



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PEDRO HENRIQUE SIMÕES BEZERRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTI-INFLAMATÓRIO DE
FRAÇÕES DERIVADAS DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Costus spiralis*
NO TRATAMENTO DA ARTRITE**

Maceió – AL

2019

PEDRO HENRIQUE SIMÕES BEZERRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTI-INFLAMATÓRIO DE
FRAÇÕES DERIVADAS DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Costus spiralis*
NO TRATAMENTO DA ARTRITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Aparecida Campesatto.

Maceió – AL

2019



Ata de Exame de Dissertação

Aos **vinte e quatro dias** do mês de **setembro** de **2019**, às nove horas e trinta minutos, reuniu-se na Sala 206 do PPGCF/UFAL, a banca examinadora composta pelas doutoras, Eliane Aparecida Campesatto, Camila Braga Dornelas e Morgana Vital de Araújo, para o exame de dissertação intitulada: "**Avaliação do potencial anti-inflamatório de frações derivadas do extrato bruto de folhas *Costus spiralis* no tratamento da artrite**", elaborado pelo mestrando **Pedro Henrique Simões Bezerra**, regularmente matriculado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Nível Mestrado, sob a orientação da **Profa. Eliane Aparecida Campesatto**, que presidiu os trabalhos. Após apresentação por 48 minutos, o mestrando foi arguido pela banca. Em seguida, reunidas em sessão secreta às _____ horas, as examinadoras consideraram a dissertação

() **APROVADA** OU () **APROVADA COM RESTRIÇÃO**, emitindo o seguinte parecer: _____

aprovado pela banca mediante correções da banca examinadora

Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às _____ horas e eu, Daniel de Brito Ricarte, Secretário do PPGCF, Mestrado, lavrei a presente ata que será assinada pela Banca Examinadora e pelo Mestrando. **Maceió, 24 de setembro de 2019**

Presidente (Orientadora): Profa. Dra. Eliane Aparecida Campesatto

Eliane Campesatto

Examinadora Interna: Profa. Dra. Camila Braga Dornelas

Camila Braga Dornelas

Examinadora Externa: Dra. Morgana Vital de Araújo

Morgana Vital de Araújo

Mestrando: Pedro Henrique Simões Bezerra

Pedro Henrique Simões Bezerra

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

B574a Bezerra, Pedro Henrique Simões.

Avaliação do potencial citotóxico e anti-inflamatório de frações derivadas do extrato bruto das folhas de *Costus spiralis* no tratamento da artrite / Pedro Henrique Simões Bezerra. – 2020.

85 f. : il. : figs. ; graf. ; tabs. color.

Orientadora: Eliane Aparecida Campesatto.

Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 70-84.

Anexo: f. 85.

1. Artrite reumatóide. 2. Plantas medicinais. 3. *Costus spiralis*. 4. Anti-inflamatórios. 5. Analgésicos. I. Título.

CDU: 615.2: 633.88

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao nosso pai soberano, Deus, que pela minha fé me concede forças e motivos suficientes para romper qualquer barreira que a vida possa interpor pelo caminho, fazendo com que eu possa superar e evoluir sempre. Obrigado por me permitir errar, aprender e crescer, por Sua eterna compreensão e tolerância, por Seu infinito amor, pela Sua voz “invisível” que não me permitiu desistir. Ainda não descobri o que eu fiz para merecer tanto.

À Universidade Federal de Alagoas, pela oportunidade de realização de mais um objetivo em minha vida.

À minha mãe e rainha, Maria Nazaré Simões, pelo exemplo de força, amor e atenção em mim depositados. Ao meu pai e rei, Evaldo Pedro, pelo caráter de sempre e pela compreensão e apoio durante todo esse tempo. Por todas as lições de amor, companheirismo, amizade, caridade, dedicação, abnegação, compreensão e perdão que vocês me dão a cada novo dia. Sinto-me orgulhoso e privilegiado por ter pais tão especiais.

Amo-os! Vocês são a razão de todo e qualquer entendimento.

À minha irmã, Albanise Simões, pelo apoio e credibilidade. És essencial!

Aos meus familiares que fazem parte da minha vida, da minha história e das minhas conquistas.

À Profa. Dra. Eliane Aparecida Campesatto, minha orientadora, pela oportunidade de aprendizado, paciência e confiança. Minha eterna gratidão pela inspiração em seguir carreira na pesquisa e na docência!

Aos amigos Max Viana, Alyne Almeida, Suellen Albuquerque e Geraldo Neto, pelas horas de experimentos realizados juntos e pela paciência em me inserir no mundo da Farmacologia. Nenhuma forma de agradecimento seria suficiente para demonstrar tamanha gratidão.

Aos amigos do LaFI que me receberam muito bem (apesar de não ser da área) e me ensinaram tudo o que sei sobre pesquisa experimental: Anderson, Amanda, Kaycke, Zeca, Karol e Morgana. Cada um de vocês contribuiu significativamente para todas as etapas deste trabalho. Sem vocês nada disso seria possível.

Às amigas Daniela Procorio e Fernanda Alves, pela amizade e ajuda nos momentos importantes desta e de outras etapas da minha vida.

Ao amigo Jean Marcos, por sempre me ajudar. Pela solicitude e compreensão que lhe são peculiares.

Aos amigos de turma Wilma, Izaías, Juliana e Géssica, pelos momentos engraçados, tensos e de trocas, cada um com seu objeto de estudo.

Aos irmãos que Deus colocou em minha vida e escolhi para conviver: Deividy Barros apoio incondicional que me concedeu, por estar sempre presente partilhando de momentos bons e ruins e Bruno Umbelino, pelas conversas, partilhas, incentivos, conselhos e paciência cotidiana.

Aos professores do Mestrado pelo conhecimento adquirido e experiências compartilhadas.

À equipe do Biotério da Universidade Federal de Alagoas.

Aos animais utilizados durante os experimentos, meu respeito.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Minha gratidão àqueles que direta ou indiretamente, citados aqui ou não, colaboraram para a realização desta dissertação.

“Sê humilde para evitar o orgulho, mas voa alto para alcançar a sabedoria.”

