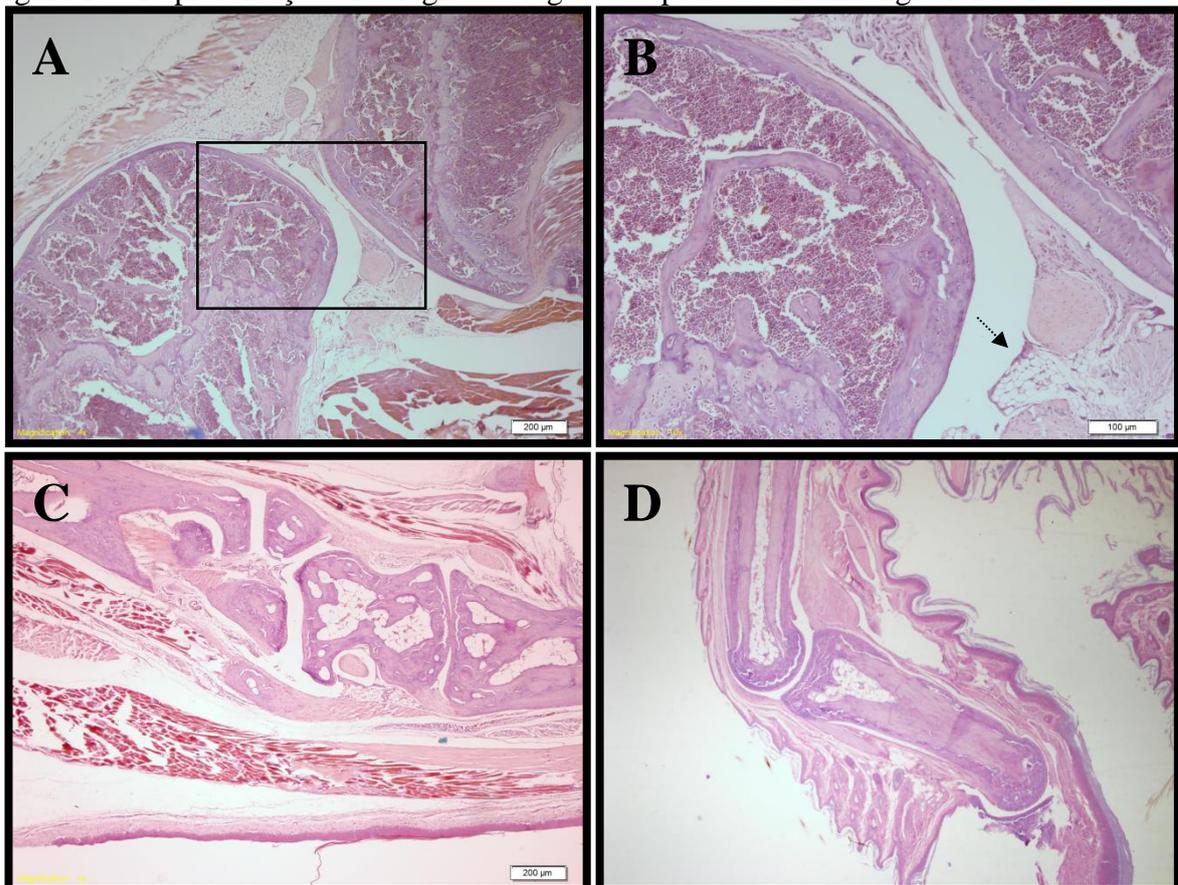
As Figuras 19A (4x) e 19C (10x) apresentam imagens representativas da articulação femorotibial de animais do grupo tratado com a dose 0,02 mg/kg de Ppg-01, enquanto a Figura 19E apresenta a articulação tarsal em aumento de 4x. Nas imagens, nota-se ainda hiperplasia da membrana sinovial (seta preta) e infiltrado inflamatório massivo (seta branca),

porém observa-se menor destruição da articulação e do osso, em comparação ao grupo CIA (Figura 18E e 18F).

O tratamento com a dose 0,2 mg/kg de Ppg-01 produziu redução da hiperplasia sinovial na articulação femorotibial (Figura 19B e 19D). Na articulação tarsal, nota-se infiltrado inflamatório moderado (Figura 19E). Em ambos os casos (Figuras 19B, D, e F) observa-se maior integridade articular e óssea, quando comparados com o grupo CIA (Figuras 18A, 18B e 18F, respectivamente).

O tratamento com a droga padrão MTX produziu redução da hiperplasia sinovial e infiltração celular, assim como o dano articular e ósseo, como pode ser observado nas Figuras 19G e 19H, comparado ao grupo CIA.

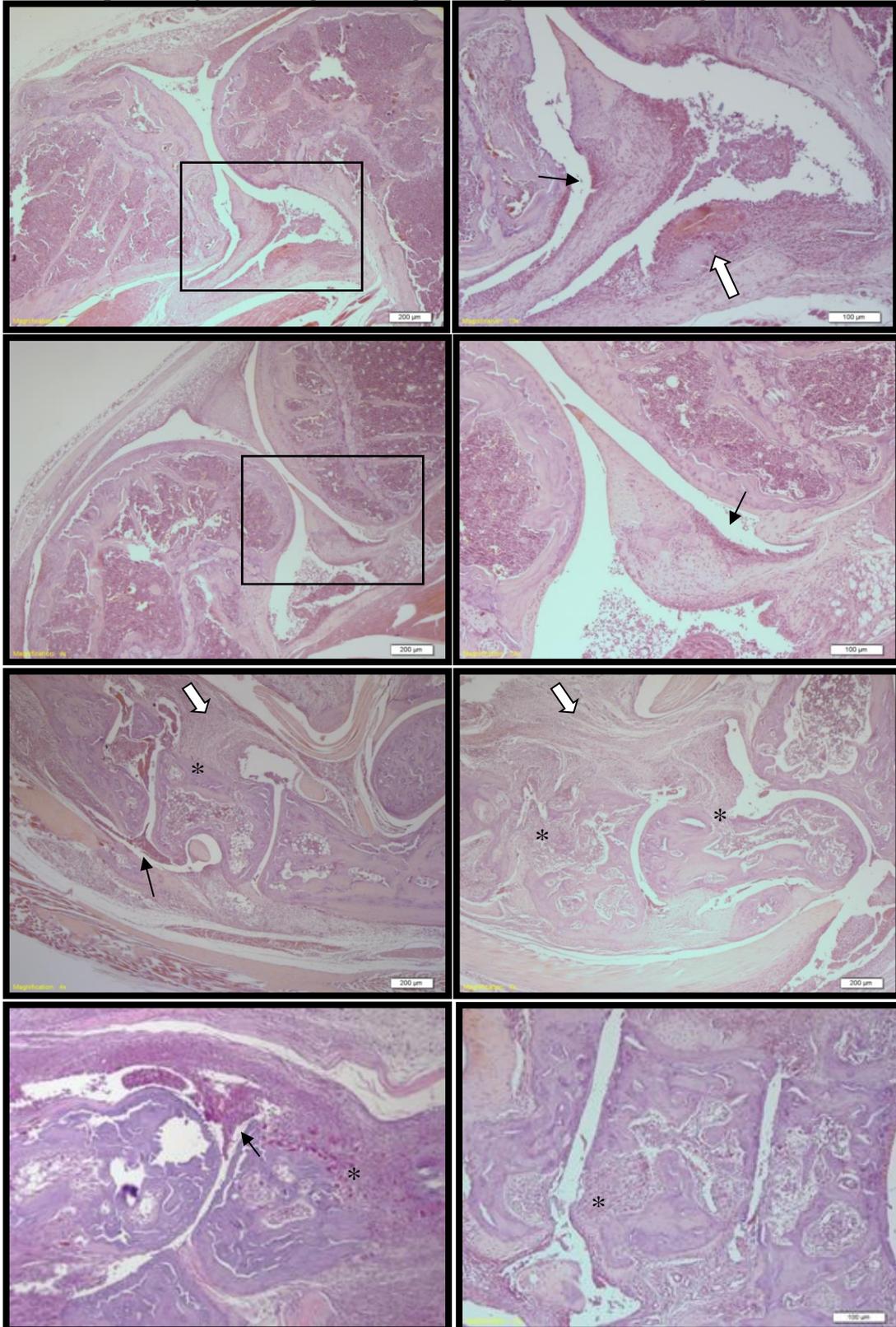
Figura 17 - Representação histológica de regiões da pata de camundongos DBA/1J sadios



Legenda: Secção histológica da articulação femorotibial em aumento de 4x (A) e 10x (B), da junta tarsal (C) e das falanges (D), típicas das articulações de camundongo sadio, corada com hematoxilina e eosina. Nota-se ausência de sinais de inflamação ou degradação da cartilagem ou osso. Membrana sinovial em aspecto normal (seta pontilhada). O retângulo representa a região ampliada.

Fonte: A autora, 2019.

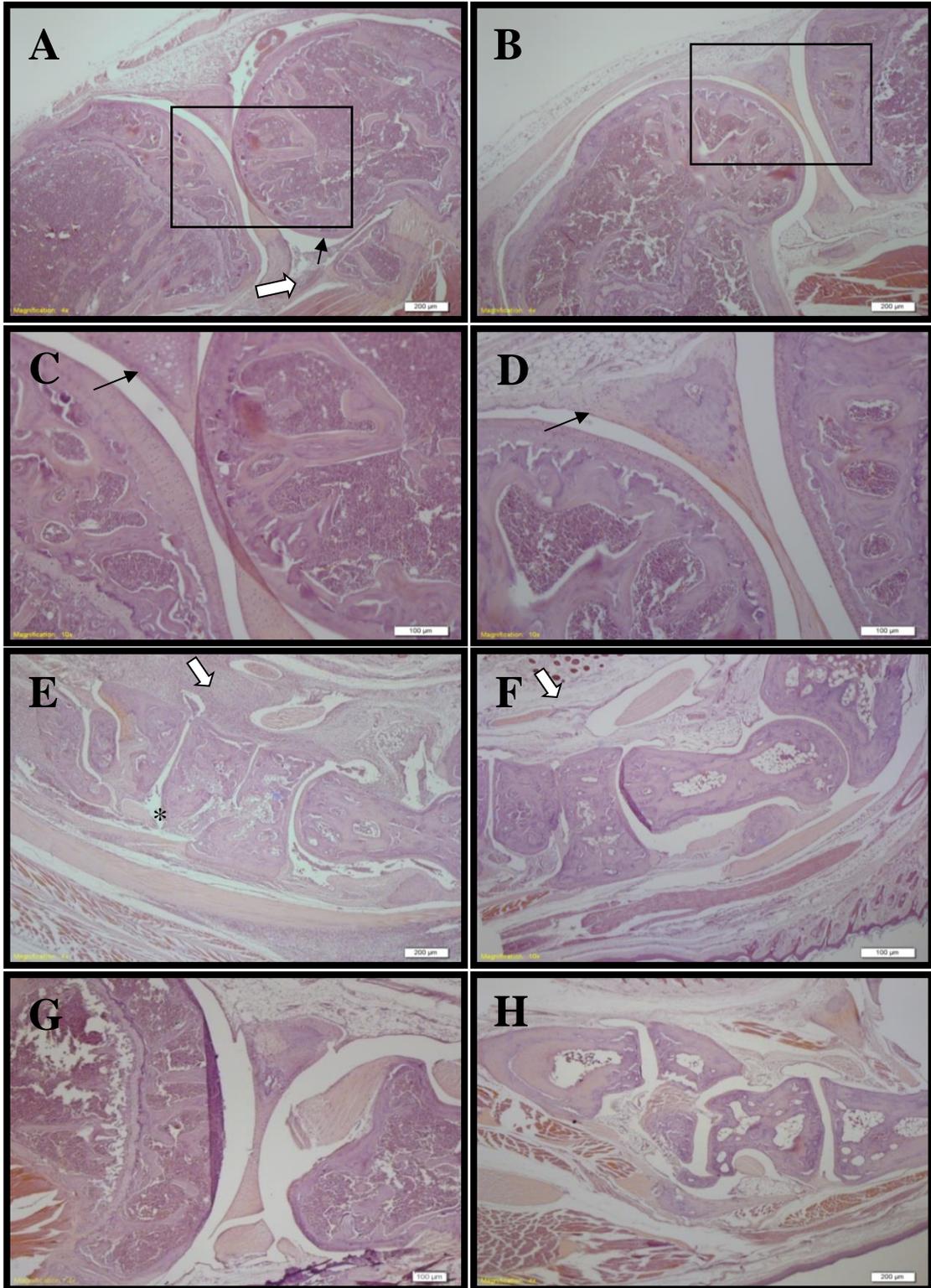
Figura 18 - Representação histológica de regiões da pata de camundongos DBA/1J com CIA



Legenda: Secções histológicas da articulação femorotibial em aumento de 4x (A-C) e 10x (B-D), da junta tarsal 4 x (E, F) e 10 x (G), e da articulação interfalangeana proximal da pata dianteira (H) de animais do grupo CIA (10x), coradas com hematoxilina e eosina. Hiperplasia na membrana sinovial (seta preta); infiltrado inflamatório (seta branca); *Pannus* invasivo, promovendo degradação articular e óssea (asterisco). O retângulo representa a região ampliada.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 19 - Representação histológica de regiões da pata de camundongos DBA/1J com CIA tratados com Ppg-01 ou MTX



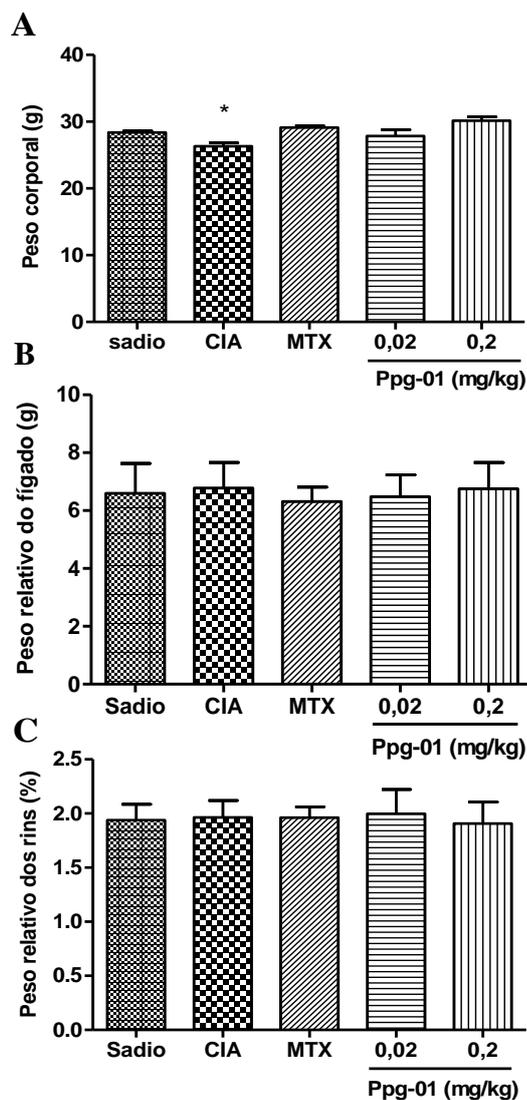
Legenda: A, C, E) Ppg-01 0,02 mg/kg; B, D, F) Ppg-01 0,2 mg/kg; G, H) MTX 2 mg/kg. A, B, G) articulação femorotibial (4x); C, D) articulação femorotibial (10x); E, F, H) articulação tarsal (4x). Seções coradas com hematoxilina-eosina. Hiperplasia na membrana sinovial (seta preta); infiltrado inflamatório (seta branca); *Pannus* invasivo, promovendo degradação articular e óssea (asterisco). O retângulo representa a região ampliada.

Fonte: A autora, 2019.

4.5.4. Efeito do Ppg-01 sobre o peso corporal e de órgãos dos animais com CIA

Após 32 dias da primeira imunização com CII, os camundongos DBA/1J dos diferentes grupos tiveram o peso corporal determinado e após eutanásia, seus órgãos foram extirpados, pesados e relacionados ao peso corporal, para avaliar possíveis alterações. Na Figura 20 estão expressos os valores médios do peso corporal dos animais e os pesos relativos do fígado e rins dos camundongos DBA/1J sádios ou com CIA, tratados com veículo ou com as diferentes doses do Ppg-01 ou metotrexato.

Figura 20 - Variação do peso corporal e peso relativo do fígado e rins nos diferentes grupos de animais no modelo de CIA



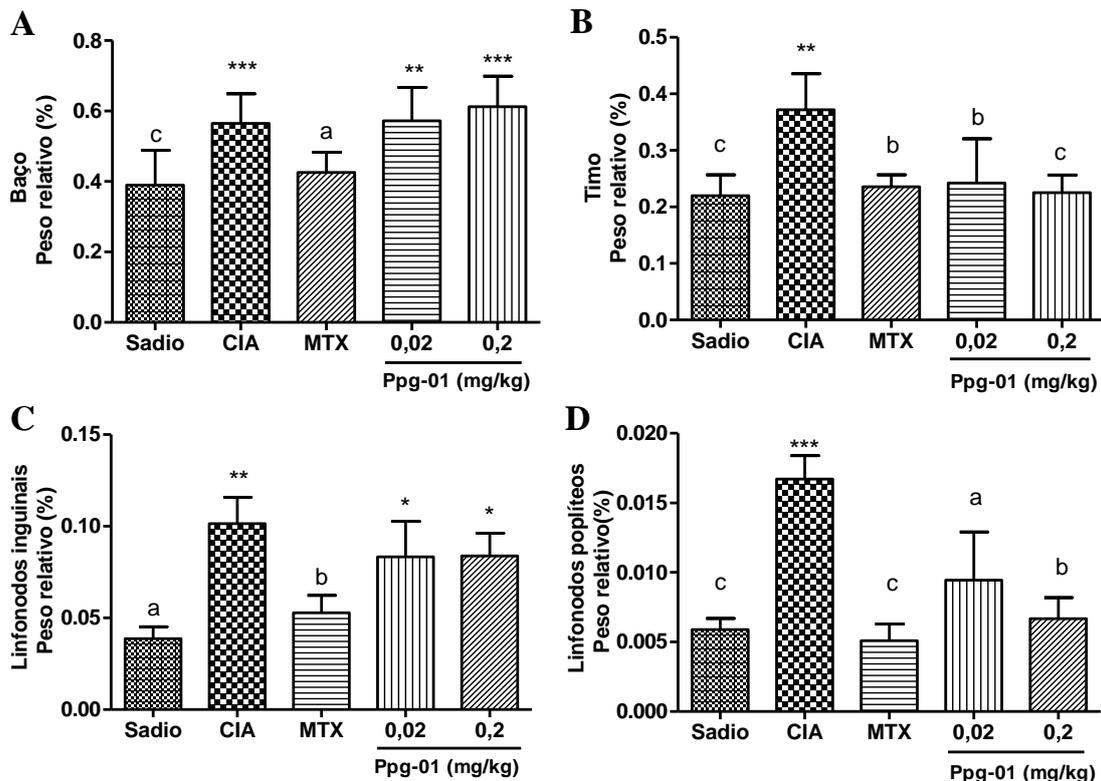
Legenda: (A) Peso corporal, (B) peso relativo do fígado e (C) peso relativo dos rins. Os resultados são expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$ em relação ao grupo sadio (teste One-Way ANOVA seguido de Dunnett).

Fonte: A autora, 2019

Como pode ser visto na Figura 20A, o peso corporal do grupo CIA mostrou redução significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo sadio. Os tratamentos com Ppg-01 e com o MTX não mostraram alteração significativa no peso corporal, tanto quando comparado ao grupo sadio como ao grupo CIA. Também não houve diferença significativa no peso relativo do fígado ou dos rins entre as diferentes condições experimentais.

Quanto ao peso relativo dos órgãos linfoides (Figura 21), o grupo CIA provocou um aumento significativo do peso relativo do baço ($p < 0,001$), timo ($p < 0,01$) e linfonodos inguinal ($p < 0,001$) e poplíteo ($p < 0,001$), quando comparado ao grupo Sadio. No baço e linfonodo inguinal, o tratamento com MTX reduziu ($p < 0,001$) o peso relativo em relação ao grupo CIA, o que não foi observado para Ppg-01. Os pesos relativos do baço e linfonodo inguinal dos grupos tratados com Ppg-01 permaneceram estatisticamente iguais aos do grupo CIA, sendo, portanto, superiores aos pesos relativos apresentados pelo grupo sadio.

Figura 21 - Variação do peso relativo de órgãos linfoides no modelo de CIA



Legenda: Os animais foram eutanasiados e o baço (A), timo (B), Linfonodos inguinais (C) e linfonodos poplíteos (D) foram pesados. Metotrexato 2 mg/kg (MTX). Os resultados estão expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao grupo sadio e ^a $p < 0,05$, ^b $p < 0,01$ e ^c $p < 0,001$ em relação ao grupo CIA (teste One-Way ANOVA seguido de Dunnett).

Fonte: A autora, 2019.

No timo (Figura 21B) e linfonodo poplíteo (Figura 21D) observou-se redução do peso relativo em todos os tratamentos, quando comparados ao grupo CIA, sendo os percentuais de redução do timo os seguintes: 36,7% no grupo MTX e 34,9% e 39,5% nas doses de 0,02 e 0,2 mg/kg de Ppg-01, respectivamente. Os percentuais de redução do linfonodo poplíteo nos grupos MTX e Ppg-01 0,02 mg/kg e 0,2 mg/kg, comparados ao grupo CIA, foram de 69,5%, 43,5% e 60,0%, respectivamente.

4.5.5. Avaliação do efeito do Ppg-01 sobre a celularidade de órgãos linfoides primários e secundários

Ao final do experimento, os camundongos foram eutanasiados e a medula óssea (órgão linfoide primário) e o baço, linfonodos inguinais e poplíteos (órgãos linfoides secundários) foram processados a fim de determinar os efeitos dos tratamentos no número total de células destes órgãos (Figura 22).

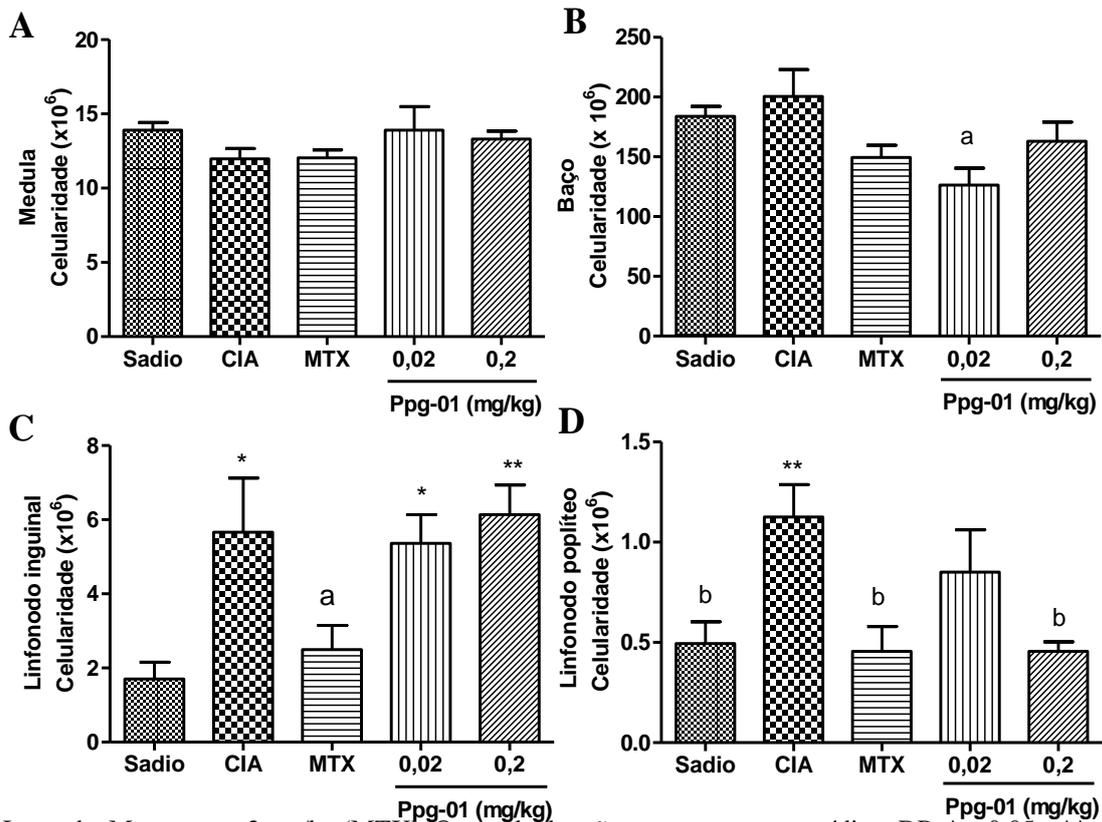
Como observado na Figura 22A, não houve alteração no número de células da medula entre os grupos experimentais avaliados. Em relação ao baço (Figura 22B), não houve alteração no grupo CIA, comparado ao grupo Sadio, apenas a dose de 0,2 mg/kg de Ppg-01 promoveu redução (36,4%) da celularidade em relação ao grupo CIA. Foi observado um aumento ($p < 0,05$) da celularidade do linfonodo inguinal (Figura 2C) ($p < 0,05$) e poplíteo (Figura 22D) ($p < 0,01$) do grupo CIA, em relação ao grupo sadio. No linfonodo inguinal (Figura 22C), dentre os tratamentos, apenas o grupo MTX induziu redução (56%) do número de células, em relação ao grupo CIA. No linfonodo poplíteo (Figura 22D) foi observada redução de 59,5% no número de células no grupo Ppg-01 0,2 mg/kg. O mesmo percentual de redução foi observado para o grupo MTX.

4.5.6. Efeito do tratamento com Ppg-01 sobre as subpopulações de linfócitos CD4+, CD8+ e CD19+, e seus níveis de ativação (CD69+) nos linfonodos inguinal e no baço de camundongos no modelo de CIA.

As subpopulações de linfócitos dos linfonodos inguinais (Figura 23) e do baço (Figura 23) dos camundongos DBA1J com CIA foram diferenciadas através de anticorpos contra marcadores celulares específicos. Populações de linfócitos T *helper* (CD4+) e citotóxicos

(CD8+), e linfócitos B (CD19+), bem como suas formas ativas (CD4+CD69+; CD8+CD69+; CD19+CD69+) foram analisadas com a finalidade de avaliar os efeitos dos tratamentos com Ppg-01 sobre estas células.

Figura 22 - Variação da celularidade de órgãos linfóides no modelo de CIA

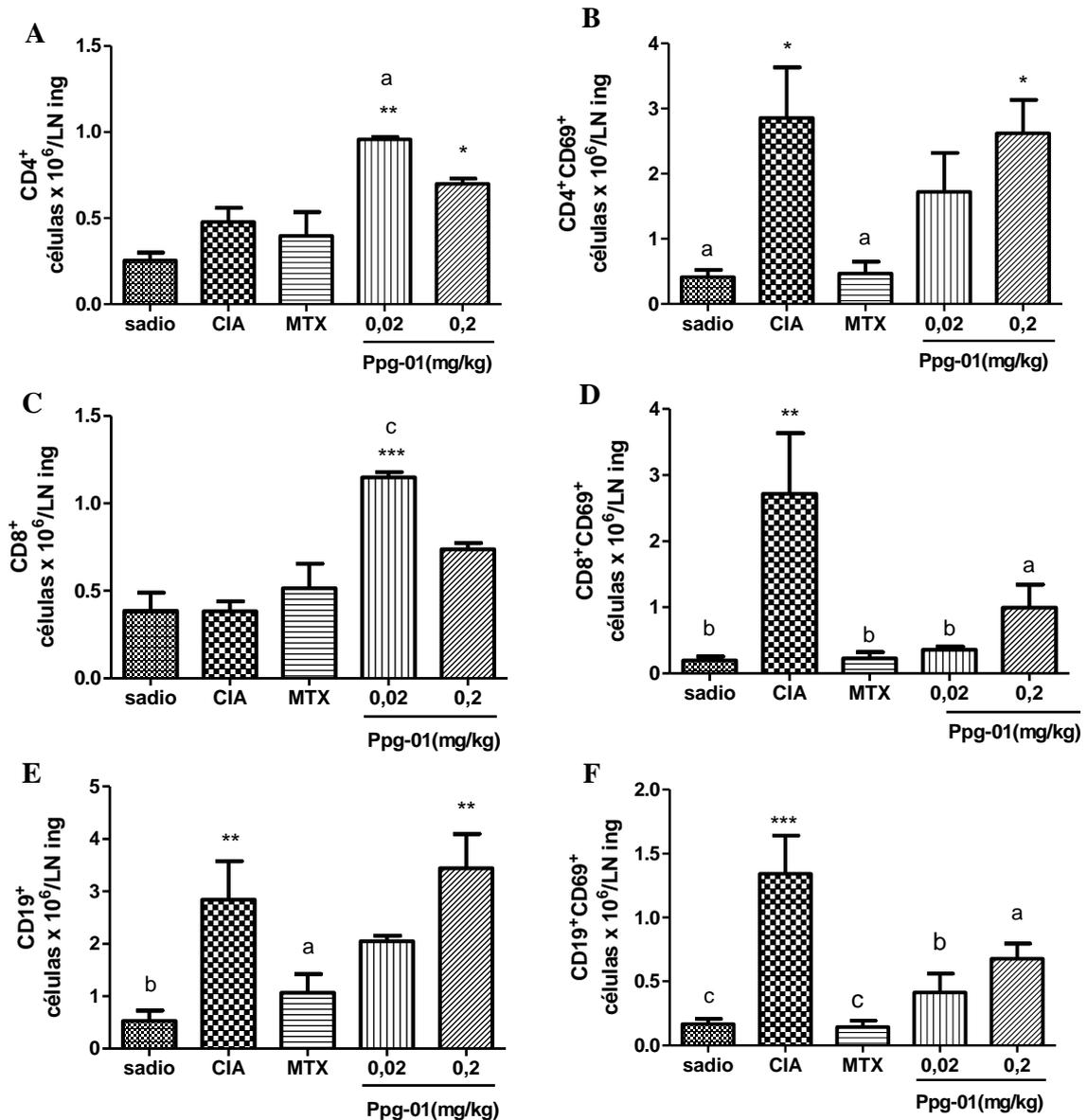


Legenda: Metotrexato 2 mg/kg (MTX). Os resultados são expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, em relação ao grupo sadio e ^a $p < 0,05$, ^b $p < 0,01$ e ^c $p < 0,001$ em relação ao grupo CIA (teste One-Way ANOVA seguido de Dunnett).

Fonte: A autora, 2019.

Não foram observados aumentos no número de linfócitos T CD4+ (Figura 23A) ou T CD8+ (Figura 23C) no grupo CIA, comparado ao grupo sadio. Por outro lado, as subpopulações de linfócitos CD4+CD69+ (Figura 23B), CD8+CD69+ (Figura 23D), CD19+ (Figura 23E) e CD19+CD69+ (Figura 23F) estão aumentadas no grupo CIA, em relação ao grupo sadio. Quando comparado com o grupo CIA, a subpopulação T CD4+ (Figura 23A) foi aumentada ($p < 0,05$) em 100,5% pelo tratamento com a dose de 0,02 mg/kg de Ppg-01. Com relação às células ativadas nessa subpopulação (células CD4⁺CD69⁺), apenas o tratamento com MTX reduziu de maneira significativa ($p < 0,05$) o número de células ativadas em relação ao grupo CIA, sendo esse percentual de redução de 83,6% (Figura 23B).

Figura 23 - Efeito do tratamento com a Ppg-01 sobre o número de células das diferentes subpopulações de linfócitos dos linfonodos inguinais (LN ing) de animais com CIA



Legenda: Os dados mostram um resultado representativo da análise de subpopulações de linfócitos, levando em conta a análise da celularidade total do órgão e dos percentuais das subpopulações de linfócitos, fornecidas através da fenotipagem por citometria de fluxo. Metotrexato 2 mg/kg (MTX). Os resultados são expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo sadio e ^a $p < 0,05$, ^b $p < 0,01$ e ^c $p < 0,001$ em relação ao grupo CIA (teste One-Way ANOVA seguido de Dunnett).

Fonte: A autora, 2019.

Na análise da subpopulação de linfócitos T CD8⁺ (Figura 23C), apenas o tratamento com a dose 0,02 mg/kg de Ppg-01 induziu diferença estatística em relação ao grupo Sadio ou CIA. O tratamento com esta dose aumentou o número de células T CD8⁺, em relação ao grupo de animais sadios (196,7%) e ao grupo CIA (199,2%).

Quando foi avaliado o nível de ativação dessa subpopulação de células (Figura 23D), todos os tratamentos reduziram o número de linfócitos CD8+CD69+, em relação ao grupo CIA, sendo os percentuais de redução de 91,6% (MTX), 86,8% (Ppg-01 0,02 mg/kg) e 63,4% (Ppg-01 0,2 mg/kg).