Santo Agostinho

RESUMO

A artrite reumatoide é uma doença crônica auto-imune e caracteriza-se por apresentar inflamação, presença de auto-anticorpos e pela formação do tecido de granulação denominado *pannus*, que invade e destrói as estruturas próximas à articulação. Como alternativa para tratar esta comorbidade, as plantas medicinais têm um lugar de destaque, principalmente no Brasil, onde sua extensa biodiversidade contribui substancialmente para os estudos de novos medicamentos. Nesse contexto, plantas do gênero *Costus*, utilizadas pela medicina popular, têm sido descritas com diversas funções terapêuticas, como anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial citotóxico e anti-inflamatório de frações clorofórmio e metanol do extrato bruto das folhas de *Costus spiralis* no tratamento da artrite. Para isto, foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas, provenientes do Biotério Central da UFAL com aprovação pelo CEUA (protocolo nº 040/2018). Inicialmente, as frações clorofórmio de *C. spiralis* (FCCS) e metanol de *C. spiralis* (FMCS) foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular pelo método colorimétrico de *Metiltetrazolium* (MTT) para determinar a citotoxicidade, nas concentrações de 0,05, 0,5, 1,5, 5, 15, 50 e 100 µg/mL. A partir deste, foi observado que FCCS e FMCS nas concentrações testadas não demonstraram redução da viabilidade celular de forma estatisticamente significativa, assim como com o fármaco padrão, a dexametasona, quando comparados com o grupo controle. Para determinar o efeito do tratamento com a FCCS e FMCS sobre o desenvolvimento da artrite, foi administrada a dose de 100 mg/kg, v.o. durante sete dias a partir do dia 14 após a indução da artrite. O tratamento com FMCS não causou uma inibição estatisticamente significativa do aumento de volume da pata quando comparada ao controle positivo, durante os sete dias de tratamento. Por outro lado, a FCCS causou uma inibição estatisticamente significativa do aumento de volume da pata quando comparada ao controle positivo a partir do 19º dia. O fármaco padrão utilizado, dexametasona, foi capaz de inibir o aumento de volume da pata significativamente nos dias 18, 19, 20 e 21. O tratamento com a fração clorofórmica de *C. spiralis* foi capaz de reduzir o volume do edema de pata no ensaio de artrite. O tratamento com a FCCS de *C. spiralis* foi capaz de reduzir o volume do edema de pata no ensaio de artrite induzida por adjuvante completo de Freund. Os resultados obtidos neste trabalho dão suporte não somente à pesquisa com plantas medicinais, como também por novos fármacos analgésicos e anti-inflamatórios.

Palavras-chave: Artrite reumatóide. Plantas medicinais. *Costus spiralis*. Anti-inflamatórios. Analgésicos.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis is a chronic autoimmune disease and is exhibited by inflammation, the presence of self-attacks and the formation of granulation tissue called pannus, which invades and destroys structures external to the joint. As an alternative to treat this comorbidity, medicinal plants have a prominent place, especially in Brazil, where their great biodiversity is substantially affected for the study of new medicines. In this context, plants of the genus *Costus*, used by folk medicine, have been described with various therapeutic functions, such as antiinflammatory, analytical and antimicrobial. Therefore, the objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory potential of chloroform and methanol fractions of the raw extract of *Costus spiralis* leaves in the treatment of arthritis. Swiss mice, victims, access to the UFAL central vivarium with CEUA approval (protocol No. 040/2018) were used. Initially, as *C. spiralis* chloroform (FCCS) and *C. spiralis* methanol (FMCS) fractions, they were subjected to cell viability assays by the methyltetrazolium colorimetric method (MTT) to determine a cytotoxicity at the rates of 0,05, 0,5, 1,5, 5, 15, 50 and 100 µg / mL. From this, it was observed that FCCS and FMCS in the analyzes did not show statistically significant reduction in cell viability, as standard. dexamethasone when compared to the control group. To determine the effect of FCCS and FMCS treatment on the development of arthritis, a dose of 100 mg / kg, v.o. for seven days from day 14 after arthritis induction. FMCS treatment did not cause a statistically significant inhibition of paw volume increase when compared to the positive control during the seven days of treatment. On the other hand, FCCS caused a statistically significant inhibition of paw volume increase when compared to the positive control from day 19. The standard drug dexamethasone was able to significantly inhibit paw swelling on days 18, 19, 20 and 21. Treatment with the *C. spiralis* chloroform fraction was able to reduce the volume of paw edema in the trial. of arthritis. Treatment with *C. spiralis* FCCS was able to reduce the volume of paw edema in Freund's complete adjuvant-induced arthritis assay. The results obtained in this work support not only the research with medicinal plants, but also the search for new analgesic and anti-inflammatory drugs.

Keywords: Rheumatoid arthritis. Medicianis plants. *Costus spiralis*. Anti-inflammatory. Painkillers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Costus spiralis</i>	25
Figura 2 -	Representação esquemática de um nociceptor.....	31
Figura 3 -	Etapas de percepção da dor.....	33
Figura 4 -	Sinais característicos da inflamação.....	34
Figura 5 -	Mecanismo de recrutamento de leucócitos através do endotélio.....	36
Figura 6 -	Mecanismos celulares que envolvem a Artrite Reumatóide.....	47
Figura 7 -	Etapas do processo de extração da <i>C. spiralis</i>	54
Figura 8 -	Fracionamento do extrato bruto da <i>C. spiralis</i>	55
Figura 9-	Pata dos camundongos no ensaio de artrite induzida por adjuvante completo de Freund.....	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito da FCCS e FMCS no ensaio de MTT.....	62
Gráfico 2 – Efeito da FCCS e FMCS no ensaio de artrite induzida por adjuvante completo de Freund.....	64
Gráfico 3 – Média do peso do baço, estômago, fígado e rim dos animais submetidos ao tratamento com FCCS e FMCS no ensaio de artrite induzida por adjuvante completo de Freund.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos animais por grupo no ensaio de artrite induzida por Adjuvante Completo de Freund.....	59
Tabela 2 – Rendimento médio das frações da <i>C. spiralis</i> a partir de 3,0g de extrato bruto.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Artrite reumatóide
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CFA	Adjuvante completo de Freund
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CO₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsufóxido
e.p.m.	Erro padrão da média
g	Gramma
FCCS	Fração clorofórmio de <i>Costus spiralis</i>
FMCS	Fração metanólica de <i>Costus spiralis</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
IASP	Associação Internacional para o estudo da dor
ICBS	Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina 1
i.p.	Intraperitoneal
kg	Quilograma
LaFI	Laboratório de Farmacologia e Imunidade
LT	Leucotrienos
mg	Miligramma

min	Minutos
mL	Mililitro
NGF	Fator de crescimento neuronal
NaCl	Cloreto de Sódio
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator de ativação plaquetária
PG	Prostaglandinas
SNC	Sistema Nervoso Central
SiO₂	Sílica gel
SUS	Sistema Único de Saúde
TNF-α	Fator de necrose tumoral
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
v.o.	Via oral
vs	<i>Versus</i> (do latim, em oposição a)
°C	Grau Celsius
μl	Microlitros
μg	Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 JUSTIFICATIVA.....	20
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo geral.....	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
4.1 Plantas medicinais.....	22
4.2 <i>Costus spiralis</i> (Jacq) Roscoe.....	24
4.2.1 Aspectos botânicos.....	26
4.2.2 Aspectos etnofarmacológicos.....	27
4.2.3 Efeitos biológicos.....	28
4.3 Dor e nociceção.....	29
4.4 Inflamação.....	34
4.5 Recrutamento de leucócitos.....	35
4.6 Mediadores inflamatórios.....	37
4.6.1 Quimiocinas.....	38
4.6.2 Cininas.....	39
4.6.3 Histamina.....	39
4.6.4 Citocinas.....	40
4.6.5 Óxido nítrico.....	41

4.6.6 Mediadores derivados do sistema complemento.....	41
4.6.7 Hidroxitriptamina (5-HT).....	42
4.6.8 Metabólitos secundários do ácido araquidônico.....	43
4.7 Artrite Reumatóide: conceito e patogenia	44
4.7.1 Artrite induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA): histórico e caracterização.....	48
4.7.2 Indução.....	49
4.7.3 Vias de imunização em modelos experimentais.....	49
4.7.4 Curso da doença.....	50
4.7.5 Diagnóstico e tratamento.....	51
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	52
5.1 Tipo de estudo e Locais de realização.....	52
5.2 Material botânico.....	53
5.3 Preparo e obtenção das frações de <i>Costus spiralis</i>.....	53
5.4 Ensaios farmacológicos.....	56
5.4.1 Substâncias.....	56
5.4.2 Ensaio de viabilidade celular pelo método MTT.....	56
5.4.3 Animais.....	57
5.4.5 Padronização do modelo de indução de artrite.....	58
5.5 Análise Estatística.....	59

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
6.1 Preparo e obtenção das frações de <i>C. spiralis</i>	60
6.2 Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT	61
6.3 Ensaio de artrite induzida por adjuvante completo de Freund	63
7 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXO – Certidão de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFAL)	85

1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica auto-imune comum, que ocorre em todas as partes do mundo e em todas as etnias (BRANDÃO, 2010), com incidência de 40:100000 mulheres e de 18:100000 homens (BRASIL, 2017), com maior frequência entre a faixa etária de 30 a 50 anos de idade, sendo o motivo para esta diferença entre os sexos desconhecida, mas pressupõe-se estar relacionado com questões hormonais e funções imunológicas (CARVALHO et al., 2012).

Caracteriza-se por apresentar sinovite, presença de auto-anticorpos e pela formação do tecido de granulação denominado *pannus*, que invade e destrói as estruturas próximas à articulação, tais como a cartilagem articular, o osso subcondral, os tendões e os ligamentos (HANADA; YOSHIMURA, 2013). Em geral, esta afecção acomete grandes e pequenas articulações, de forma simétrica, em associação com manifestações sistêmicas, como rigidez matinal, fadiga e perda de peso, com um curso clínico flutuante, com períodos de melhora e exacerbação dos sintomas articulares (KHURANA, 2015).

O uso de medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais é a mais antiga forma de cuidados e prevenção à saúde do homem, tendo recebido inúmeras contribuições de vários cientistas, como Hipócrates, Chochinkei, Galeno e Avicena. Paracelsus foi o primeiro a conceituar a diferença entre veneno e remédio: “todas as substâncias são venenos, não há uma que não seja veneno. A posologia correta diferencia o veneno do remédio” (WAGNER, 2016).

O potencial brasileiro na área de fitoterápicos inclui cerca de 120 mil espécies, incluindo a grande maioria na região amazônica. Destas, a crença popular selecionou de duas mil espécies, as quais pertencem à medicina popular. Entretanto, somente cerca de 10% destas foram cientificamente investigadas vistas o aspectos químico e farmacológico (LEITE, 2012). Nota-se, pois, que há uma vasta disparidade entre a diversidade da flora medicinal e os esforços de pesquisa que visam estabelecer critérios etnofarmacológicos adequados (FERREIRA, 2010).

Dentro das abordagens atuais para pesquisa de novos agentes anti-inflamatórios eficazes e com maior segurança estão os produtos naturais de plantas de uso tradicional, que por sua vez, são fontes de diversas substâncias com potencial terapêutico. O uso popular de plantas medicinais é extremamente amplo, sendo bem reconhecidas suas

atividades estimulante, antidepressiva, anti-hipertensiva, calmante, sedativa, anti-inflamatória, entre outras (MEDZHITOV, 2008). Essa ampla atividade das plantas medicinais deve-se aos diferentes tipos de metabólitos secundários biossintetizados.

Vários desses metabólitos apresentaram atividade anti-inflamatória comprovada cientificamente (SIMÕES et al., 2014) e entre esses metabólitos destacam-se os flavonoides que, além da atividade anti-inflamatória, apresentam atividades antiaterosclerótica, antitumoral, antitrombogênica, antiosteoporótica e antiviral (NIJVELDT et al., 2011). A prospecção e o estudo de plantas medicinais de uso popular no tratamento de processos inflamatórios podem nos levar à descoberta de novos fármacos anti-inflamatórios com maiores eficácia e segurança que os anti-inflamatórios de uso corrente (GAUTAM; JACHAK, 2010).

Dentre as inúmeras plantas utilizadas tradicionalmente como anti-inflamatório, está a *Costus spiralis* (Costaceae), também conhecida como cana do brejo ou cana de macaco. Tal espécie tem sido utilizada pela medicina popular brasileira para o tratamento de nefrites, inflamações da uretra, infecções da bexiga, cálculos renais e aterosclerose (ANTUNES, 2010). Portanto, o objetivo desse estudo é avaliar o potencial anti-inflamatório de frações derivadas do extrato bruto das folhas de *C. spiralis* no tratamento da artrite.

2 JUSTIFICATIVA

O incentivo ao uso dos fitoterápicos tem como propósito prevenir, curar ou minimizar os sintomas das doenças, com um valor mais acessível à população e aos serviços públicos de saúde, quando comparados àqueles obtidos por síntese química, que, em geral, são mais caros, devido às patentes tecnológicas envolvidas (CORRÊA, 2014).

A utilização dos fitoterápicos e plantas medicinais permite a ampliação do acesso da população a opções terapêuticas, apresenta-se como importante instrumento para os profissionais da saúde, além de valorizar o conhecimento popular. Sendo considerada parte fundamental nas políticas públicas, a utilização destes métodos é recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), visto que 80% da população utiliza esse recurso nos seus cuidados básicos de saúde e cerca de 67% das espécies são originadas de países em desenvolvimento (BRASIL, 2006).

A espécie *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe é popularmente conhecida como cana do brejo ou cana de macaco. É uma espécie pertencente à família Costaceae e é popularmente usada para o tratamento de infecções urinárias, cálculos renais, infecções de garganta, ouvido e também como diurético (HABSAH, 2004).