Quanto ao número total de linfócitos B (células CD19+), apenas o tratamento com MTX produziu redução significativa (62,6%), quando comparado ao grupo CIA (Figura 23E). No entanto, quanto ao nível de ativação desta subpopulação celular (Figura 23F), todos os tratamentos foram capazes de reduzir significativamente o número de linfócitos CD19+CD69+, sendo os percentuais de redução de 89,4% para o grupo MTX, 69,2% para o grupo Ppg-01 0,02 mg/kg e 49,6% para o grupo tratado com 0,2 mg/kg de Ppg-01.

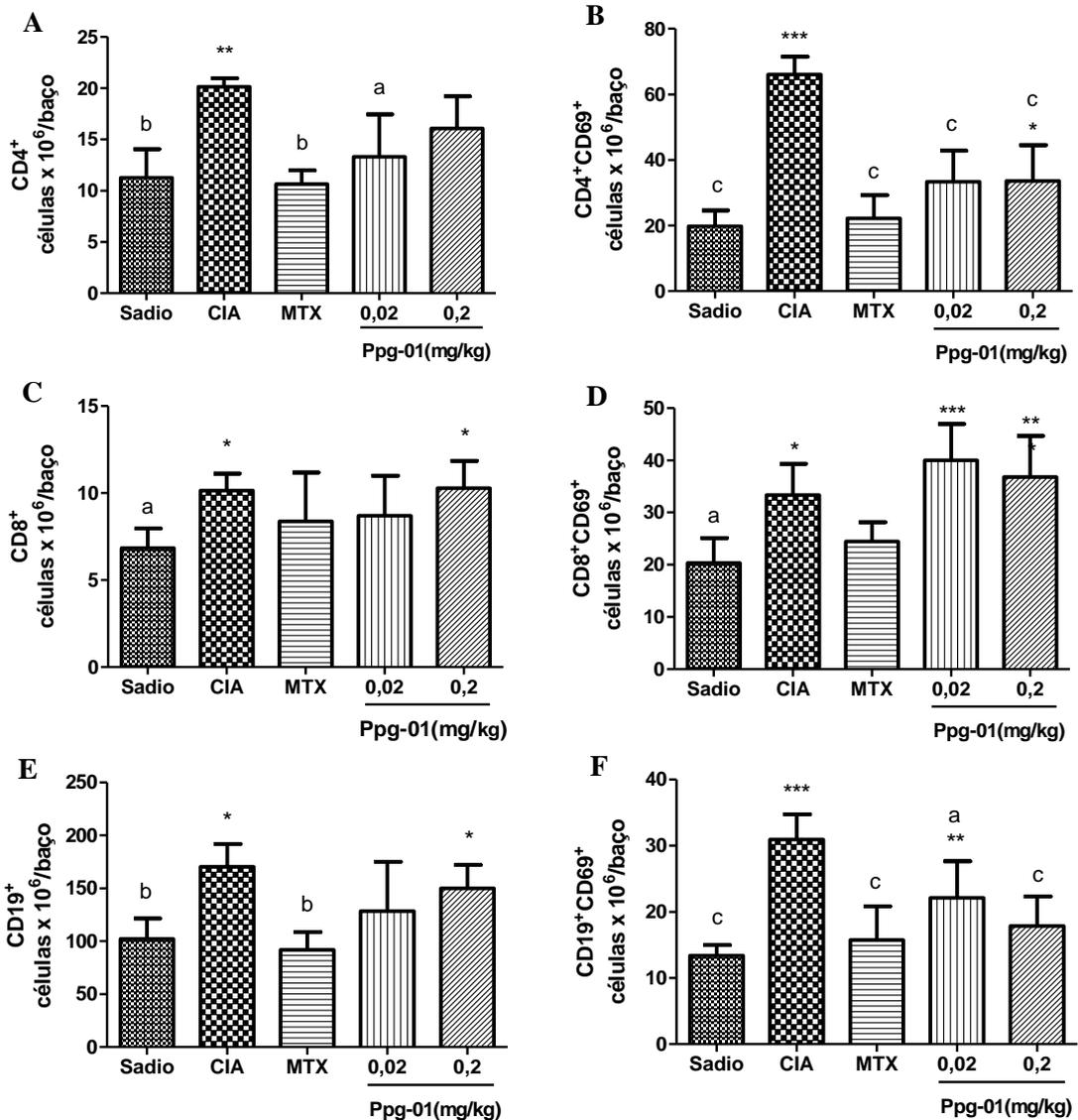
A análise das subpopulações do baço (Figura 24) no grupo CIA mostrou um aumento do número de células CD4+ (Figura 24A), CD4+CD69+ (Figura 24B), CD8+ (Figura 24C), CD8+CD69+ (Figura 24D), CD19+ (Figura 24E), e CD19+CD69+ (Figura 24F), em 78,9%, 233,4%, 48,3%, 63,9%, 66,9% e 131,4% em relação ao grupo sadio, respectivamente.

Os tratamentos com MTX e Ppg-01 0,02 mg/kg reduziram significativamente o número de células T CD4⁺ (Figura 24A) quando comparados ao grupo CIA, sendo as reduções observadas de 47,1% ($p < 0,01$) e 33,9% ($p < 0,05$), respectivamente. Na análise de ativação desta subpopulação (Figura 24B), todos os tratamentos reduziram o número de células CD4+CD69+, em comparação com o grupo CIA, com reduções de 66,4% para MTX, 49,5% para Ppg-01 a 0,02 mg/kg e 49,1% para Ppg-01 a 0,2 mg/kg.

Na análise das células T CD8+ (Figura 23C), não se observou diferença estatística entre o grupo CIA e os grupos com CIA tratados com MTX ou Ppg-01. Quanto à ativação dessas células (Figura 24D), o desenvolvimento da CIA induziu um aumento significativo no número de células CD8+CD69+, em relação ao grupo Sadio, mas nenhum dos tratamentos foi capaz de reduzir de forma significativa o número destas células, em relação ao grupo CIA. Observa-se, entretanto, aumentos de células CD8+CD69+ nos grupos tratados com Ppg-01 nas doses de 0,02 mg/kg (96,7%) e 0,2 mg/kg (80,9%), em relação ao grupo de animais sadios.

Quanto à população de células B (CD19+), houve diferença estatística apenas no grupo tratado com MTX, com redução de 46,0%, em relação ao grupo CIA (Figura 24E). Na análise dos linfócitos CD19⁺CD69⁺ (Figura 24F), houve redução significativa do número total destas células nos grupos tratados com MTX (49,1%) e com as doses de Ppg-01 0,02 mg/kg (28,5%) e 0,2 mg/kg (42,2%), em relação ao grupo CIA.

Figura 24 - Efeito do tratamento com a Ppg-01 sobre a população de linfócitos do baço de animais com CIA



Legenda: Os dados mostram um resultado representativo da análise das populações celulares totais, analisadas por citometria de fluxo levando em conta a celularidade total do órgão. Metotrexato 2 mg/kg (MTX). Os resultados são expressos como média ± DP. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao grupo sadio e ^ap<0,05, ^bp<0,01 e ^cp<0,001 em relação ao grupo CIA (teste One-Way ANOVA seguido de Dunnett).

Fonte: A autora, 2019.

4.5.7. Avaliação do efeito do Ppg-01 sobre os parâmetros hematológicos dos animais do modelo de CIA

Para avaliação dos parâmetros hematológicos, o sangue dos camundongos foi coletado para realização da contagem total e diferencial de leucócitos, bem como avaliação do

hematócrito.

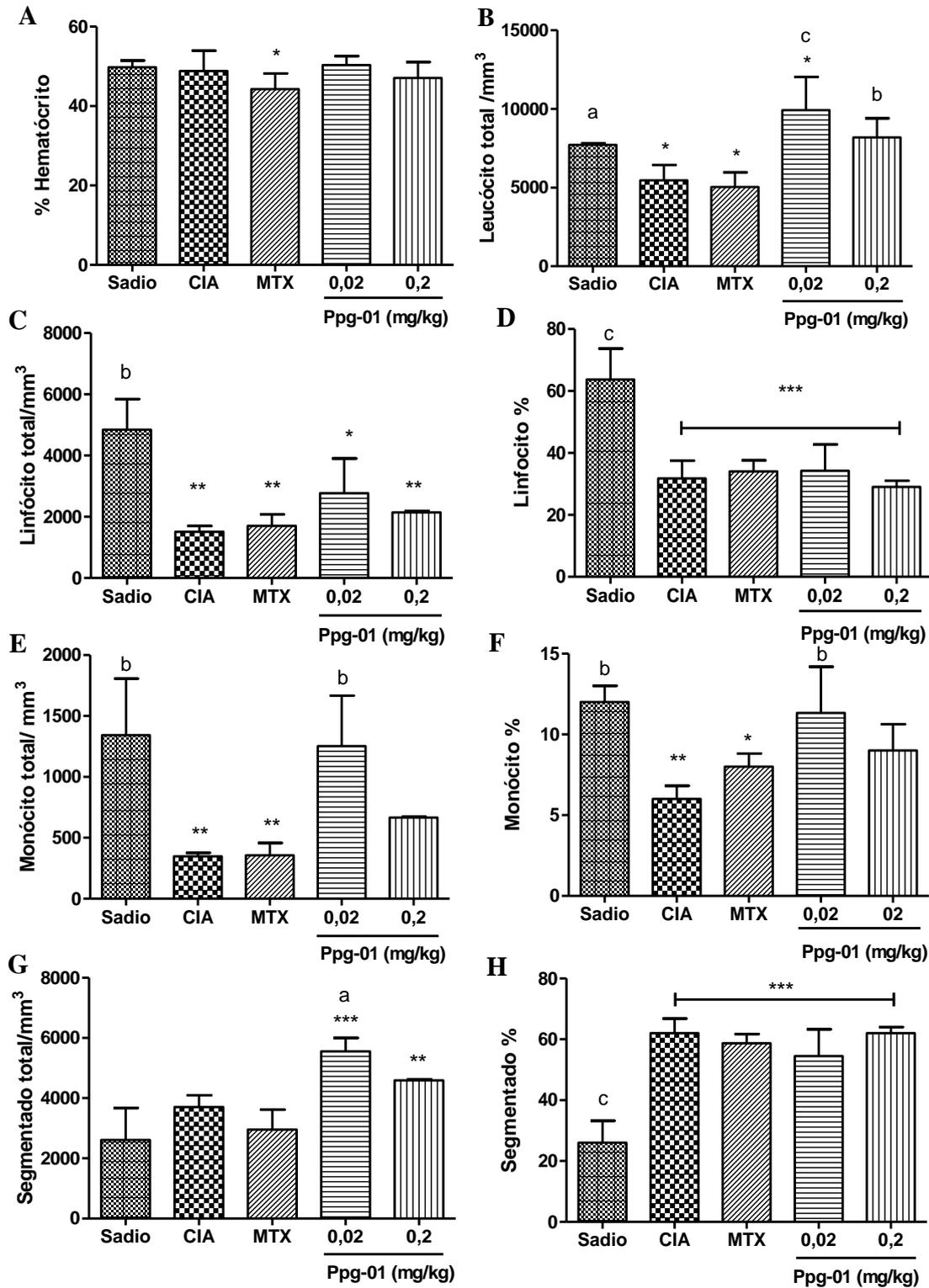
Na Figura 25A pode-se observar que apenas o tratamento com MTX provocou redução (11,1%) ($p < 0,05$) do hematócrito, e quando comparado ao grupo Sadio. Na análise da contagem total de leucócitos no sangue periférico (Figura 25B), pode-se observar que os grupos CIA e MTX apresentaram reduções ($p < 0,05$) de 29,2% e 34,6%, respectivamente, no número total de leucócitos, em relação ao grupo sadio. O grupo Ppg-01 tratado com 0,02 mg/kg apresentou um aumento de 28,9% ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo sadio e de 82,1%, comparado ao grupo CIA, enquanto a dose de 0,2 mg/kg de Ppg-01 induziu aumento de 50,1% ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo CIA.

Na análise do número de linfócitos totais (Figura 25C) e do percentual de linfócitos no sangue (Figura 25D), todos os grupos experimentais reduziram significativamente o número destas células, em relação ao grupo sadio. As reduções no número total de linfócitos foram de 68,9%, 64,8%, 42,8% e 55,7% para os grupos CIA, MTX, Ppg-01 0,02 mg/kg e 0,2 mg/kg, respectivamente, enquanto o percentual de linfócitos foi reduzido ($p < 0,001$) em 50,1%, 46,6%, 46,2% e 54,5% nos respectivos grupos.

O número total de monócitos (Figura 25E) foi reduzido ($p < 0,01$) no grupo CIA (74,2%) e MTX (73,5%), quando comparados aos animais sadios. Na análise do percentual de monócitos (Figura 25F) o grupo CIA e o grupo MTX também apresentaram redução significativa de 50% e 33,3%, em comparação ao sadio, respectivamente. O tratamento com o Ppg-01 0,02 mg/kg aumentou tanto o número absoluto (Figura 25E) quanto o percentual de monócitos (Figura 25F), em relação ao grupo CIA, retornando o número total e o percentual destas células aos níveis dos animais sadios.

Com relação à contagem total de segmentados (Figura 25G) apenas os grupos tratados com Ppg-01 provocaram alterações estatísticas em relação ao sadio, apresentando aumentos de 113,2% na dose 0,02 mg/kg e de 83% na dose 0,2 mg/kg, sendo que somente a menor dose mostrou aumento significativo em relação ao grupo CIA. Quando avaliado o percentual de segmentados (Figura 25H), todos os grupos experimentais induziram aumentos ($p < 0,001$), quando comparado ao grupo sadio, não mostrando alteração em relação ao grupo CIA.

Figura 25 - Efeito do tratamento com a Ppg-01 sobre dados hematológicos em animais com CIA



Legenda: Foram analisadas as doses 0,02 e 0,2 mg/kg em camundongos DBA/J (n= 6/grupo) com CIA ou sadios. Os resultados expressam média \pm DP de dois experimentos sendo as diferenças estatisticamente significativas para * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo sadio (teste One-Way ANOVA seguido de Dunnett).

Fonte: A autora, 2019.

5 DISCUSSÃO

Uma vez que a inflamação tem papel central nos processos que levam à patogênese de diversas doenças, o gerenciamento dos processos inflamatórios com drogas anti-inflamatórias é uma etapa importante na prática clínica (de Anda-Jáuregui *et al.*, 2018). No entanto, a existência de diferentes efeitos adversos e limitações nas estratégias dos tratamentos atuais (Brune e Patrignani, 2015; Gomes *et al.*, 2004; Ensina *et al.*, 2009) vêm estimulando a procura de novas alternativas terapêuticas (Barkin *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2011; Brune e Patrignani, 2015).

Como muitos produtos naturais derivados de plantas vêm sendo utilizados na clínica e outros tantos se encontram nas fases II e III de triagem clínica (Pushpangadan *et al.*, 2015), tais produtos vêm atraindo crescente interesse científico seja por sua diversidade estrutural única de seus constituintes químicos, seletividade ou especificidade bioquímica (Calixto *et al.*, 2003, Koehn e Carter, 2005, Pushpangadan *et al.*, 2015, Cragg e Newmam, 2013, Oliveira *et al.*, 2017, Thomford *et al.*, 2018). Além disso, diversos trabalhos vêm demonstrando a importância de vários fitoconstituintes na modulação da resposta inflamatória aguda e crônica.

Deste modo, o presente trabalho demonstrou o potencial anti-inflamatório agudo e crônico de um constituinte diterpênico isolado dos frutos *P. polygalaeflorus*. A espécie é popularmente conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas, sendo o extrato hidroalcoólico do macerado de seus frutos utilizado para tratamento de reumatismo, dor de garganta e doenças respiratórias (Pio Correa, 1975, Sabino *et al.*, 1999b, Arriaga *et al.*, 2000).

Segundo a literatura, os principais compostos isolados nas espécies do gênero *Pterodon* são os diterpenos furânicos com esqueleto vouacapano e muitas das atividades biológicas dessas espécies são atribuídas à presença destes compostos (Sabino *et al.*, 1999a, 1999b; Spindola *et al.*, 2010; Galceran *et al.*, 2011). Eles pertencem à classe dos terpenoides, que por sua vez constituem a maior classe de metabólitos secundários existente. A estrutura dos vouacapanos é caracterizada por um esqueleto de 20 átomos de carbono construído pela fusão de três anéis de ciclohexano e um anel furânico (Oliveira *et al.*, 2017).