Nesta perspectiva e considerando o elevado potencial antinociceptivo e anti-inflamatório da *C. spiralis*, utilizaremos na metodologia do presente estudo as frações clorofórmio (FCCS) e metanol (FMCS) obtidas a partir do extrato bruto das folhas desta planta, visando avaliar o potencial citotóxico e anti-inflamatório no tratamento da artrite em camundongos *Swiss* a partir do modelo de artrite induzida pelo adjuvante de Freund (SCHEMSKE, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial citotóxico e anti-inflamatório de frações derivadas do extrato bruto das folhas de *C. spiralis* no tratamento da artrite.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade das FCCS e FMCS do extrato bruto das folhas de *C. spiralis* pelo método de MTT;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória da FCCS e FMCS do extrato bruto das folhas de *C. spiralis* no modelo de artrite induzida por adjuvante de Freund.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Plantas medicinais

O termo fitoterapia deriva de duas palavras gregas: *phyton*, que significa planta e *therapeia*, que significa tratamento. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a fitoterapia, como medicina alternativa ou complementar, é um fenômeno social no mundo atual, caracterizado pelas suas inter-relações biológicas, sociais, culturais e econômicas. É um método de tratamento empregado em diversos tipos de patologias de forma barata e não agressiva, por meio de vegetais puros ou extratos dos vegetais, atuando na estimulação das defesas naturais do organismo (SCHNEIDER, 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) preceitua ainda como fitoterápicos os “produtos medicinais acabados e etiquetados, cujos ingredientes ativos são formados por partes aéreas ou subterrâneas de plantas, ou outro material vegetal, ou combinações destes, em estado bruto ou em formas de preparações vegetais (OMS, 2009).

A utilização de medicamentos compostos de ervas data do início da civilização, quando os curandeiros utilizavam uma grande quantidade de ervas com o objetivo de ajudar e até curar as enfermidades da época (FAGUNDES, 2013). Em meados dos anos 2600 a.C, já se registrava o uso de ervas para fins terapêuticos, no momento em que o imperador chinês, Sheng-Nung, listou cerca de 365 ervas utilizadas na cultura chinesa (HOLUB et al., 2013).

Hoje, cerca de 80% da população faz uso de plantas medicinais como método de tratamento para inúmeras patologias, o que tem aumentado o campo de pesquisa a respeito e gerado um mercado em torno de 50 bilhões de dólares nos últimos anos (CALIXTO, 2018). A ANVISA, em 2010, colocou em pauta uma tabela composta por mais de 60 tipos de fitoterápicos, detalhando o uso de cada um, destacando seus benefícios e efeitos adversos (CURY, 2010).

A utilização de plantas medicinais faz parte da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos desde 2006. Um dos objetivos da referida Política é a inserção da fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS) com segurança, uso racional, eficácia e qualidade. Apesar deste estímulo e da riqueza da flora, os estudos científicos são insuficientes (BRASIL, 2007).

O uso de plantas medicinais e fitoterápicos é fonte de inovação em saúde e amplia as opções terapêuticas do SUS (BRASIL, 2007). O uso de plantas medicinais pelas famílias tem por finalidade prevenir doenças, tratar e/ou aliviar sintomas. Cada grupo familiar ou comunidade possui um conhecimento próprio que é repassado entre as gerações e a utilização de plantas medicinais como forma de cuidado em saúde faz parte deste contexto (CEOLIN *et al.*, 2011).

No Brasil, especialmente na região Nordeste, o uso de plantas medicinais e preparações caseiras assumem importância fundamental no tratamento de patologias que afetam as populações de baixa renda, tendo em vista a deficiência da assistência médica, influência da transmissão oral dos hábitos culturais e a disponibilidade da flora. O país ocupa o primeiro lugar dentre os dezessete países mais ricos do mundo em biodiversidade e possui de 20 a 25% de todas as plantas e microrganismos existentes na terra (RATES, 2011).

A integração entre o conhecimento popular e o conhecimento científico é indispensável, onde o profissional de saúde participa deste processo contribuindo com as ciências da saúde, estimulando a autonomia dos indivíduos o conhecimento local e a diversidade de nomes que a população atribui a cada espécie, assim como direcionando o uso correto, formas de preparo e contraindicações (WONG, 2013).

Um dos maiores cuidados que devem ser difundidos sobre o uso de plantas medicinais é durante a gravidez, pois alguns constituintes podem ultrapassar a placenta e causar efeito teratogênico, embriotóxico e abortivo. Isso ocorre pelo fato de muitos acreditarem que produtos de origem vegetal não apresentam reação adversa ou efeitos tóxicos (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Apesar da biodiversidade e de políticas de incentivo à utilização de plantas medicinais na promoção à saúde, os estudos ainda são precários no Brasil. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas para enriquecer o conhecimento dos profissionais de saúde e da população, assegurando a eficácia dessa prática no SUS, garantindo a integralidade da assistência e a participação social (HARVEY, 2008).

4.2 *C. spiralis* (Jacq.) Roscoe

A família Costaceae era classificada como uma subfamília da grande família Zingiberaceae. Essa classificação baseava-se nas similaridades das estruturas florais entre as espécies das duas famílias. Tomlinson (1962) sugeriu que essas semelhanças poderiam indicar uma ancestralidade comum e propôs a elevação de Costaceae ao status de família independente, embasando sua proposta em diferenças morfológicas e anatômicas. A família Costaceae compreende quatro gêneros: *Costus*, *Monocostus*, *Dimerocostus* e *Tapeinochilos*. O gênero *Costus* foi dividido em quatro subgêneros: *Cheilocostus*, *Chamaecostus*, *Paracostus* e *Costus*.

O gênero *Costus* é o maior dentre os pertencentes à família *Costaceae*, das ordem das Zingiberales com 125-175 espécies de distribuição pantropical, mas a maioria de suas espécies ocorre nos Neotrópicos (ARAÚJO; OLIVEIRA, 2010). A maioria das espécies se desenvolve em ambientes quente e úmido, como as bordas das florestas e locais onde existem correntes de água (SALINAS; CLAVIJO; BETANCUR, 2010).

A *C. spiralis* (*Costaceae*) é uma espécie herbácea, nativa de mata, conhecida popularmente como canarana, canela-de-ema, cana-do-brejo, cana-de-macaco e gengibre-espiral (COSTA *et al.*, 2012) (Figura 1). A denominação cana-do-brejo inclui duas espécies: a *C. spiralis* e a *C. spicatus*, ambas com a mesma utilidade na medicina tradicional (GASPARRI, 2015).

Esta espécie é comumente utilizada como planta ornamental e na medicina popular no tratamento de diversas doenças, como por exemplo, infecções no trato urinário, pedras nos rins, controle da diabetes, artrite, assim como no tratamento da dor e de processos inflamatórios (CUNHA *et al.*, 2011).

O uso tradicional da *C. spiralis* no tratamento de doenças renais aliado à presença de flavonoides em suas folhas indica que o estudo fitoquímico biomonitorado da espécie possa resultar na identificação de substâncias bioativas com ação anti-inflamatória, potenciais candidatos para o desenvolvimento futuro de fármacos ou de marcadores para a obtenção de extratos padronizados visando a produção de fitoterápicos (PHILLIPSON, 2010).

Figura 1 – *C. spiralis*.



Fonte: MAAS; KAMER, 2011.

Outras espécies desse gênero, como é o caso da *C. speciosus*, também são utilizadas na medicina popular por possuírem algumas propriedades farmacológicas importantes no tratamento da dor e da inflamação (ARAÚJO, 2010; MEDEIROS; FONSECA; ANDREATA, 2014).

Em uma revisão sobre a espécie *C. speciosus*, várias propriedades farmacológicas são observadas na medicina popular, entre elas a ação anti-inflamatória a partir da infusão ou decocção de suas folhas (SRIVASTAVA et al., 2011). Outro trabalho demonstrou a ação anti-inflamatória na fração clorofórmica da *C. afer* que reduziu significativamente o edema de orelha, sugerindo que nesta fração existem metabólitos secundários responsáveis pela ação farmacológica (MOODY; OKWAGBE, 2013).

4.2.1 Aspectos botânicos

Apresenta 52 gêneros nos quais estão distribuídas cerca de 1.100 espécies. Uma gama destas são ervas que apresentam rizomas aromáticos e outras são células secretoras de óleos que são comumente utilizados de diversas formas. Os gêneros estão distribuídos em duas subfamílias, a saber (DI STASI; LIMA, 2012)

- Subfamília Zingiberoidae, que compreendem os gêneros *Zingiber*, *Alpinia*, *Hedychium*, *Curcuma*, *Renealmia* e *Riedelia*, as quais apresentam diversas espécies medicinais;
- Subfamília Costoidae, na qual se encontram as espécies dos gêneros *Costus*, especialmente a *spiralis* (Cana do brejo).

A família Costaceae é conhecida pelo seu valor medicinal. Está amplamente distribuída entre os trópicos, particularmente no Sudoeste da Ásia. Os seus membros constituem um importante recurso natural, oferecendo muitos produtos úteis para alimentos, especiarias, medicamentos, corantes, perfumes e estética (JANTAN et al., 2013).

A Índia é uma das regiões mais ricas e diversificadas no emprego e manipulação das Costaceae. A região Nordeste da Índia é a região onde há a maior concentração destas plantas, podendo ser encontrados 19 gêneros e 88 espécies (PRAKASH, 2005). Grande parcela dos membros pertencentes à Costaceae crescem na Índia em seu estado selvagem (TUSHAR et al., 2011).

É uma planta perene, rizomatosa, ereta, não ramificada, de 1 a 2m de altura, nativa em quase todo o Brasil, principalmente nas regiões da mata Atlântica e da Amazônia. Possui folhas alternas, membranáceas, dotadas de bainhas papiráceas, velutina, em ambas as faces, de 25 a 40 cm de comprimento por 6 a 10 cm de largura. Possui inflorescências em espigas terminais estrobiliformes, com grandes brácteas vistosas de cor vermelha, que protegem as flores de cor amarelada. Crescem em densidades extremamente baixas. A maioria tem ramos com inflorescências terminais que produzem apenas uma flor por dia, além de um período de floração estendido (KAY; SCHEMSKE, 2003).

O rizoma da *C. spiralis* é ramificado e carnosos e suas raízes são quase brancas. Suas hastes são quase eretas, quebradiças, carnosas, fibrosas e conservam a bainha das folhas antigas. O pecíolo é grosso e as folhas são espiraladas, invaginantes, obovadas ou elípticas com até 35cm de comprimento. Essas folhas são lisas, luzídias, verde escura na parte superior e mais clara na parte inferior, onde a nervura média é saliente (PIO CORREA, 2007).

Multiplica-se tanto por sementes, como por rizomas. É cultivada como ornamental, tanto para jardins, como para a produção de flor de corte. Suas folhas, hastes e rizomas são empregadas na medicina tradicional, principalmente na região Amazônica (LORENZI, 2012).

4.2.2 Aspectos etnofarmacológicos

Informações etnofarmacológicas registram o uso das raízes e rizomas como diurético e tônico, para facilitar ou aumentar o fluxo menstrual (emenagoga) e provocar transpiração (diaforético), enquanto o suco das hastes e folhas frescas diluídas em água é indicado contra gonorreia, sífilis, nefrite, picadas de insetos, problemas da bexiga e diabetes (TOWNSEND; MCKENZIE, 2005). Externamente a decoção é empregada para aliviar irritações vaginais, leucorreia e no tratamento de úlceras (BOORHEM e LAGE, 2009), enquanto na forma de cataplasma é empregada para desbridar feridas (BRITTO e SENNA-VALLE, 2011).

No Brasil, a *C. spiralis* é usada na medicina popular como diurético, analgésico para a bexiga e uretra, bem como para ajudar no processo de eliminação de cálculo renal (CRUZ, 2010). Na Mata Atlântica, a infusão das folhas é usada contra hipertensão e o decocto de suas folhas, contra diarreia. A infusão obtida dos colmos é usada contra hepatite e cólicas intestinais, no alívio de irritações vaginais e leucorreia (LIMA, 2012).

Nas regiões Norte e Centro-Oeste, a *C. spiralis* é empregada no tratamento do reumatismo (TRESVENZOL *et al.*, 2016). Com base no conhecimento empírico, a cana do brejo também atua como coadjuvante no tratamento do diabetes mellitus (VALLANCE; CHAN, 2019). Segundo Corrêa (2014), o suco das folhas dessa planta é eficaz contra a aterosclerose, atua como calmante e são usadas topicamente na resolução de abscessos.

4.2.3 Efeitos biológicos

Um estudo publicado por Silva e colaboradores (2010), mostrou que das folhas da *C. spiralis* foi isolado e descrito um novo diglicosídeo flavônico, o 3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona 3-*O*-neohesperidosídeo. Já eram conhecidos a tamarixetina 3-*O*-neohesperidosídeo, canferídeo 3-*O*-neohesperidosídeo, quercetina 3-*O*-neohesperidosídeo e o canferol 3-*O*-neohesperidosídeo. Estes glicosídeos flavônicos demonstraram atividade inibidora para a produção de óxido nítrico em macrófagos ativados, bem como atividade anti-inflamatória (SILVA *et al.*, 2010).

Dos rizomas da *C. spiralis* foram isoladas duas novas saponinas esteroidais, a (3 β , 25 R)-26-(β -D-glucopiranosiloxe)-22-hidroxi-furose-5-3-yl-*O*-D-apio- β -D-furanosil-(1,2)-*O*[α -L-ramnopiranosil-(1,4)]- β -D-furanosil-(1,4)-*O*[α -L-ramnopiranosil-(1,2)]- β -D-lucopiranoside. A partir de então, foram avaliadas suas atividades farmacológicas. Utilizando a dose de 100mg/kg, estas saponinas foram capazes de inibir o aumento da permeabilidade vascular, sugerindo que podem ser agentes terapêuticos para situações que envolvem desordem inflamatória, o que justifica o uso da *C. spiralis* pela medicina brasileira (SILVA; PARENTE, 2013).

Visando aprimorar os testes e buscando maximizar os resultados, Silva e Parente (2017) isolaram talos frescos da cana do brejo, descobrindo três polissacarídeos. A partir de então, realizaram estudos químicos e espectroscópicos indicando que estes possuíam uma estrutura ramificada do tipo glicano. Mostraram ainda, que a capacidade fagocitária dos leucócitos foi aumentada pela adição desses glicanos, sugerindo haver neles uma ação imunomoduladora. Com base nesse achado, estes glicanos também foram possíveis de inibir o potencial de inflamação em casos de estresse muscular.