O EDPpg foi o extrato escolhido para realizar o isolamento de compostos pertencentes a esta classe de substância, os terpenoides, uma vez que eles se apresentam em maior percentual neste extrato (49,10%) quando comparados aos outros extratos (39,36% no

EHPpg e 41,73% no EEPpg), aumentando a possibilidade de isolamento. Além disso, o EDPpg apresentou maior rendimento (39%) em relação aos demais extratos (Pinto *et al.*, 2013).

O fracionamento do extrato em coluna de gel-filtração Sephadex LH-20, seguido pelo monitoramento e reunião dos eluatos por semelhança de bandas avaliada por HPTLC resultou em frações com perfis de polaridade distintos. No grupo III, houve o aparecimento de um precipitado branco, que foi isolado por técnicas de cristalização/recristalização, com rendimento de 0,45%, sendo denominado Ppg-01 (Figura 7). Esta substância apresentou alto grau de pureza, como pode ser demonstrado pela presença de um único pico no cromatograma obtido por GC-MS (Figura 8). O Ppg-01 foi identificado como o diterpeno furânico 6 α ,7 β -dihidroxivouacapano-17 β -oato de metila, por GC-MS, RMN de ^1H e ^{13}C (dados não mostrados), e comparação com dados da literatura (Fascio *et al.*, 1976, Arriaga *et al.*, 2000, Spindola *et al.*, 2009).

A análise comparativa do EDPpg e de Ppg-01 por HPTLC revelada para terpenoides também evidencia a eficiência do processo de isolamento, uma vez que a riqueza de bandas observada no extrato bruto foi reduzida a uma única banca concentrada em Ppg-01, como pode ser visto na Figura 9.

Uma vez que se demonstrou elevado grau de pureza de Ppg-01 pelas análises cromatográficas, os ensaios biológicos foram iniciados. Primeiramente, realizamos o *screening* de sua atividade anti-inflamatória *in vitro* por meio da avaliação da capacidade de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS produzir NO em cultura, o qual foi determinado indiretamente pela dosagem do nitrito (reação de Griess). Este consiste num teste rápido e barato, muito utilizado no isolamento bioguiado de compostos ativos de produtos naturais (Dirsch *et al.*, 1998).

O estímulo das células RAW 264.7 com LPS promove a ativação dos macrófagos pela via clássica, resultando em células de fenótipo pró-inflamatório, que passam a produzir citocinas pró-inflamatórias e expressar óxido nítrico sintase induzível (iNOS), o que ocasiona altos níveis de NO (Martinez e Gordon, 2014; Saqib *et al.*, 2018).

O NO é um mediador solúvel envolvido em muitos processos fisiológicos, e quando é liberado durante o processo inflamatório, exerce funções pró-oxidantes e vasodilatadoras, que são importantes para a infiltração dos leucócitos no sítio inflamatório (Guzik *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2013). Os resultados apresentados neste trabalho (Figura 10B) revelaram que o Ppg-01 inibiu significativamente a produção de NO, com IC₅₀ de 13,19 $\mu\text{g/mL}$. Como a produção exacerbada de NO pode contribuir para inúmeras condições patológicas, como

artrite reumatoide, asma, etc. (Dirsch *et al.*, 1998; Nagi *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2014), fármacos que inibem a produção ou a biodisponibilidade de NO, como o Ppg-01, podem representar potenciais alternativas no tratamento dessas doenças inflamatórias (Guzik *et al.*, 2003).

A fim de confirmar se a redução na concentração de nitrito mencionada acima estaria relacionada de fato à modulação das frações sobre alvos celulares ou se seria reflexo da indução de morte celular, foi realizada concomitantemente uma análise de seu potencial efeito citotóxico, pelo ensaio de redução de MTT. Este sal é reduzido pelas desidrogenases mitocondriais a cristais de formazana e esta redução é avaliada pela atividade redutora mitocondrial. Uma vez que apenas células vivas, metabolicamente ativas, podem reduzir o MTT, esta metodologia é aplicada na avaliação da sobrevivência e/ou proliferação celular (Mosmann, 1983). O efeito de Ppg-01 sobre a atividade redutora mitocondrial das células RAW 264.7 resultou numa pequena redução da viabilidade destas células (Figura 10A), tendo apresentado um IC₅₀ de 85,3 µg/mL, indicando que o composto exerce realmente importante efeito imunomodulador (inibidor) sobre a produção de NO, com baixa citotoxicidade sobre tais células.

Quando comparamos os valores de IC₅₀ para a produção de NO do extrato EDPpg de onde foi isolado (11,86 µg/mL) (Pinto *et al.*, 2013), com o valor observado para o composto Ppg-01 isolado (13,19 µg/mL), observa-se um valor próximo ao do extrato bruto. Embora o EDPpg apresente baixo percentual do Ppg-01 (4,25%), ele possui diferentes constituintes que podem atuar conjuntamente, potencializando a ação anti-inflamatória.

Recentemente, Leal e colaboradores (2018) demonstraram a atividade de frações do extrato hexânico de *P. polygalaeiflorus* em modelos *in vitro* e *in vivo* de inflamação. Na análise da produção de nitrito em células RAW 264.7 estimuladas com LPS, as frações Fr3 e Fr4 apresentaram menores valores de IC₅₀ (17,4 µg/mL e 16,85 µg/mL, respectivamente), quando comparadas às demais frações avaliadas (39,99% na Fr1 e 35,12% na Fr2). A expressão da enzima NO sintase induzível (iNOS) pelas células RAW 264.7 estimuladas com LPS também foi analisada e demonstrou-se que estas frações promoveram inibição de 59,3% e 49,6% em relação à expressão apresentada pela cultura controle (só estimulada com LPS). É importante destacar que a iNOS é um importante alvo terapêutico e sua inibição traz benefícios no tratamento de diversas patologias de natureza crônica (Dirsch *et al.*, 1998; Coleman, 2001).

Com relação à análise fitoquímica das frações Fr3 e Fr4 (Leal *et al.*, 2018), ficou demonstrado riqueza de diterpenos furânicos em ambas, estando o composto 6 α ,7 β -

dihidroxiyouacapano-17 β -oato de metila (o composto denominado Ppg-01 neste trabalho) presente num percentual de 5,12% na Fr3, e sendo o diterpeno predominante na Fr4, com percentual de 18,47% (Leal *et al.*, 2018). Os resultados obtidos nesta dissertação vêm confirmar a participação, sugerida por Leal e colaboradores (2018), do 6 α ,7 β -dihidroxiyouacapano-17 β -oato de metila no efeito inibidor das frações Fr3 e Fr4 sobre a produção de NO. Ao comparar os valores de IC₅₀ de Ppg-01 (13,19 μ g/mL), encontrado no presente trabalho, com os valores de IC₅₀ das frações Fr3 (17,40 μ g/mL) e Fr4 (16,85 μ g/mL) apresentados por Leal (2018), maior potência pode ser atribuída ao composto isolado Ppg-01, uma vez que este necessita de menor concentração de amostra para obter 50% da inibição máxima.

Além das espécies *Pterodon*, diterpenos youacapanos são encontrados em outros gêneros da família *Fabaceae*, como *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*, *Dipteryx acunifera*, *Vouacapoua americana*, *Caesalpinia echinata* e *Caesalpinia platyloba*. (Ogawa *et al.*, 1992; Mendes e Silveira, 1994; Kido *et al.*, 2003; Cota *et al.*, 2011; Hurtado *et al.*, 2013). Alguns desses compostos tiveram suas atividades biológicas avaliadas em diversos modelos (Jiang *et al.*, 2001, Pudhom *et al.*, 2007, Odalo *et al.*, 2009). O efeito inibitório sobre a produção de NO em células RAW 264.7 estimuladas com LPS já foi previamente relatado por compostos diterpenos com esqueleto youacapano em outras espécies desta família (Yodsaoue *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2015; Lian *et al.*, 2015).

Também relacionado à inflamação, o recrutamento de leucócitos é um dos primeiros eventos deste processo e está intimamente relacionado ao seu acúmulo em determinados tecidos, contribuindo para diversas patologias. Dessa forma, a inibição da migração de leucócitos é uma importante estratégia na pesquisa e desenvolvimento de novas drogas-anti-inflamatórias (Frow *et al.*, 2004, Luster *et al.*, 2005; Leal *et al.*, 2018). Neste sentido, avaliamos os efeitos do Ppg-01 sobre a migração *in vitro* de macrófagos RAW 264.7, em resposta a um gradiente quimiotático de soro fetal bovino, pelo ensaio de *transwell*, uma metodologia rápida para *screening* de atividade de inibidores de migração celular (Frow *et al.*, 2004; Hulkwoker e Herber, 2011).

Nossos resultados mostraram que a migração dos macrófagos estimulados com LPS através do gradiente quimiotático, muito utilizada na busca de novas alternativas terapêuticas anti-inflamatórias (Frow *et al.*, 2004), sofreu inibição importante (59,3%) pelo tratamento com o Ppg-01 a 10 μ g/mL, o que também foi observado pelo tratamento com Indometacina a 1 μ g/mL (inibição de 46,7%), anti-inflamatório padrão, também já descrito na literatura

(Deng *et al.*, 2012). Estes resultados do Ppg-01 vêm corroborar o efeito anti-inflamatório *in vitro* desta substância.

Em seu trabalho, Leal e colaboradores (2018) também avaliaram o efeito do EHPpg e suas frações Fr1-Fr4 sobre migração de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. No modelo de *transwell*, o extrato e suas frações Fr3 e Fr4 mostraram efetiva atividade, apresentando inibições de 48,3%, 45,6% e 55,7%, respectivamente. Essas amostras também foram efetivas na avaliação da migração celular segundo o ensaio de *wound healing*, como inibições de 78,6%, 65,1% e 4,8%, respectivamente. Como citado anteriormente, na constituição química do EHPpg, Ppg-01 aparece em um percentual de 7,18% (Pinto *et al.*, 2013), além de sua presença nas frações Fr3 e Fr4. Dessa forma, os resultados do Ppg-01, neste trabalho, vem confirmar sua contribuição para o efeito inibidor da migração celular observado nestas amostras, e como consequência, na atividade anti-inflamatória previamente relatada para as mesmas.

Uma vez demonstrado um importante potencial anti-inflamatório para o Ppg-01, através da inibição da produção de NO e da migração, decidiu-se aprofundar os estudos do efeito anti-inflamatório de Ppg-01, utilizando modelos *in vivo* de inflamação.

Para isto, foi desenvolvido o modelo de edema de patas induzido por carragenina. Este modelo de inflamação aguda é altamente preditivo e reprodutível, apresentando papel relevante no desenvolvimento de novas drogas anti-inflamatórias (de origem natural ou sintética) e no estudo de mecanismos de ação (Morris, 2003; Posadas *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2015).

A injeção subplantar de carragenina em camundongos leva à uma resposta edematogênica associada à produção de diversos mediadores inflamatórios, como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, óxido nítrico e citocinas. O edema observado é de característica bifásica. A primeira fase, avaliada neste trabalho, ocorre até 6 h após a injeção do agente flogístico e a segunda entre 24 h e 96 h, sendo observado perfil diferenciado de mediadores envolvidos em cada fase (Henriques *et al.*, 1987; Posadas *et al.*, 2004; Nonato *et al.*, 2011). Além disso, esta resposta em camundongos tem sido associada com mudanças nociceptivas nas patas e migração de células inflamatórias ao sítio de injeção, sendo predominante na primeira fase a infiltração de neutrófilos polimorfonucleares (Henriques *et al.*, 1987; Cunha *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2006).

Nossos resultados demonstraram que o grupo controle deste modelo apresentou um edema de pata com pico em 3 h, conforme já demonstrada na literatura (Rabelo *et al.*, 2013; Taher *et al.*, 2015; Sadeghi *et al.*, 2014), com posterior remissão, assim como para a

indometacina (Lucetti *et al.*, 2010; Taher *et al.*, 2015; Aquino *et al.*, 2016). O tratamento (i.p.) dos camundongos com Ppg-01 inibiu significativamente o edema em 3 h em todas as doses testadas. A maior dose (0,2 mg/kg) foi a mais efetiva, inibindo o edema desde a primeira hora de indução, com percentual de inibição de 53,8% no pico de edema, apresentando efeito semelhante à indometacina, anti-inflamatório padrão. Desta forma, nossos resultados sugerem que o efeito inibitório de Ppg-01 sobre a formação do edema na primeira fase seja devido à inibição do efeito e/ou da síntese de mediadores envolvidos na resposta edematogênica.

O processamento histológico das patas dos animais submetidos ao modelo de edema de pata induzido por carragenina e tratados com o veículo da amostra (Figura 13), confirma a infiltração de neutrófilos na primeira fase da resposta, já descrita na literatura (Henriques *et al.*, 1987; Cunha *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2006). Estes animais apresentaram espessamento da derme e infiltração leucocitária, quando comparados com o grupo sadio. Por outro lado, estes parâmetros foram reduzidos nos animais tratados com o Ppg-01, indicando que este diterpeno furânico derivado de vouacapano também inibe a migração celular *in vivo*, neste caso de neutrófilos, e também o extravasamento de fluidos, na inflamação aguda. A indometacina também reduziu estes parâmetros, o que também tem sido demonstrado por outros autores (Sadeghi *et al.*, 2014; Aquino *et al.*, 2016; Sakthivel e Guruvayoorappan, 2016)

Como dito anteriormente, a presença de 6 α ,7 β -dihidroxivouacapano 17 β -oato de metila (Ppg-01) já havia sido descrita em frutos das espécies *P. emarginatus*, *P. polygalaeflorus* e *Pterodon pubescens* (Fascio *et al.*, 1976; Nunan *et al.*, 1982; Coelho *et al.*, 2005). Nunan e colaboradores (1982) isolaram este metabólito dos frutos de *Pterodon polygalaeflorus* e avaliaram inclusive seu efeito sobre o edema de pata induzido por carragenina, só que em ratos. Quando administrado por via oral a 250 μ mol/kg (92 mg/kg), o diterpeno potencializou o edema nas patas dos camundongos em 18%, havendo após 6 h remissão em 18% deste edema. Em nosso trabalho, utilizamos camundongos da linhagem SW, que foram pré-tratados (via i.p.) com dose muito inferior (460x) à relatada por Nunan em ratos (via oral), encontrando-se um perfil de resposta bem diferente para o Ppg-01 (redução de 53,8% com 0,2 mg/kg i.p.) daquela observada por Nunan e colaboradores (1982). As diferentes rotas de administração do tratamento, bem como o uso de diferentes espécies de animais e de doses diferentes administradas podem justificar as diferenças observadas.

Atividade anti-edematogênica também foi observada em outro diterpeno vouacapano isolado de *Pterodon*. A administração oral de 50 mg/kg de 6 α ,7 β -diidroxivouacapan-17 β -oico, isolado de *P. emarginatus*, provocou inibição no edema induzido por carragenina e por prostagandina E2. Além disso, no teste de formalina, o este derivado de vouacapano (50 e 100

mg/kg) mostrou-se efetivo na inibição da fase neurogênica e na fase inflamatória do modelo, sendo mais eficaz na segunda fase. Os autores sugeriram que este diterpeno possa ser um dos princípios ativos responsáveis pelas atividades anti-inflamatórias observadas na espécie (Galceran *et al.*, 2011).

Uma vez que a população utiliza os frutos de *Pterodon* para o tratamento de artrite e que trabalhos anteriores sugerem que os constituintes furanoditerpenos sejam os principais compostos envolvidos nas atividades biológicas descritas para as espécies (Silva *et al.*, 2004), tornou-se de fundamental importância a avaliação deste composto em um modelo inflamatório de artrite. Para isto foi empregado no presente trabalho o modelo de artrite induzida por colágeno II em camundongos. Este modelo compartilha muitas características com a AR humana, sendo por isso considerado padrão ouro no estudo da patogênese da AR e na pesquisa por novas drogas (Brand *et al.*, 2007; Choudhary *et al.*, 2018, dudics *et al.*, 2018).

A administração de colágeno tipo II heterólogo emulsificado em AFC em linhagem com suscetibilidade genética (ex. DBA/1) leva ao desenvolvimento de uma poliartrite associada à resposta de linfócitos B e linfócitos T, com a produção de anticorpos anti-colágeno II e células T colágeno-específicas (Asquith *et al.*, 2009; Bevaart *et al.*, 2010; Choudhary *et al.*, 2018).

No presente estudo, a imunização dos camundongos DBA/1J com colágeno II galináceo provocou uma resposta artritogênica que teve início no 21º dia e pico no 30º dia após a primeira imunização, e foi seguido de remissão (Figura 14). Assim, após 11 dias de tratamento, Ppg-01 mostrou-se potencialmente antiartrítico ao reduzir o edema na pata, avaliado como índice de artrite, em 45,7% e 52,8%, nas doses de 0,02 e 0,2 mg/kg. A mesma resposta foi observada na avaliação dos parâmetros clínicos das patas (Figura 15).