Uma pesquisa pré-clínica com vistas a avaliar extratos da cana-do-brejo em seu aspecto farmacológico suscitou ser a espécie possuidora de atividade analgésica, assim como possuir ação antiedematogênica e antiespasmódica (BRASIL, 2006).

Na composição química do decocto da planta foi registrada a presença de inulina, taninos, sistosterol, saponinas, mucilagens e pectinas (ALBUQUERQUE, 2011). Neste contexto, Braga et al. (2017) em uma análise fitoquímica do extrato metanólico encontraram flavonoides, esteróis, polifenóis e alcaloides, sendo os polifenóis o constituinte fito químico que mais apresentou efeito biológico. Segundo Maas (2002), muitos polissacarídeos do tipo glicano, encontrados em vegetais, demonstraram atividade anti-inflamatória e imunomoduladora, o que sugere que os mecanismos de ação desses polissacarídeos poder ser devido à sua ação no sistema retículo endotelial, com a estimulação fagocitária.

Com base em estudos fitoquímicos e da combinação de espectroscopia e métodos químicos realizados com as partes aéreas de *costus* spp., foi descrita a estrutura e o isolamento de dois novos diglicosídeos flavônicos, principalmente nas folhas da cana do brejo, a exemplo da tamarixetina 3-*O*-neohesperidosídeo e o canferídio 3-*O*-neohesperidosídeo. Estes apresentaram atividade inibidora da produção de óxido nítrico pelos macrófagos ativados, onde apresentaram atividade anti-inflamatória. Além destes, também foram identificados outros compostos, a exemplo da quercetina 3-*O*-neohesperidosídeo (CZARNECKI; GRZYBEK, 2005).

4.3 Dor e Nocicepção

A dor é um mecanismo de proteção, sendo considerada uma experiência indesejável, física ou emocional de caráter subjetivo, ligada a memórias emocionais, fatores patológicos, genéticos e cognitivos (NOEL et al., 2014). A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), em 1994 conceituava dor como sendo "uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano". Em 2016, a mesma Associação definiu a dor como sendo "uma experiência angustiante associada a uma lesão tecidual atual ou potencial com componentes sensoriais, emocionais, cognitivos e sociais" (TRACEY; MANTYH, 2017). A dor fornece um rápido aviso ao sistema nervoso para iniciar uma resposta motora e minimizar o prejuízo físico (FEIN, 2014).

Sendo uma condição extremamente subjetiva, é bastante complicado mensurar e classificar os diversos tipos de dor. Um critério bastante utilizado é o temporal, ou seja, a duração da dor em um espaço de tempo. Segundo esse critério, a dor é classificada em transitória, aguda e crônica (LOESER; MELZACK, 2009). A dor transitória tem a função de proteger o organismo contra uma possível lesão dos tecidos, ou seja, ocorre sem que haja danos teciduais. Já na dor aguda, ocorre uma lesão tecidual que antecede a sensação dolorosa, podendo ser ocasionada por diversos tipos de lesões como escoriações e processos cirúrgicos. Em ambos os tipos, a dor ocorre por determinado período de tempo e serve para alertar uma alteração na homeostase do organismo (MILLAN, 2009).

Quando o organismo não é capaz de solucionar a causa que deu origem à sensação dolorosa, e esta se prolonga no tempo (meses ou anos), estamos nos referindo à dor crônica (McCURDY; SCULLY, 2015). São várias as causas que podem originá-la, o que torna ainda mais complexo o diagnóstico e o tratamento. Esse tipo de dor causa intenso sofrimento, incapacita o indivíduo a desenvolver suas atividades normais, além de diminuir a qualidade de vida, pois podem se associar a outras patologias, como por exemplo, a depressão (TRACEY; DICKENSON, 2012).

Outro critério utilizado para classificar a dor é quanto a sua origem, que pode ser definida como nociceptiva, inflamatória e neuropática. A dor nociceptiva corresponde a uma resposta fisiológica do Sistema Nervoso Central e Periférico a uma lesão tecidual (superficial ou mais profunda) localizada (SALTER, 2015).

Enquanto na dor inflamatória, a ocorrência de uma lesão tecidual leva à liberação de mediadores inflamatórios que sensibilizam/ativam os neurônios periféricos, induzindo, assim, uma resposta nociceptiva que desencadeará a dor (CUNHA, 2011).

Quando uma lesão afeta diretamente o sistema nervoso (somatosensorial) a dor produzida é a neuropática (TREEDE et al., 2011). As causas são diversas e podem ser periféricas ou centrais como: traumas mecânicos, alcoolismo, diabetes, infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV), terapia medicamentosa crônica de algumas doenças, como câncer e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (SCADDING, 2013).

Apesar de tradicionalmente a dor ter sido classificada com base em sua duração como aguda ou crônica, uma definição mais recente se refere à dor como adaptativa ou não-adaptativa. A primeira apresenta-se como uma reação normal a uma lesão tecidual,

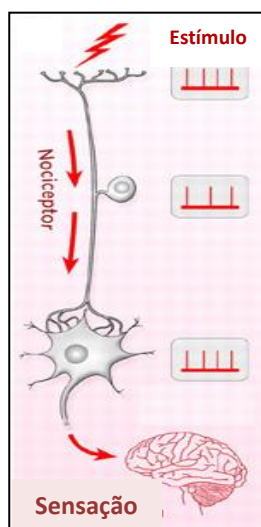
incluindo a dor inflamatória. A inflamação é o maior componente de diversas condições ligadas a dor, como a dor aguda pós cirúrgica ou traumática, por exemplo, e algumas situações que envolvem a dor crônica, como na osteoartrite (KLAUMANN *et al.*, 2008).

Os mediadores inflamatórios sensibilizam as vias neurais, aumentando a percepção da dor. Caso a dor adaptativa não seja adequadamente tratada, ocorrem modificações a nível espinal e supraespinal que determinam a nomenclatura não-adaptativa. Exemplos de dor não adaptativa incluem a dor neuropática, quando ocorre uma injúria ao sistema nervoso, ou por alterações no processamento e na percepção de um estímulo nódico normal (McKUNE *et al.*, 2015).

O sistema nociceptivo é o responsável pela geração e modulação do estímulo doloroso que ocorre a partir da transmissão de sinais que informam alguma lesão tecidual e resposta na forma de dor. Sendo assim, a nocicepção corresponde a manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo nocivo (LOESER; TREEDE, 2011).

Os neurônios especializados para a transmissão da dor (nociceptores) encontram-se amplamente distribuídos e servem de alerta para um possível dano ao organismo, através da detecção de condições extremas de temperatura, pressão e produtos químicos prejudiciais (Figura 2) (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2010).

Figura 2 – Representação esquemática de um nociceptor



Fonte: Adaptado de FLOR, 2002.

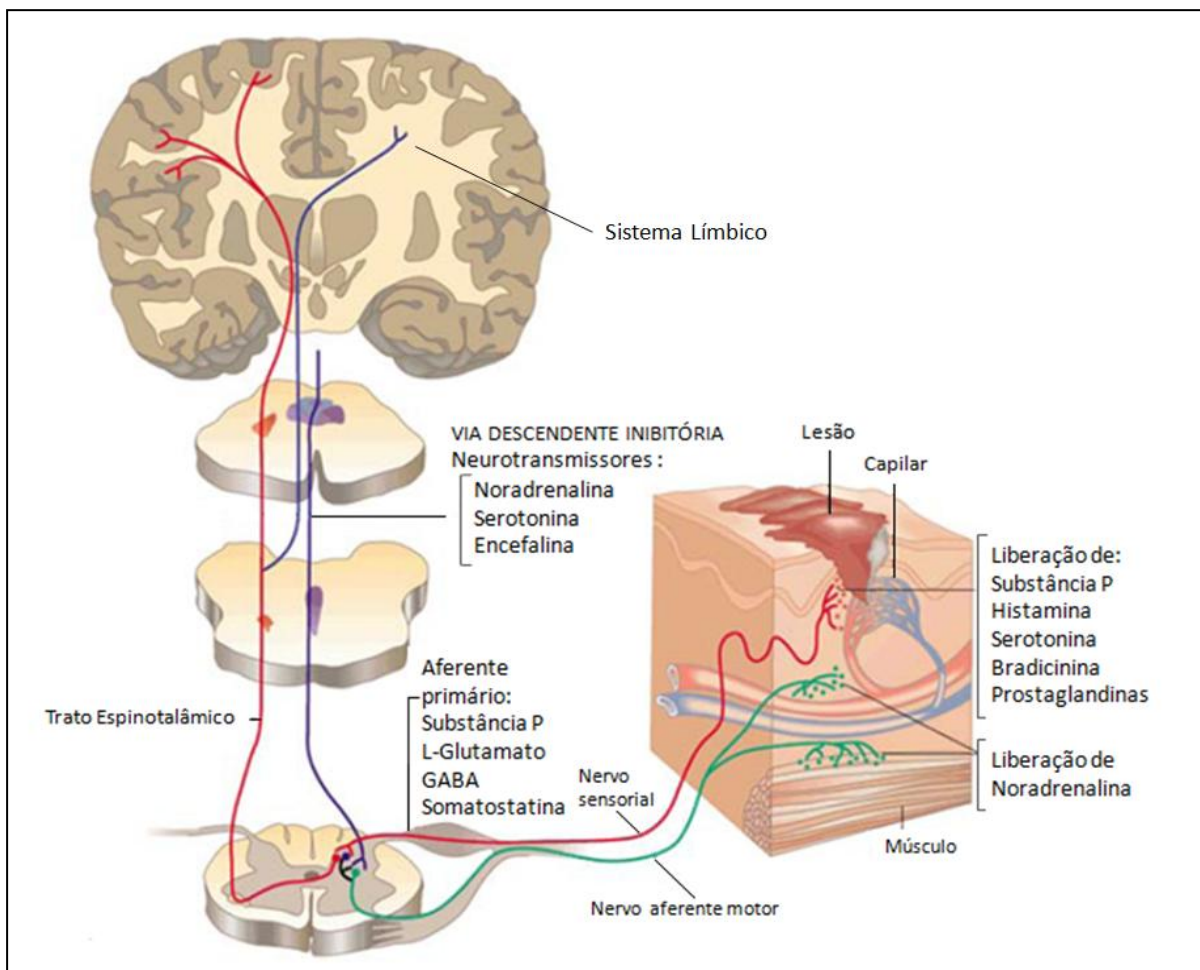
Existem duas classes principais de nociceptores, que são as fibras aferentes mielinizadas ($A\delta$ - que conduzem mais rapidamente o impulso nervoso; $A\beta$ - que respondem a estímulos mecânicos inócuos) e as aferentes não-mielinizadas (fibras C polimodais - de baixa condutância). Esses nociceptores são encontrados na pele, musculatura esquelética, articulações, vísceras (JULIUS; BASBAUM, 2011). Aqueles nociceptores que inervam o corpo possuem seus corpos celulares localizados nos gânglios das raízes dorsais (GRD), enquanto os que inervam a face estão localizados no gânglio trigemial (MEYER, 2016).

As fibras nervosas aferentes primárias são as responsáveis por detectar estímulos ambientais térmicos, mecânicos ou químicos e traduzir essas informações em corrente elétrica (BASBAUM et al., 2015). Os receptores de potencial transitório (TRP) constituem o maior grupo de detectores de estímulo nocivos (CHENG; JI, 2013; PATAPOUTIAN; TATE; WOOLF, 2017). Um desses receptores, conhecido o receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV-1), foi descrito como receptor polimodal, ativado por estímulos térmicos ($> 43\text{ }^{\circ}\text{C}$), baixo pH ($< 5,9$) e por compostos vanilóides (capsaicina) (CATERINA; JULIUS, 2011; TOMINAGA, 2017).

Os mediadores inflamatórios que participam no processo de ativação dos nociceptores são a acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, leucotrienos (LT), fator de ativação plaquetária (PAF), prostaglandinas (PG), tromboxanos, interleucinas (IL), fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), fator de crescimento neuronal (NGF) e serina proteases (VERGNOLLE, 2010).

Na ocorrência de uma lesão tecidual e consequente liberação e interação dos mediadores químicos locais com seus respectivos receptores, é desencadeado um processo de transmissão do estímulo doloroso até alcançarem níveis centrais (MARCON, 2011). Após essa sensibilização dos nociceptores periféricos e geração dos potenciais de ação, são liberados vários neurotransmissores, tais como: substância P, L-glutamato, ácido gama aminobutírico (GABA), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), colecistocinina 8 (CCK-8), somatostatina e peptídeo do gene da calcitonina (CGRP) no corno dorsal da medula espinhal (**Figura 3**) (DA MATTA, 2012).

Figura 3 – Etapas de percepção da dor.



Fonte: Adaptada de DA MATTA, 2012.

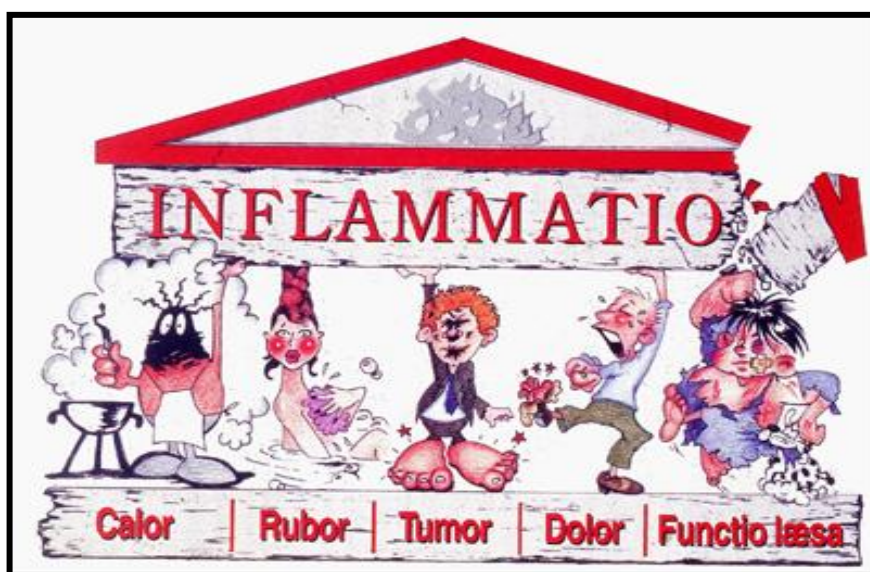
Os neurônios de segunda ordem são, então, ativados pelos neurotransmissores e o sinal segue para as áreas do sistema límbico (tálamo) e córtex cerebral pelo trato espinotalâmico, que compreendem as regiões finais da via nociceptiva. Chegando ao tálamo, o estímulo nocivo passa pelo processo de somatização, informando que existe uma sensação nociceptiva, enquanto no córtex existe o componente emocional que discrimina o tipo de sensação (ROY et al., 2011).