Efeito antiartrítico (38-42%) também foi observado no extrato diclorometânico de *P. pubescens* (Grando *et al.*, 2017) em modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos, demonstrando-se uma redução do índice de artrite apenas no 14º dia em doses superiores (30-300 mg/kg) à utilizadas no presente trabalho (0,02-0,2 mg/kg).

Os aspectos histológicos envolvidos na CIA se assemelham muito aos observados na AR humana e caracterizam-se por infiltração inflamatória sinovial, erosão óssea e da cartilagem e hiperplasia sinovial (Asquith *et al.*, 2009, Bevaart *et al.*, 2010; Choudhary *et al.*, 2018). Estas alterações foram fortemente observadas na artrite desenvolvida neste trabalho (Figura 18). No que diz respeito à infiltração de células inflamatórias no tecido sinovial nas articulações tarsais, a menor dose foi incapaz de promover diminuição na infiltração no tecido, enquanto a maior dose reduziu ligeiramente o infiltrado (Figura 19A-F). No entanto, a

hiperplasia sinovial na articulação femorotibial e o grau de degradação articular e óssea foram reduzidos pelos tratamentos com ambas as doses, quando comparados ao grupo CIA, onde houve massiva degradação. Essa baixa resposta na redução do infiltrado inflamatório pode ser devido ao curto tempo do tratamento (onze dias) ou porque as doses empregadas não foram suficientes para provocar alterações histológicas mais intensas, mesmo tendo reduzido o edema e os parâmetros clínicos da doença (escore) de forma significativa (Figura 14). Por outro lado, no tratamento de camundongos com CIA com extrato hidroetanólico 15% de frutos de *Petrodon pubescens*, via oral por 21 dias, observou-se redução significativa tanto da hiperplasia sinovial, como do infiltrado inflamatório, além de reduzir a erosão óssea e a destruição articular (Coelho *et al.*, 2004). Embora não tenha sido realizada a fitoquímica do extrato etanólico 15% neste trabalho, é importante destacar a presença do 6 α ,7 β -dihidroxiouacapano-17 β -oato de metila e de outros derivados furanoditerpênicos no extrato etanólico 100% dos frutos desta espécie (Coelho *et al.*, 2005).

Adicionalmente, as frações Fr3 e Fr4 do extrato hexânico de *P. Polygalaeiflorus*, que possuem este derivado de vouacapano (Leal, 2015), e cuja ação antiartrítica no modelo de AIA já foi citada anteriormente, também melhoraram os parâmetros histológicos na articulação tíbio-tarsal dos camundongos, comparados aos animais controle de AIA. Os efeitos antiartríticos do Ppg-01 na CIA, demonstrados neste trabalho, corroboram a participação do 6 α ,7 β -dihidroxiouacapano-17 β -oato de metila na atividade antiartrítica relatadas para estas frações Fr3 e Fr4.

A erosão óssea periarticular, desencadeada na AR pelo desbalanço de osteoblastos e osteoclastos, afeta de forma significativa a qualidade de vida dos pacientes acometidos, sendo também observada na CIA. Desta forma, terapias antierosivas, além de anti-inflamatórias, têm despertado grande interesse científico e clínico (Braun e Zwerina, 2011).

Citocinas pró-inflamatórias envolvidas na patogênese da AR, como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-17 estimulam a maturação e ativação de osteoclastos, via mecanismos do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK-L). Esses fatores promovem o influxo e a diferenciação de monócitos em osteoclastos que promoverão a reabsorção óssea a partir da expressão de efetores como catepsina k, MMPs e íons H⁺ (Choi *et al.*, 2019; Okamoto *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2018).

A avaliação radiográfica é um exame de imagem típico e o primeiro a ser solicitado para avaliar a artrite, e as alterações patológicas da AR incluem perda uniforme do espaço articular, erosões ósseas, anquiloses, inchaço dos tecidos moles, etc. (Jacobson *et al.*, 2008;

Barbieri *et al.*, 2016; Aletaha *et al.*, 2018). Os resultados das avaliações radiológicas da pata de animais com CIA tratados com Ppg-01 (Figura 16) revelam potencial efeito protetivo sobre os ossos, com reversão do estreitamento do espaço articular, observado na CIA, além da redução de anquiloses. Esta atividade do Ppg-01, pode estar relacionada ou não a mecanismos que alterem o balanço e/ou a função de osteoblastos e osteoclastos. Um dos possíveis alvos para levar a este desbalanço no tecido ósseo pode ser a produção exacerbada de óxido nítrico pela iNOS, tendo sido demonstrado a relação entre a ativação de iNOS e a apoptose de osteoblastos em modelos de osteoporose *in vivo* (Amour *et al.*, 2001). Outros trabalhos mostram que camundongos deficientes em iNOS são resistentes à reabsorção óssea (Van't Hof *et al.*, 2000; Van't Hof e Ralston, 2001; Nagi *et al.*, 2010). Dessa forma, inibidores de iNOS poderiam ser valiosos no tratamento da perda óssea em condições inflamatórias, como a AR (Amour *et al.*, 2001).

Neste contexto, como o Ppg-01 foi capaz de inibir a produção *in vitro* de NO, pode-se sugerir que o Ppg-01 promova níveis menores de NO no local da inflamação, comparado com o grupo CIA, reduzindo a apoptose de osteoblastos, e permitindo portanto uma melhor recuperação da estrutura óssea. Além disso, o Ppg-01 é capaz de reduzir a migração *in vivo* (Figura 13) e *in vitro* (Figura 11) de células inflamatórias. Dessa forma, ele pode estar diminuindo a destruição óssea por reduzir o influxo de macrófagos (células precursoras de osteoclastos) no tecido sinovial e/ou inibir vias de diferenciação destas células em osteoclastos, ativação ou função dessas últimas. Interessantemente, foi demonstrado um efeito inibidor da osteoclastogênese, diferenciação de macrófagos em osteoclastos, para as frações Fr3 e Fr4, as quais possuem o Ppg-01 em suas composições (Leal, 2015).

A análise do peso corporal e de órgãos é um importante parâmetro na avaliação preliminar de possíveis efeitos tóxicos associados a tratamentos na pesquisa de novos fármacos (Nirogi *et al.*, 2014). A análise do peso corporal dos grupos neste trabalho revelou que o tratamento com Ppg-01 reverteu a perda de peso induzida pelo desenvolvimento da CIA. Isto indica um melhor prognóstico para os animais tratados com o Ppg-01, os quais apresentaram uma artrite menos debilitante do que a do grupo CIA, permitindo possivelmente melhor e maior acesso ao alimento. A ausência de diferença estatística entre o peso relativo do fígado (Figura 20B) e dos rins (Figura 20C) entre os grupos experimentais sugere que o tratamento não produziu efeitos tóxicos sobre esses órgãos.

Com relação aos órgãos linfoides secundários, sua importância na AR foi demonstrada em estudos anteriores (Newbould *et al.*, 1964). Esses órgãos geralmente estão com seus pesos aumentados nesta condição patológica devido à hiperplasia de células

linfoides (Lorton *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2007), o que é considerado um sinal de imunidade aumentada (Kwon *et al.*, 2014). Neste trabalho, observamos aumento do peso relativo do baço e linfonodos drenantes no grupo CIA, além do peso relativo do timo, que é um órgão linfóide primário onde se completa a maturação de células T. Os aumentos observados nos pesos relativos do timo e dos linfonodos poplíteos foram reduzidos pelo tratamento com Ppg-01, sugerindo efeito inibidor deste sobre o sistema imune.

Com relação à celularidade, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos experimentais na contagem de células da medula (Figura 22A). A esplenomegalia e aumento da celularidade do baço, frequentemente observados na CIA, podem estar associados à expansão seletiva de esplenócitos mielóides CD11b⁺, precursores de fagócitos mononucleares e neutrófilos. Na AR, as células CD11b⁺ podem se diferenciar em osteoclastos, em um processo regulado negativamente por interferon gama (IFN- γ). Esse efeito estimulador sobre a mielopoiese está associado à superestimulação inata por componentes micobacterianos do AFC, utilizado na indução da CIA (Billiau e Matthys, 2001; De Klerck *et al.*, 2004). Apesar do tratamento com Ppg-01 não ter reduzido o peso do baço, a contagem de esplenócitos foi menor no tratamento com o Ppg-01 na dose 0,02 mg/kg, em comparação ao grupo CIA, o qual apresentou tendência de aumento em relação ao grupo sadio. Embora não tenhamos avaliado a subpopulação CD11b⁺ especificamente, a redução na contagem de células pode estar relacionada à redução dessa população. Quanto ao linfonodo poplíteo, a redução do peso relativo foi acompanhada pela redução do número de células, na maior dose, indicando efeito imunossupressor, o que não foi observado com a menor dose.

As células T têm papel fundamental na patogênese da AR, atuando de forma ativa na iniciação e progressão da doença. As células T CD4⁺ estão altamente infiltradas no sítio da inflamação onde medeiam indiretamente a produção de autoanticorpos, a inflamação na articulação e a reabsorção óssea (Guo *et al.*, 2018). As células CD8⁺, por sua vez, têm sido associadas à supressão da patogenicidade na doença (Kadowaki *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 2008). Esse efeito supressor pode ser demonstrado pelo fato de que camundongos deficientes em CD8 mostram-se mais suscetíveis à segunda indução da CIA após remissão da doença inicial (Tada *et al.*, 1996).

O tratamento dos animais artríticos com Ppg-01 diminuiu o número absoluto de linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) e linfócitos B (CD19⁺) ativados (CD19⁺CD69⁺) nos linfonodos inguinais em comparação com o grupo CIA. A menor dose provocou aumento do número de células CD4⁺, sem afetar sua ativação.

No baço, o efeito do tratamento com Ppg-01 foi mais pronunciado, uma vez que induziu significativa redução do número absoluto de células T CD4⁺ na menor dose, e na subpopulação ativada (CD4+CD69+), com ambas as doses, além de redução na subpopulação de linfócitos B ativados (CD19+CD69+). Esses dados indicam que Ppg-01 possivelmente esteja afetando mecanismos envolvidos tanto na expansão como na ativação de linfócitos. Por isso, pode-se sugerir um efeito imunomodulador para o Ppg-01 no tratamento de animais com CIA.

As frações Fr 3 e Fr4 do EHPpg, potencialmente antiartríticas na AIA, também apresentaram efeito imunomodulador. No linfonodos inguinais dos camundongos com AIA foi observada redução do número absoluto de células T CD4⁺ e T CD8⁺. No entanto, quanto à ativação, houve aumento na subpopulação CD4+CD69+, tendo sido sugerido um desvio da resposta imune para resposta Th2 em detrimento da resposta Th1 (Leal, 2015).

Em outro trabalho do grupo, o óleo essencial de *P. polygalaeiflorus* inibiu a proliferação *in vitro* de linfócitos do baço, induziu morte celular por apoptose e afetou a ativação dos subtipos de linfócitos, sugerindo efeito sobre a modulação da resposta imune. Além disso, também apresentou efeito anti-inflamatório no modelo de bolha de ar (Veloso *et al.*, 2013). Este modelo mimetiza o microambiente da cavidade sinovial, com a injeção de carragenina produzindo uma resposta inflamatória associada à infiltração de leucócitos, exsudação de proteínas e produção de mediadores inflamatórios (Duarte *et al.*, 2018).

Trabalhos anteriores do nosso grupo com a espécie *P. pubescens* (Coelho *et al.*, 2004), também relataram sua atividade moduladora sobre a resposta imune. Camundongos com CIA tratados com o extrato hidroalcoólico de *P. pubescens* apresentaram menor severidade da artrite, melhora dos parâmetros histológicos, redução no número absoluto de células T CD4⁺, células T CD8⁺ e células T CD4+CD69+, com aumento de células T CD8+CD69+ nos linfonodos inguinais dos animais. Uma vez que o extrato também inibiu a produção de mediadores inflamatórios *in vitro* (IL-6 em células mononucleares do sague periférico e NO em macrófagos murinos), foi sugerido que o efeito imunomodulador observado estivesse relacionado à redução das funções de células acessórias, necessárias para a ativação de linfócitos.

Com relação aos parâmetros hematológicos (Figura 25), sugere-se que a redução no número total de leucócitos, linfócitos e monócitos, observada no grupo CIA, pode estar relacionada a uma maior migração destas células para a pata inflamada. Dados da literatura mostram que monócitos do sangue periférico de pacientes de AR exibem aumento quantitativo na expressão de moléculas de adesão e qualitativo, na avidéz dos receptores de

adesão (Lioté *et al.*, 1996). Essas mudanças poderiam influenciar a adesão desses monócitos ao endotélio. Por outro lado, o aumento do número total de leucócitos nas duas doses do furano diterpeno Ppg-01 utilizadas, o aumento do número total e percentual de monócitos na menor dose, bem como o número total de segmentados na menor dose, todos em relação ao grupo CIA, pode estar relacionado à redução da expressão/ativação de moléculas de adesão, induzida pelo Ppg-01, uma vez que a regulação de moléculas de adesão, como integrinas, pode ser modificada por drogas (Weill *et al.*, 1992), reduzindo a capacidade destas células se infiltrarem no tecido e promoverem maior dano. A menor infiltração de leucócitos no tecido da pata dos animais submetidos ao edema de patas também pode estar relacionada ao efeito modulador sobre moléculas de adesão.

De fato, a atividade anti-inflamatória de terpenos tem sido relatada em diversas espécies (Kin *et al.*, 2013; González *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013; Través *et al.*, 2014). Estudos *in vitro*, relatam uma inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1B e IL-6, por diversas classes de terpenoides (Veja *et al.*, 2018). Também foi demonstrado que certos compostos terpênicos podem exercer suas funções anti-inflamatórias através da modulação dos perfis de secreção de citocinas Th1/Th2 ou da inibição de respostas imunes de células T (Ku e Lin, 2013).

No presente trabalho, o único mediador inflamatório avaliado foi o NO. Entretanto, a redução do edema de pata induzido por carragenina e a melhora significativa da severidade da CIA sugere que Ppg-01 possa atuar em vias de outros mediadores inflamatórios, já que diversos mediadores inflamatórios estão envolvidos na indução do edema de patas induzido por carragenina (Henriques *et al.*, 1987; Posadas *et al.*, 2004). Estudos desenvolvidos por Rocha e colaboradores (2006) demonstraram a participação do TNF- α na resposta inflamatória desencadeada pela injeção de carragenina nas patas dos camundongos. A administração de anticorpo anti-TNF- α reduziu drasticamente o edema de patas na primeira fase do modelo, fase avaliada neste trabalho. Desta forma, o TNF- α pode ser um potencial alvo de Ppg-01.

Esta citocina pró-inflamatória é produzida por monócitos, macrófagos linfócitos T ativados e está envolvida em diversos processos inflamatórios, dentre eles a AR onde se encontra com níveis elevados no fluido sinovial. O desenvolvimento da AR envolve a indução de metaloproteinases e moléculas de adesão, ativação de osteoclastos, angiogênese, dentre outros processos. A terapia com bloqueio de TNF- α está associada a uma mudança no

equilíbrio de citocinas, podendo ser esta citocina um potencial alvo terapêutico para tratamento da AR (Vasati *et al.*, 2007; Yamanaka, 2015; Guo *et al.*, 2018).

Apesar de diversos estudos farmacológicos avaliarem as atividades biológicas de furano diterpenos isolados de espécies do gênero *Pterodon* (Oliveira *et al.*, 2018), a maioria dos trabalhos está limitada ao estudo de sua atividade antinoceptiva. Poucos são os trabalhos que avaliam a atividade anti-inflamatória desses compostos.

Neste sentido, este trabalho demonstra atividade anti-inflamatória para Ppg-01, sugerindo que este composto possa ser um dos princípios ativos responsáveis pelas atividades biológicas atribuídas às espécies *Pterodon*, abrindo perspectivas para um estudo mais detalhado de seu efeito na CIA, bem como de seu mecanismo de ação, efeitos farmacocinéticos, toxicológicos, assim como os efeitos farmacológicos.

CONCLUSÕES

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

- a) O fracionamento do extrato diclorometano de *P. polygalaeflorus* (EDPpg), seguido de cristalização/recristalização de precipitado, resultou no isolamento, com elevado grau de pureza, do diterpeno furânico identificado como 6 α ,7 β -diidroxivouacapano-17 β -oato de metila (Ppg-01).
- b) Ppg-01 apresentou atividade significativa na inibição da produção in vitro de NO por células RAW 264.7;
- c) Ppg-01 inibiu significativamente a migração in vitro de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS;
- d) O Ppg-01 apresentou significativo efeito anti-edematogênico agudo, diminuindo parâmetros inflamatórios como o edema de pata induzido por carragenina, espessamento da derme e infiltração leucocitária;
- e) Ppg-01 apresentou potencial efeito imunomodulador e antiartrítico no modelo de CIA, ao:
 - f) - reduzir o índice de artrite e os parâmetros clínicos da doença;
 - g) - promover proteção à integridade óssea e articular, segundo avaliação radiológica e histológica;
 - h) - reduzir a celularidade do baço e linfonodo poplíteo, órgãos linfoides secundários;
 - i) - reduzir o número absoluto de diferentes subpopulações de linfócitos T ativos no baço e no linfonodo inguinal (T CD4+CD69+ no baço e T CD8+CD69+ no linfonodo);
 - j) - reduzir o número absoluto de linfócitos B ativos (CD19+CD69+) tanto no baço como no linfonodo inguinal, células produtoras de anticorpos (incluindo autoanticorpos, patogênicos na CIA).

REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Fausto N, Kumar V. Robbins & Cotran. Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 8. ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2010.
- Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. 3 ed, Illinois, Carol Stream, 2001.
- Aletaha D, Smolen, JS. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis. JAMA. 2018; 320(13):1360-1372.
- Ali AM, Habeeb RA., El-Azizi NO, Khattab DA, Abo-Shady, R.A., Elkabarity RH. Higher nitric oxide levels are associated with disease activity in Egyptian rheumatoid arthritis patients. Rev. Bras. Reumatol. 2014; 54(6): 446-451.
- Amin MA, Fox DA, Ruth, JH. Synovial cellular and molecular markers in Rheumatoid Arthritis. Semin Immunopathol. 2017; 39(4): 385-393.
- ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF, versão 2, 2013.
- Arend WP, Firestein GS. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. Nat Rev Rheumatol. 2012; 8(10): 573-586.
- Armour KJ, Armour KE, van't Hof RJ, Reid DM, Wei XQ, Liew FY, Ralston SH. Activation of the inducible nitric oxide synthase pathway contributes to inflammation-induced osteoporosis by suppressing bone formation and causing osteoblast apoptosis Arthritis Rheum. 2001; 44(12): 2790-1796.
- Arriaga AMC, Castro MAB, Silveira ER, Braz-Filho R. Further diterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. J Braz Chem Soc. 2000; 11: 187-190.
- Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, Liew FY. Animal models of rheumatoid arthritis. Eur J Immunol. 2009; 39(8): 1991-2058.
- Barbieri F, Zampogna G, Camellino D, Paparo F, Cutolo M, Garlaschi G, Cimmino MA. Ankylosis of the wrist bones in patients with rheumatoid arthritis: a study with extremity-dedicated MRI. Clin Exp Rheumatol. 2015; 34(1): 49-52.
- Barkin RL, Beckerman M, Blum SL, Clark FM, Koh EK, Wu DS. Should nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) be prescribed to the older adult? Drugs Aging. 2010; 27: 775-789.
- Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? 2010; 2(8): 2192-2205.
- Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. J Leukoc Biol. 2001; 70: 849-860.

- Bingham CO, Moni M. Periodontal disease and rheumatoid arthritis: the evidence accumulates for complex pathobiologic interactions. *Curr Opin Rheumatol*. 2013; 25(3): 345-353.
- Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125: S33-S40.
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci*. 2001; 161: 839-851.
- Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc*. 2007; 2(5): 1269-1275.
- Brasil. Congresso Nacional. Lei nº 9 782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema nacional de vigilância sanitária, cria a Agência nacional de vigilância sanitária, e dá outras providências. Poder legislativo, Brasília, DF, 27 jan 1999.
- Braun T, Zwerina J. Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther J*. 2011; 13(4): 235.
- Braz-Filho R, Gottlieb OR, Assumpção RMV. A química de leguminosas brasileiras XXVIII [1] - As isoflavonas de *Pterodon pubescens*. *An Acad Brasil Ciênc*. 1970; 12 (Suplem): 111-113.
- Braz-Filho R, Gottlieb OR, Assumpção RMV. The isoflavones of *Pterodon pubescens* *Phytochem*. 1971; 10: 2835-2836.
- Brennan FM, Smith NM, Owen S, Li C, Amjadi P, Green P, *et al*. Resting CD4+ effector memory T cells are precursors of bystander-activated effectors: a surrogate model of rheumatoid arthritis synovial T-cell function. *Arthritis Res Ther*. 2008; 10(2): R36.
- Brown GC, Borutaite V. Interactions between nitric oxide, oxygen, reactive oxygen species and reactive nitrogen species. *Biochem Soc Trans*. 2006; 34: 953-956.
- Brune K, Patrignani P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Pain Res*. 2015; 8: 105-118.
- Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*. 2014; 40(3): 315-327.
- Bustamante KGL, Lima ADF, Soares ML, Fiuza TS, Tresvenzol LMF, Bara MTF, *et al*. Evaluation of antimicrobial activity of crude ethanol extract from the bark of "sucupira branca" (*Pterodon emarginatus* Vogel) – Fabaceae. *Rev Bras Plantas Med*. 2010; 12: 341-345.
- Calabresi E, Petrelli F, Bonifacio AF, Puxeddu I, Alunno A. One year in review 2018: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2018; 36: 175-184.
- Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines phytotherapeutic agents. *Braz J Med Biol Res*. 2000; 33: 179-189.

- Calixto JB, Otuki MF, Santos ARS. Anti-inflammatory compounds of plant origin Part I Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF- κ B). *Planta Med.* 2003; 69: 973-983.
- Calixto JB, Siqueira Jr JM. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. *Gazeta Médica Bahia.* 2008; 78: 98-106.
- Calixto NO, Silva MCC, Gayer CRM, Coelho MGP, Paes MC, Todeschini AR. Antiplatelet activity of geranylgeraniol isolated from *Pterodon pubescens* fruit oil is mediated by inhibition of Cyclooxygenase-1. *Planta Med.* 2007; 73: 480-483.
- Campos AM, Craveiro AA, Teixeira TC. Óleo essencial das sementes de *Pterodon polygalaeflorus* Benth. In: Resumos da Reunião da Sociedade Brasileira de Química, PN-004, 1990.
- Campos AM, Silveira ER, Braz-Filho R, Teixeira TC. Diterpenoids from *Pterodon polygalaeflorus*. 1994; *Phytochemistry* 36: 403-406.
- Caplazi P, Baca M, Barck K, Carano RAD, DeVoss J, Lee WP, *et al.* Mouse models of rheumatoid arthritis. *Vet Pathol.* 2015; 52(5): 819-826.
- Cardoso CC, Pinto AC, Marques PR, Gayer CR, Afel MI, Coelho MG, Sabino KC. Suppression of T and B cell responses by *Pterodon pubescens* seeds ethanolic extract. *Pak J Biol Sci.* 2008; 1: 2308-2313.
- Carvalho JCT, Sertie JAA, Barbosa MVJ, Patricio KCM, Caputo LRG, Sarti SJ. *et al.* Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. *J Ethnopharmacol.* 1998; 64: 127-133.
- Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* 2018; 9(6): 7204-7218.
- Cho YG, Cho ML, Min SY, Kim HY. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2007; 7(1):65-70.
- Choi Y, Arron JR, Townsend MJ. Promising bone-related targets for rheumatoid arthritis therapy. *Nat Rev Rheumatol.* 2009; 5(10): 543-548.
- Choudhary N, Bhatt LK, Prabhavalkar KS. Experimental animal models for rheumatoid arthritis. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2018; 40(3):1 93-200.
- Clark R, Kupper T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol.* 2005; 125(4): 629-637.
- Coelho LP, Reis PA, Castro FL, Gayer CRM, Lopes CS, Silva MCC, *et al.* Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth seeds. *J Ethnopharm.* 2005; 98 (1-2): 109-116.
- Coelho MG, Sabino KC, Dalmau SR. Immunomodulatory effects of sucupira (*Pterodon pubescens*) seed infusion on collagen-induced arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2004; 22(2): 213-218.

- Coelho MGP, Marques PR, Gayer CRM, Vaz LCA, Nogueira Neto JF, Sabino KCC. Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *P pubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis. *J Ethnopharm.* 2001; 77(2-3): 159-164.
- Coelho-de-Souza AN, Dos-Santos CF, Lopes-Filho LN, Holanda FR, Oliveira AC, Gomes-Vasconcelos YA. Essential oil of *Pterodon polygalaeiflorus* Benth attenuates nociception in mice. *Braz J Med Biol Res.* 2018; 51(11): e7356.
- Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2001; 1: 1397-1406.
- Cooles FA, Isaacs JD, Anderson AE. Treg cells in rheumatoid arthritis: an update. *Curr Rheumatol Rep.* 2013; 15(9): 352.
- Cota BB, de Oliveira DM, de Siqueira EP, Souza-Fagundes EM, Pimenta AM, Santos DM, *et al.* New cassane diterpenes from *Caesalpinia echinata*. *Fitoterapia.* 2011; 82(7): 969-975.
- Cragg, GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1830(6): 3670-3695.
- Crofford LJ. Use of NSAIDs in treating patients with arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2013; 15(suppl 3) 3: S2.
- Cross M, Smith E, Hoy D, Carmona L, Wolfe F, Vos T, *et al.* The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis.* 2014; 73: 1316-1322.
- Cruvinel WM, Mesquita DJ, Araújo JA, Catelan TT, de Souza AW, da Silva NP, *et al.* Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Rev Bras Reumatol.* 2010; 50: 434-461.
- Cunha TM, Verri WA, Jr Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 1755-1760.
- Curtis JR, Xie F, Chen L, Baddley JW, Beukelman T, Saag KG, *et al.* The comparative risk of serious infections among rheumatoid arthritis patients starting or switching biological agents. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70(8): 1401-1406.
- Darrah E, Andrade F. Rheumatoid arthritis and citrullination. *Curr Opin Rheumatol.* 2018; 30(1): 72-78.
- Dawson-Saunders B, Trapp RG. *Basic & Clinical Biostatistics*, 2nd Ed, Appleton & Lange Ed, Connecticut, 1994.
- de Anda-Jáuregui G, Guo K, McGregor BA, Hur J. Exploration of the anti-inflammatory drug space through network pharmacology: applications for drug repurposing. *Front Physiol.* 2018; 9:151.
- de Aquino PE, Magalhães TR, Nicolau LA, Leal LK, de Aquino NC, Dos Santos SM, *et al.* The anti-inflammatory effects of N-methyl-(2S,4R)-trans-4-hydroxyl-proline from

Syderoxylon obtusifolium are related to its inhibition of TNF-alpha and inflammatory enzymes. *Phytomedicine*. 2017; 24: 14-23.

De Klerck B, Carpentier I, Lories RJ, Habraken Y, Piette J, Carmeliet G, *et al.* Enhanced osteoclast development in collagen-induced arthritis in interferon- γ receptor knock-out mice as related to increased splenic CD11b⁺ myelopoiesis. *Arthritis Res Ther*. 2004; (3): R220–R231.

De Omena MC, Bento ES, De Paula JE, Sant'ana AEG. Larvicidal Diterpenes from *Pterodon polygalaeflorus*. *Vector Borne Zoonot*. 2006; 6: 216-222.

Deane KD, Demoruelle MK, Kelmenson LB, Kuhn KA, Norris JM, Holers VM. Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2017; 31(1): 3-18.

Deane KD, O'Donnell CI, Hueber W, Majka DS, Lazar AA, Derber LA, *et al.* The number of elevated cytokines and chemokines in preclinical seropositive rheumatoid arthritis predicts time to diagnosis in an age-dependent manner. *Arthritis Rheum*. 2010; 62(11): 3161-3172.

Decker RS. Articular cartilage and joint development from embryogenesis to adulthood. *Semin Cell Dev Biol*. 2017; 62: 50-56.

Deng C, Liu J, Wang G, Ma L, Xie C, Wang X, *et al.* A novel small molecule, (E)-5-(2,4-di-tert-butyl-6-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl)-5'-methyl-7,7'-dimethoxy-4,4'-bibenzo[d][1,3]dioxole-5,5'-dicarboxylate (7k), alleviates the development of D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver failure by inhibiting macrophage infiltration and regulating cytokine expression. *J Pharmacol Exp Therapeut*. 2012; 341(1): 146-155.

Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2012; 2: 303-336.

Dirsch, VM, Stuppner, H, Vollmar, AM. The Griess assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts? *Planta Med*. 1998; 64: 423-426.

Dong R, Yuan J, Wu S, Huang J, Xu X, Wu Z, *et al.* Anti-inflammation furano diterpenoids from *Caesalpinia minax* Hance. 2015; *Phytochemistry* 117: 325-331.

Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol*. 2006; (4): 344-353.

Duarte ID, Ferreira-Alves DL, Veloso DP, Nakamura-Craig M. Evidence of the involvement of biogenic amines the antinociceptive effect of a vouacapan extracted from *Pterodon polygalaeflorus* Benth. *J Ethnopharmacol*. 1996; 55: 13-18.

DuarteI DG, Ferreira Alves DL, Nakamura-Craig M. Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia induced by vouacapan. *Life Sci*. 1992; 50: 891-897.

Dudics S, Langan D, Meka RR, Venkatesha SH, Berman BM, Che CT, *et al.* Natural products for the treatment of autoimmune arthritis: their mechanisms of action, targeted delivery, and interplay with the host microbiome. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(9): E2508.

- Dutra RC, Campos MM, Santos AR, Calixto JB. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res.* 2016; 112: 4-29.
- Dutra RC, Fava MB, Alves CC, Ferreira AP, Barbosa NR. Antiulcerogenic and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds. *J Pharm Pharmacol.* 2009; 61: 243-250.
- Dutra RC, Leite MN, Barbosa NR. Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* vogel seeds. *Int J Mol Sci.* 2008; 9(4): 606-14.
- Ensina LFC, Tanno LK, Garro LS, Rodrigues AT, Aun MV, Giavina-Bianchi P, *et al.* Long term use of therapeutic alternatives for non-steroidal anti-inflammatory drugs *Rev Bras Alerg Immunopatol.* 2009; 32: 237-239.
- Evangelista GL, Coelho-De-Souza AN, Santos CF, Cardoso JHL, Lopes EAB, Santos MV, *et al.* Essential oil of *Pterodon polygalaeiflorus* inhibits eletromechanical coupling on rat isolated trachea. *J Ethnopharm.* 2007; 109: 515-522.
- Fagg CW, Lughadha EN, Milliken W, Hind DJN, Brandão MGL. Useful Brazilian plants listed in the manuscripts and publications of the Scottish medic and naturalist George Gardner (1812–1849). *J Ethnopharmacol.* 2015; 161: 18-29.
- Falzon CC, Balabanova A. *Phytotherapy: An introduction to herbal medicine.* Prim Care Clin Office Pract. 2017; 44: 217-227.
- Farzaei MH, Farzaei F, Abdollahi M, Abbasabadi Z, Abdolghaffari AH, Mehraban B. A mechanistic review on medicinal plants used for rheumatoid arthritis in traditional Persian medicine. *J Pharm Pharmacol.* 2016; 68(10):1233-48.
- Fascio M, Gilbert B, Mors WB, Nishida T. Two new diterpenes from *Pterodon pubescens* Benth. *An Acad Bras Ciênc.* 1970; 42 (Suplem): 97-101.
- Fascio M, Mors WB, Gilbert B, Mahajan JR, Monteiro MB, Dos Santos Filho D, *et al.* Diterpenoids furans from *Pterodon pubescens* species *Phytochem.* 1976; 15: 201-203.
- Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity.* 2017; 46: 183-196.
- Fox AJS, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. 2009; *Sports Health* 1(6): 461-468.
- Frow EK, Reckless J, Grainger DJ. Tools for anti-inflammatory drug design: in vitro models of leukocyte migration. *Med Res Rev.* 2004; 24(3): 276-298.
- Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6: 521-534.
- Fullerton JN, Gilroy DW. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nat Rev Drug Discov.* 2016; 15(8):551-667.
- Gabriel SE. Why do people with rheumatoid arthritis still die prematurely? *An Rheum Dis.* 2008; 67(Suppl 3): 30-34.

- Galceran CB, Sertie JA, Lima CS, Carvalho JC. Anti-inflammatory and analgesic effects of 6 α , 7 β -dihydroxy-vouacapa-17 β -oic acid isolated from *Pterodon emarginatus*. *Inflammapharmacol.* 19: 139-143, 2011.
- Garcia X, Stein F. Nitric oxide. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2016; 7: 55-57, 2006.
- Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de histologia em cores.* 1^a ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan; 2003.
- Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova.* 2007; 30: 374-381.
- Gomes E, Cardoso MF, Praça F, Gomes L, Mariño E, Demoly P. Self-reported drug allergy in a general adult Portuguese population. *Cli Exp Allergy.* 2004; 34: 1597-1601.
- González Y, Doens D, Santamaría R, Ramos M, Restrepo CM, de Arruda LB, *et al.* A pseudopterane diterpene isolated from the octocoral *Pseudopterogorgia acerosa* inhibits the inflammatory response mediated by TLR-ligands and TNF-alpha in macrophages. *PloS One.* 2013; 8(12): e84107.
- Grando R, Souza VH, Monteiro KM, Sousa IMO, Queiroz NCA, Carvalho JE, *et al.* Comparison of standardized dichloromethane with aqueous *Pterodon pubescens* Benth fruit extracts on antinociceptive and anti-inflammatory activity. *J Braz Chem Soc.* 2017; 28(3): 455-464.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126: 131-138.
- Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1987; 30: 1205-1213.
- Guo Q, Wang Y, Xu D, Nossent J, Pavlos NJ, Xu J. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Res.* 2018; 6: 15.
- Gurib-Fakim A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med.* 2006; 27: 1-93.
- Guzik TJ, Korbust R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* 2003; 54: 469-487.
- Hamidzadeh K, Christensen SM, Dalby E, Chandrasekaran P, Mosser DM. Macrophages and the recovery from acute and chronic inflammation. *Annu Rev Physiol.* 2017; 79: 567-592.
- Hansen D, Haraguchi M, Alonso A. Pharmaceutical properties of sucupira (*Pterodon spp*). *Braz J Pharm Sci.* 2010; 46: 607-616.
- Henriques MGMO, Silva PMR, Martins MA, Flores CA, Cunha FQ, Assreuy Filho J, *et al.* Mouse paw oedema A new model for inflammation? *Braz J Med Biol Res.* 1987; 20: 243-249.

Hitchon CA, El-Gabalawy HS. The Synovium in rheumatoid arthritis. *Open Rheumatol J*. 2011; 5: 107-114.

Holers VM. Autoimmunity to citrullinated proteins and the initiation of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Immunol*. 2013; 25(6): 728-735.

Holmdahl R, Bockermann R, Bäcklund J, Yamada H. The molecular pathogenesis of collagen-induced arthritis in mice - a model for rheumatoid arthritis. *Ageing Res Rev*. 2002; 1(1): 135-147.

Hoscheid J, Cardoso MLC. Sucupira as a potential plant for arthritis treatment and other diseases. *Arthritis*. 2015: 379459.

Hulkower KI, Herber RL. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. *Pharmaceutics*. 2011; 3(1): 107-124.

Hulkower KI, Herber RL. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. *Pharmaceutics*. 2011;3(1): 107-124.

Hurtado, M G , Esquivel, F E A , García, G R , Pacheco, M M M , Madrigal, R M E , Bolaños, T P , Hernández, J L S , Gutiérrez, H A G , Rojas, C M C G , Nathan, P J , Rio, R E
Cassane diterpenes from *Caesalpinia platyloba* *Phytochemistry* 96, 397-403, 2013

Innala L, Sjöberg C, Möller B, Ljung L, Smedby T, Södergren A, *et al*. Co-morbidity in patients with early rheumatoid arthritis - inflammation matters. *Arthritis Res Ther*. 2016; 18:33.

Iwanaga T, Shikich IM, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol*. 2000; 63: 17-31.

Jacobson JA, Girish G, Jiang Y, Resnick D. Radiographic evaluation of arthritis: inflammatory conditions. *Radiology*. 2008; 248(2): 378-389.

Jiang RW, Ma SC, But PPH, Mak TCW. New antiviral cassane furano diterpenes from *Caesalpinia minax*. *J Nat Prod*. 2001; 64(10): 1266-1272.

Kadowaki KM, Matsuno H, Tsuji H, Tunru I. CD4+ T cells from collagen-induced arthritic mice are essential to transfer arthritis into severe combined immunodeficient mice. *Clin Exp Immunol*. 1994; 97: 212-218.

Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology*. 2005; 12: 167-181.

Kido T, Taniguchi M, Baba K. Diterpenoids from Amazonian crude drug of Fabaceae. *Chem Pharm Bull*. 2003; 51(2): 207-208.

Kim TH, Li H, Wu Q, Lee HJ, Ryu JH. A new labdane diterpenoid with anti-inflammatory activity from *Thuja orientalis*. *J Ethnopharmacol*. 2013; 146(3): 760-767.

Kinne RW, Bräuer R, Stuhlmüller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2000;2(3): 189-202.

- Klareskog L, Malmstrom V, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Semin Immunol.* 2011; 23: 92-98.
- Klein K, Gay S. Epigenetics in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2015; 27 (1): 76-82.
- Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug Discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4(3): 206-220.
- Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13:159-175.
- Kourilovitch M, Galarza-Maldonado C, Ortiz-Prado E. Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 2014; 48-49: 26-30.
- Ku CM, Lin JY. Anti-inflammatory effects of 27 selected terpenoid compounds tested through modulating Th1/Th2 cytokine secretion profiles using murine primary splenocytes. *Food Chem.* 2013; 141: 1104-1113.
- Kumar P, Banik S. Pharmacotherapy options in rheumatoid arthritis. *Clin Med. Insights Arthritis Musculoskelet Disord.* 2013; 6: 35-43.
- Kunkel EJ, Ley K. Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. Circ Res.* 1996; 79: 1196-1204.
- Kwon OG, Ku SK, An HD, Lee YJ. The effects of Platycodin D, a saponin purified from Platycodi Radix, on collagen-induced DBA/1J mouse rheumatoid arthritis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014: ID954508.
- Lawrance T, Gilroy DW. Chronic inflammation: a failure of resolution? *Int J Exp Pathol.* 2007; 88: 85-94.
- Leal LKAM, Ferreira AAG, Bezerra GA, Matos FJA, Viana GSB. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *J Ethnopharmacol.* 2000; 70: 151-159.
- Leal NRF. Estudo do potencial anti-inflamatório e antiartrítico de *Pterodon polygalaeflorus* e de seus mecanismos de ação [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2015.
- Leal NRF, Vigliano MV, Pinto FA, de Sousa TV, Velozo LSM, Sabino KCC, *et al.* Anti-inflammatory effect of diterpenes-enriched fractions from *Pterodon polygalaeflorus* through inhibition of macrophage migration and cytokine production. *J Pharm Pharmacol.* 2018; 70(6): 808-820.
- Lee M, Kim SH, Lee HK, Cho Y, Kang J, Sung SH. Ent-kaurane and ent-pimarane diterpenes from *Siegesbeckia pubescens* inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV2 microglia. *Biol Pharm Bull.* 2013; 37(1): 152-157.

- Lee YC, Kim SH, Roh SS, Choi HY, Seo YB. Suppressive effects of *Chelidonium majus* methanol extract in knee joint, regional lymph nodes, and spleen on collagen-induced arthritis in mice. *J Ethnopharmacol.* 2007; 112(1): 40-48.
- Leonhardt V, Leal-Cardoso JH, Lahlou S, Albuquerque AAC, Porto RS, Celedônio NR, *et al.* Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent β -caryophyllene on rat isolated ileum. *Fundam Clin Pharm.* 2010; 24: 749-758.
- Levin DE, Hollstein M, Christman MF, Schwiers EA, Ames BN. A new Salmonella tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1982; 79: 7445-7449.
- Lian L, Li XB, Yuan JZ, Cheng L, Wu ZH, Gao HY. Two new diterpenes from the seeds of *Caesalpinia minax* Hance. *J Asian Nat Prod Res.* 2015; 17(9): 893-899.
- Liang CC, Park AY, Guan JL. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro.* *Nature Protocols.* 2007; 2: 329-333.
- Lioté F, Boval-Boizard B, Weill D, Kuntz D, Wautier JL. Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: increased monocyte adhesiveness, integrin expression, and cytokine release. *Clin Exp Immunol.* 1996; 106(1): 13-19.
- Lorton D, Lubahn C, Felten SY, Bellinger D. Norepinephrine content in primary and secondary lymphoid organs is altered in rats with adjuvant-induced arthritis. *Mech Ageing Dev.* 1997; 94(1-3): 145-163.
- Lucetti DL, Lucetti EC, Bandeira MA, Veras HN, Silva AH, Leal LK, *et al.* Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart). *Plumel J Inflamm.* 2010; 7: 60.
- Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4⁺T Cells: Differentiation and Functions. *Clin Dev Immunol.* 2012; 925135.
- Mahajan JR, Monteiro MB. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* Vog *J Chem Soc Perkin Trans I* 5: 520-525, 1973
- Mahajan, J R , Monteiro, MB. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* Vog *An Acad Brasil Ciênc.* 1970; 42 (Suplem): 103-106.
- Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJ, Eklund A, *et al.* Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67, 1488-1492.
- Mantovani, A Cancer: inflammation by remote control *Nature* 435: 752-753, 2005
- Marques DD, Machado MIL, Carvalho MG, Meleira LAC, Braz-Filho R. Isoflavonoids and triterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. *J Braz Chem Soc.* 1998; 9: 295-301.
- Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin, Immunol.* 2018; 14(Suppl 2): 49.

Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime*. 2014; Rep 6: 13.

Martino T, Pereira MF, Gayer CR, Dalmau SR, Coelho MG, Sabino KC. Antitumor screening of *Pterodon pubescens* terpenic fraction indicates high sensitivity for lymphocytic leukemia cells. *Nat Prod Commun*. 2014; 9: 1547-1551.

McInnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis *Lancet*. 2017; 389: 2328-2337.

Medzhitov R. Inflammation 2010: new Adventures of an Old Flame. *Cell*. 2010; 140: 771-776.

Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008; 454: 428-435.

Mendes FN, Silveira ER. Fatty acids, sesqui- and diterpenoids from seeds of *Dipteryx lacunifera*. *Phytochemistry*. 1994; 35, 1499-1503.

Mendes VS, Sant'Anna JB, Oliveira SCC, Maldonado IR, Machado ER. Inhibitory effects of *Pterodon emarginatus* bean oil and extract on *Staphylococcus aureus*. *Pharmacog Res*. 2017; 9(4): 348-353.

Menna-Barreto RF, Laranja GA, Silva MC, Coelho MG, Paes MC, Oliveira MM, *et al*. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. *Parasitol Res*. 2008; 103:111-117.

Michael B, Yano B, Sellers RS, Perry R, Morton D, Roome N, *et al*. Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: A review of regulatory guidelines and a survey of current practices. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(5): 742-750.

Ministério do Meio Ambiente, 2017. Biomas brasileiros. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas>> Acesso em: jan, 2019.

Mitroulis I, Alexaki VI, Kourtzelis I, Ziogas A, Hajishengallis G, Chavakis T. Leukocyte integrins: Role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacol Ther*. 2015; 147: 123-135.

Moreira LQ, Vilela FC, Orlandi L, Dias DF, Santos ALA, Da Silva MA, *et al*. Anti-inflammatory effect of extract and fractions from the leaves of *Byrsonima intermedia* A Juss in rats. *J Ethnopharmacol*. 2011; 138:610-615.

Morris CJ. Carrageenan paw edema in the rat and mouse. *Protocols Methods Mol Biol*; 2003; 225:115-21.

Mors WB, Santos Filho MF, Monteiro HJ, Guilbert B. Chemoprophylactic agent in schistosomiasis: 14, 15-Epoxygeranylgeraniol. *Science*; 1967; 157: 950-951.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol*. 1983; Methods 65: 55-63.

- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986; 136(7):2348-57.
- Mota LMH, Cruz BA, Brenola CV, Pereira IA, Rezende-Fronza LS, Bertolo MB, *et al*. Guidelines for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol*. 2013; 53(2): 141-157.
- Muller S, Radic M. Citrullinated autoantigens: from diagnostic markers to pathogenetic mechanisms. *Clin Rev AllergyImmunol*. 2015; 49: 232-239.
- Müller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap. T Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. *Synovial fibroblasts Arthritis Res Ther*. 2007; 9(6): 223.
- Mushtaq S, Abbasi BH, Uzair B, Abbasi R. Natural products as reservoirs of novel therapeutic agents. *EXCLI J*. 2018; 17: 420-451.
- Nagy G, Koncz A, Talarico T, Fernandez D, Ersek B, Buzás E, *et al*. Central role of nitric oxide in pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2010; 12 (3): 210.
- Negri G, Mattei R, Mendes FR. Antinociceptive activity of the HPLC- and MS-standardized hydroethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel leaves. *Phytomedicine*. 2004; 21: 1062-1069.
- Netea MG, Balkwill F, Chonchol M, Cominelli F, Donath MY, Giamarellos-Bourboulis E J, *et al*. A guiding map for inflammation. *Nat Immunol*. 2017; 18(8): 826-831.
- Neto JJ. Contribuição ao estudo farmacognóstico dos frutos de *Pterodon pubescens* (Bentham) Bentham. Parte III – Identificação cromatográfica em fase gasosa, química e ação microbiológica do óleo do fruto. *Rev Fac Farm Odont Araraq*. 1976; 10: 317-327.
- Nevius E, Gomes AC, Pereira JP. A comprehensive review of inflammatory cell migration in rheumatoid arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016; 51(1): 59-78.
- Newbould BB. Lymphatic drainage and adjuvant-induced arthritis in rats. *Br J Exp Pathol*. 1964; 45(4): 375-383.
- Newton K, Dixit VM. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012; 4(3): a006049.
- Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, *et al*. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum*. 2004; 50(2):380-6.
- Nirogi R, Goyal VK, Jana S, Pandey S, Gothi A. What suits best for organ weight analysis: review of relationship between organ weight and body/brain weight for rodent toxicity studies. *J Pharm Sci Res*. 2014; 5(4): 1525-1532.
- Nonato FR, Nogueira TMO, Barros TAA, Lucchese AM, Oliveira CEC, Dos Santos RR, *et al*. Antinociceptive and antiinflammatory activities of *Adiantum latifolium* Lam: Evidence for a role of IL-1 β inhibition. *J Ethnopharmacol*. 2011; 136: 518-524.

- Nunan EA. Estudo da atividade anti-inflamatória de furano-diterpeno isolados de *Pterodon polygalaeflorus* Benth e de alguns de seus derivados [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federa de Minas Gerais, 1985.
- Nunan EA, Carvalho MG, Pilo-Veloso D, Turchetti-Maia RMM, Ferreira Alves DL. Furane diterpenes with anti- and proinflammatory activity. *Braz J Med Res.* 1982; 15: 450.
- Odalo JO, Joseph CC, Nkunya MHH, Sattler I, Lange C, Dahse HM, *et al.* Cytotoxic, anti-proliferative and antimicrobial furanoditerpenoids from *Stuhlmania moavi* *Phytochemistry* 70, 2047-2052, 2009
- Ogawa K, Aoki I, Sashida Y. Caesaljinin, a cassane diterpenoid from *Caesalpinia decapetala* var *Japonica*. *Phytochemistry.* 1992; 31(8): 2897-2898.
- Okamoto K, Nakashima T, Shinohara M, Negishi-Koga T, Komatsu N, *et al.* Osteoimmunology: the conceptual framework unifying the immune and skeletal systems. *Physiol Rev.* 2017; 97(4): 1295-1349.
- Oliveira AEMFM, Duarte JL, Amado JRR, Cruz RAS, Rocha CF, Souto RNP, *et al.* Development of a Larvicidal Nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel Oil. *PlosOne.* 2016; 1: e0145835.
- Oliveira LAR, Oliveira GAR, Borges LL, Bara MTF, Silveira D. Vouacapane diterpenoids isolated from *Pterodon* and their biological activities. *Rev Brasil Farmacog.* 2017; 27: 663–672.
- Ospelt C. Synovial fibroblasts in 2017. *RMD Open.* 2017; 3(2): e000471.
- Pan MH, Lai CS, Ho CT. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Funct.* 2010; 1: 15-31.
- Pastoureau PC, Hunziker EB, Pelletier JP. Cartilage, bone and synovial histomorphometry in animal models of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2010; 18(Suppl 3): S106-112.
- Pereira MF, Martino T, Dalmau SR, Albano MR, Férézou JP, Costa S, *et al.* Terpenic subfraction of *Pterodon pubescens* induces apoptosis of K562 leukemic cells by modulating gene expression. *Oncol Rep.* 2011; 1: 215-221.
- Pereira MF, Martino T, Dalmau SR, Paes MC, Barja-Fidalgo C, Albano RM. Terpenic fraction of *Pterodon pubescens* inhibits NF- κ B and ERK 1/2 activation and deregulates BMC Complem *Alternat Med* 12:231-238, 2012
- Pereira MF, Simão TA, Dalmau SR, Albano MR, Coelho MGPC, Sabino KCC. *Pterodon pubescens* seed extract induces the cell cycle arrest of leukemic cells by deregulation cyclin D1 and E2 mRNA Levels. *Oncol Lett.* 2010; 1: 533-536.
- Peres LEP. Metabolismo secundário das plantas. Acesso em jun, 2016. Disponível em: <<http://www.oleosessenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas>>
- Petri B, Phillipson M, Kubes P. The physiology of leukocyte recruitment: an *in vivo* perspective. *J Immunol.* 2008; 180: 6439-6446.

Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacog Rev.* 2012; 6: 1-5.

Pimenta ATA, Santiago GMP, Ângela MC, Arriaga AMC, Menezes GHA, Bezerra SB. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. *Rev Bras Farmacogn.* 2006; 16: 501-505.

Pinto FA, Vigliano MV, Leal NRF, Silva GP, Marques PR, Velozo, LSM, *et al.* Phytochemical and pharmacological analysis of *Pterodon polygalaeflorus* extracts *Pharmacologyonline.* 2013; 3: 56-70.

Pio Correa M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Vol III Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Rio de Janeiro p 129, 1975.

Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 803-815.

Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, Cirino G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Brit J Pharmacol.* 2004; 142: 331-338.

Prasad S, Aggarwal BB. Chronic diseases caused by chronic inflammation require chronic treatment: anti-inflammatory role of dietary spices. *J Clin Cell Immunol.* 2014; 5: 4.

Proebstl D, Voisin MB, Woodfin A, Whiteford J, D'acquisto F, Jones GE, *et al.* Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls *in vivo*. *J Exp Med.* 2012; 209: 1219-1234.

Pudhom K, Sommit D, Suwankitti N, Petsom A. Cassane Furano diterpenoids from the Seed Kernels of *Caesalpinia bonduc* from Thailand. *J Nat Prod.* 2007; 70(9): 1542-1544.

Puglisi MA, Cenciarelli C, Tesori V, Cappellari M, Martini M, Di Francesco AM, *et al.* High nitric oxide production, secondary to inducible nitric oxide synthase expression, is essential for regulation of the tumour-initiating properties of colon cancer stem cells. *J Pathol.* 2015; 236: 479-490.

Pushpangadan P, Ijini TP, George V. Plant based anti-inflammatory secondary metabolites. *Ann Phytomed.* 2015; 4: 17-36.

Rabelo AS, Oliveira ID, Guimarães AG, Quintans JS, Prata AP, Gelain DP, *et al.* Antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract from *Remirea maritima* (Cyperaceae). *J Ethnopharmacol.* 2013; 145(1): 11-17.

Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, Slowikowski K, Fonseka CY, Liu Y, *et al.* Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature.* 2017; 542(7639): 110-114.

Rates SM. Plants as source of drugs. *Toxicon.* 2001; 39(5):603-13.

Rein P, Mueller RB. Treatment with biologicals in rheumatoid arthritis: an overview. *Rheumatol Ther.* 2017; 4(2):247-261.

- Roberts CA, Dickinson AK, Taams LS. The interplay between monocytes/macrophages and CD4(+) T cell subsets in rheumatoid arthritis. *Front Immunol.* 2015; 6: 571.
- Rocha ACC, Fernandes ES, Quintão NLM, Campos MM, Calixto JB. Relevance of tumour necrosis factor- α for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. *Br J Pharmacol.* 2006; 148: 688-695.
- Romo MR, Perez-Martinez D, Ferrer CC. Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology.* 2016; 48: 125-139.
- Rosloniec EF, Cremer M, Kang AH, Myers LK, Brand DD. Collagen-Induced Arthritis. *Curr Protoc Immunol.* 2010; 89(1): 15 5 1-15 5 25.
- Rottman JB. *Key role of chemokines and chemokine receptors in inflammation, immunity, neoplasia, and infectious disease.* *Vet Pathol.* 1999; 36: 357–367.
- Ryan GB, Majno G. Acute inflammation. A review. *Am J Pathol.* 1977; 86: 183-276.
- Sabino KCC, Castro FA, Oliveira JCR, Dalmau SRA, Coelho MGP. Successful therapy of collagen-induced arthritis in mice with a hydroalcoholic extract of seeds of *Pterodon pubescens*. *Phytother Res.* 1999b; 13:613-615.
- Sabino KCC, Gayer CRM, Vaz LCA, Santos LRL, Felzeszwalb I, Coelho MGP. *In vitro* and *in vivo* toxicological studies of the *Pterodon pubescens* seed oil. *Toxicol Lett.* 1999a; 108: 27-35.
- Sadeghi H, Mostafazadeh M, Sadeghi H, Naderian M, Barmak MJ, Talebianpoor MS, *et al.* In vivo anti-inflammatory properties of aerial parts of *Nasturtium officinale* *Pharm Biol.* 2014; 52(2): 169-174.
- Sakthivel KM, Guruvayoorappan C. *Acacia ferruginea* inhibits inflammation by regulating inflammatory iNOS and COX-2. *J Immunotoxicol.* 2016; 13(1): 127-135.
- Sansbury BE, Spite M. Resolution of Acute Inflammation and the Role of Resolvins in Immunity, Thrombosis, and Vascular Biology. *Circ Res.* 2016; 119(1):113-30.
- Santos AP, Zatta DT, Moraes WF, Bara MTF, Ferri PH, Silva MRR, Paula JR. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. *Braz J Pharmacog.* 2010; 20(6): 891-896.
- Saqib U, Sarkar S, Suk K, Mohammad O, Baig MS, Savai R. Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. *Oncotarget.* 2018; 9(25): 17937-17950.
- Schett G, Neurath MF. Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts. *Nat Commun.* 2018; 9(1): 3261.
- Schmitz N, Lavery S, Kraus VB, Aigner T. Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010; 18 Suppl 3:S113-116.
- Serhan CN. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation. *Am J Pathol.* 2010; 177(4): 1576-1591.

- Serra MB, Barroso WA, da Silva NN, Silva SND, Borges ACR, Abreu IC, Borges MODR. From inflammation to current and alternative therapies involved in wound healing. *Int J Inflam*. 2017; 340:6215.
- Shen B. A new golden age of natural products drug discovery. *Cell*. 2015; 163(6): 1297-1300.
- Shen CY, Zhang TT, Zhang WL, Jiang JG. Anti-inflammatory activities of essential oil isolated from the calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. *Food Funct*. 2016; 7: 4451-4459.
- Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2004; 8: 385-405.
- Shreshtha S, Sharma P, Kumar P, Sharma R, Singh SP. Nitric Oxide: It's role in immunity. *J Clin Diagn Res*. 2018; 12(7): 1-5.
- Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2002; 4(3): S265-72.
- Silva JC, Araújo CS, Lima-Saraiva SRG, Oliveira-Junior RG, Diniz TC, Wanderley CWS, *et al*. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract of *Annonavepretorum* Mart (Annonaceae) in rodents. *BMC Complem Altern Med*. 2015; 15: 197.
- Silva MC, Gayer CR, Lopes CS, Calixto NO, Reis PA, Passaes CP, *et al*. Acute and topic antiedematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. *J Pharm Pharmacol*. 2004; 56: 135-141.
- Sliwinska-Stanczyk P, Pazdur J, Ziolkowska M, Jaworski J, Kaminska-Tchorzewska E, Lacki JK. The effect of methylprednisolone on proliferation of PBMCs obtained from steroid-sensitive and steroid-resistant rheumatoid arthritis patients. *Scand J Rheumatol*. 2007; 36(3):167-71.
- Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, *et al*. Rheumatoid arthritis *Nature Reviews Disease Primers*. 2018; 4: 18001.
- Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016; 388: 2023-38.
- Sokka T, Kautiainen H, Pincus T, Verstappen SM, Aggarwal A, Alten R, *et al*. Work disability remains a major problem in rheumatoid arthritis in the 2000s: data from 32 countries in the QUEST-RA study. *Arthritis Res Ther*. 2010; 12: R42, 2010
- Souza-Moreira, T M , Salgado, H R N , Pietro, R C L R O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais *Rev Bras Farmacog* 20: 435-440.
- Spies CM, Strehl C, Goes MC, Bijlsma JW, Buttgereit F. Glucocorticoids *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2011; 25: 891-900.
- Spindola HM, Carvalho JE, Ruiz ALTG, Rodrigues RAF, Denny C, Sousa IMO, *et al*. Furanditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth with selective in vitro anticancer activity for prostate cell line. *J Braz Chem Soc*. 2009; 20: 569-575.

- Spindola HM, Servat L, Denny C, Rodrigues RAF, Eberlin MN, Cabral E, *et al.* Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth. BMC Pharmacol. 2010; 10: 1-10.
- Stark K, Eckart A, Haidari S, Tirniceriu A, Lorenz M, Von Brühl ML, *et al.* Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and ‘instruct’ them with pattern- recognition and motility programs. Nature Immunol. 2013; 14: 41-51.
- Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM. Resolution of inflammation: what controls its onset? Front Immunol. 2016; 7: 160.
- Suszko A, Obmińska-Mrukowicz B. Influence of polysaccharide fractions isolated from *Caltha palustris* L on the cellular immune response in collagen-induced arthritis (CIA) in mice. A comparison with methotrexate. J Ethnopharmacol. 2013; 145: 109-117.
- Suzuki M, Konya C, Goronzy JJ, Weyand CM. Inhibitory CD8+ T cells in autoimmune disease. Hum Immunol. 2008; 69(11): 781-789.
- Taher YA, Samud AM, El-Taher FE, ben-Hussin G, Elmezogi JS, Al-Mehdawi BF, *et al.* Experimental evaluation of anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic activities of clove oil in mice. Libyan J Med. 2015; 10: 10 3402/ljm v10 28685.
- Tan EM, Smolen JS. Historical observations contributing insights on etiopathogenesis of rheumatoid arthritis and role of rheumatoid factor. J Exp Med. 2016; 213(10): 1937-1950.
- Thomford NE, Senthebane DA, Rowe A, Munro D, Seele P, Maroyi A, *et al.* Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery Int J Mol Sci. 2018; 19(6): 1578.
- Torrenegra R, Bauerei P, Achenbach H. Homoormosanine-type alkaloids from *Bowdichia virgiloides*. Phytochem. 1989; 28: 2219-2221.
- Través PG, Pimentel-Santillana M, Rico D, Rodriguez N, Miethke T, Castrillo A, *et al.* Anti-inflammatory actions of acanthoic acid-related diterpenes involve activation of the PI3K p110 γ/δ subunits and inhibition of NF- κ B. Chem Biol. 2014; 21(8): 955-966.
- Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007; 851: 51-70.
- Tu J, Hong W, Zhang P, Wang X, Körner H, Wei W. Ontology and function of fibroblast-like and macrophage-like synoviocytes: how do they talk to each other and can they be targeted for Rheumatoid Arthritis therapy? Front Immunol. 2018; 9: 1467, 2018.
- Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. J Allergy Clin Immunol. 2010; 125(2 Suppl 2): S24-32.
- Uehara EU, Shida BS, de Brito CA. Role of nitric oxide in immune responses against viruses: beyond microbicidal activity. Inflamm Res. 2015; 64(11), 845-852.
- Valentim DSS, Duarte JL, Oliveira AEMFM, Cruz RAS, Carvalho JCT, Conceição EC, *et al.* Nanoemulsion from essential oil of *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) shows *in vitro* efficacy

against monogeneans of *Colossoma macropomum* (Pisces: Serrasalmidae). J Fish Dis. 2018; 41(3): 443-449.

van Der Kooij SM, Le S, Cessie YPM, Goekoop-Ruiterman JK, De Vries-Bouwstra D, VanZeben PJSM, *et al.* Clinical and radiological efficacy of initial vs delayed treatment with infliximab plus methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2009; 68: 1153-1158.

van' Hof, R J , Ralston, S H Nitric oxide and bone Immunology 103(3): 255-261, 2001

van Vollenhoven, R F Sex differences in rheumatoid arthritis: more than meets the eye BMC Med 2009; 7: 12

van't Hof RJ, Armour KJ, Smith LM, Armour KE, Wei XQ, Liew FY, Ralston SH. Requirement of the inducible nitric oxide synthase pathway for IL-1-induced osteoclastic bone resorption. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97(14): 7993-7998.

Vasanthi P, Nalini G, Rajasekhar G. Role of tumor necrosis factor- alpha in rheumatoid arthritis: a review. APLAR J Rheumatol. 2007; 10: 270-274.

Vega RJS, Xolalpa NC, Alonso-Castro AJ, González CP, Ramos JP, Gutiérrez SP. Terpenes from natural products with potential anti-inflammatory activity. In: terpenes and terpenoids. Perveen, S , Areej Al-Taweel, A. IntechOpen. 2018; 4: 59-85.

Veloza LSM, Martino T, Vigliano MV, Pinto FA, Silva G, Justo MGA, *et al.* Anti-inflammatory and Immunoregulatory Properties of *Pterodon Polygalaeiflorus* Essential Oil. Am J Chin Med. 2013; 41: 545-563.

Wadekar JB, Sawant RL, Patel UB. Rheumatoid arthritis and herbal drugs: A review. J Phytopharmacol. 2015; 4(6): 311-318.

Wagner H, Bladt S. Plant Drug Analysis, A Thin-Layer Chromatography Atlas. 2. Ed. Berlin: Springer; 2001.

Wang S, Voisin MB, Larbi KY, Dangerfield J, Scheiermann C, Tran M, Maxwell PH, *et al.* Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. J Exp Med. 2006; 203: 1519-1532.

Wang Y, Kristan J, Hao L, Lenkoski CS, Shen Y, Matis LA. A role for complement in antibody-mediated inflammation: C5-deficient DBA/1 mice are resistant to collagen-induced arthritis. J Immunol. 2000; 64: 4340-4347.

Weill D, Setiadi H, Wautier MP, Guillausseau PJ, Liote F, Wautier JL. Pharmacological modulation of monocyte adhesion to endothelial cells. Clin Exp Immunol. 1996; 106(1): 13-19.

WHO. The World Medicines Situation. Traditional Medicines: Global Situation, Issues and Challenges. Geneva: WHO; 2011.

WHO. World Health Organization traditional medicine strategy: 2014-2023. WHO; 2013.

- Wilder RL, Remmers EF, Kawahito Y, Gulko PS, Cannon GW, Griffiths MM. Genetics factors regulating experimental arthritis in mice and rats. *Curr Dir Autoimmun.* 1999; 1: 121-16.
- Wilsdon TD, Hill CL. Managing the drug treatment of rheumatoid arthritis. *Aust Prescr.* 2017; 40(2): 51-58.
- Winter CA, Ristey EA, Nuss GW. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1962; 111: 544-547.
- Wongrakpanich S, Wongrakpanich A, Melhado K, Rangaswami J. A comprehensive review of non-steroidal anti-inflammatory drug use in the Elderly. *Aging Dis.* 2018; 9(1): 143–150.
- Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr Opin Hematol.* 2010. 17(1):9-17.
- Wooley PH, Luthra HS, Stuart JM, David CS. Type II collagen-induced arthritis in mice I Major histocompatibility complex (I Region) linkage and antibody correlates. *J Exp Med.* 1981; 154: 688-700.
- Yamanaka H. TNF as a target of inflammation in rheumatoid arthritis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2015; 15(2): 129-134.
- Yao C, Narumiya S. Prostaglandin-cytokine crosstalk in chronic inflammation. *Br J Pharmacol.* 2019; 176(3): 337-354.
- Yarwood A, Huizinga TWJ, Worthington J. The genetics of rheumatoid arthritis: risk and protection in different stages of the evolution of RA. *Rheumatology.* 2016; 55(2): 199-209.
- Yodsaoue O, Karalai C, Ponglimanont C, Tewtrakul S, Chantrapromma S. Potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Phytochemistry.* 2010; 71(14-15): 1756-1764.
- Zarbock A, Ley K, Mcever RP, Hidalgo A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood.* 2011; 118: 6743-6751.
- Zhu MZ, Chen GL, Wu JL, Li N, Liu ZH, Guo MQ. Recent development in mass spectrometry and its hyphenated techniques for the analysis of medicinal plants. *Phytochem Anal.* 2018; 29(4): 365-374.
- Zigmond SH, Hirsch JG. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. *J Exp Med.* 1973; 137: 387-410.