4.4 Inflamação

O processo inflamatório é uma reação de reparação e defesa do organismo ao dano tecidual visando destruir ou isolar o agente lesivo. A inflamação é uma resposta dos tecidos conjuntivos vascularizados às agressões de diversas naturezas (física, química ou biológica) que induz a liberação de uma gama de mediadores exógenos e endógenos (KUMMER; COELHO, 2012).

Esta resposta tem as suas desvantagens, pois causa edema, rubor, calor e dor, que são os sinais cardinais da inflamação já descritos por *Cornelius Celsus*, um médico romano do século I d.C. Tais sinais, de fato, justificam o termo “inflamação”, derivado do verbo latino *inflammare*, o que significa incendiar. Já a perda da função, quinto sinal clínico da inflamação, foi adicionada posteriormente por Rudolph Virchow em 1858 (ALLER et al., 2007). A **Figura 4** ilustra os cinco sinais característicos da inflamação.

Figura 4 – Sinais característicos da inflamação



Fonte: FANG et al., 2013.

Após lesão tissular ou infecção, a inflamação consiste na resposta orgânica mais precoce do organismo. Sendo um processo fisiológico, envolve uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão. Na fase inicial da inflamação, observam-se os sinais do calor e rubor que ocorrem devido à vasodilatação periférica e aumento do fluxo sanguíneo. Tais eventos vasculares são mediados principalmente por óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PG) (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2014).

A formação do edema, ou seja, do extravasamento do exsudato, acontece devido à liberação simultânea de mediadores como a histamina, bradicinina, PAF e LT que aumentam a pressão oncótica e a permeabilidade vascular, fazendo com que os fluidos proteicos (exsudato) passem para o espaço extracelular. A dor é originada por mecanismos mais complexos que incluem compressão das fibras nervosas locais devido ao edema, agressão direta às fibras nervosas e ação farmacológica sobre as terminações nervosas. Finalmente, a perda de função é decorrente do edema (principalmente em articulações, impedindo a movimentação) e da dor, que dificultam as atividades locais (GILROY et al., 2014).

4.5 Recrutamento de leucócitos

O recrutamento de leucócitos durante a resposta inflamatória envolve três fundamentais etapas: captura e rolamento das células, adesão firme e transmigração. Essas etapas dependem de moléculas de adesão presentes no leucócito e no endotélio, que se encaixam de maneira complementar, como mostra a **Figura 5**. A produção de fatores quimiotáticos como, por exemplo, as quimiocinas, também contribuem para o processo de recrutamento (CHEN et al., 2013).

Assim, o recrutamento de leucócitos para um sítio inflamatório obedece aos seguintes passos:

Captura e rolamento: primeiramente, ocorre uma interação "frouxa" entre os leucócitos e as células endoteliais. Essa fase pode ser dividida em duas etapas: captura ("tethering") e rolamento ("rolling") e é mediada pelas selectinas (P, E e L) e os ligantes de selectinas, proteínas que contêm carboidratos. Essa primeira etapa aproxima os leucócitos das células endoteliais e, conseqüentemente, dos eventos que estão

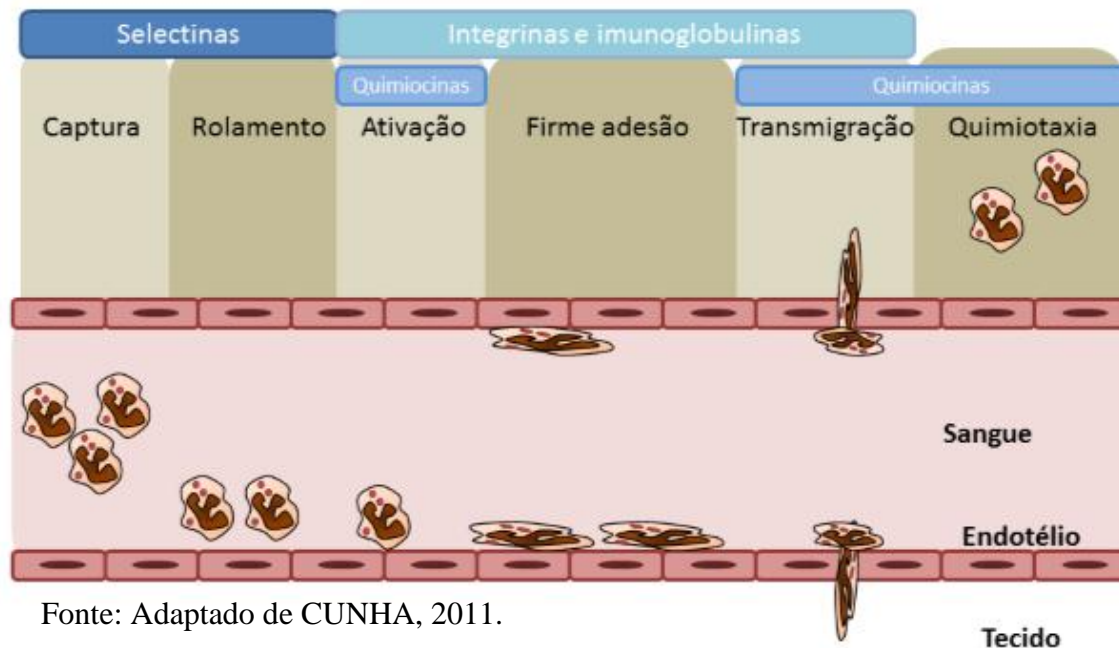
ocorrendo no tecido. Uma vez rolando sobre as células endoteliais, os leucócitos podem ser ativados por agentes quimiotáticos (VIEL et al., 2009);

Ativação por fatores quimiotáticos: Os agentes quimiotáticos agem em receptores com sete domínios transmembrana (serpentinóides) acoplados à proteína G. Essa ativação leva ao aumento do número e, principalmente, da afinidade de integrinas expressas na superfície do leucócito com moléculas do endotélio (MAMET et al., 2012);

Adesão firme: A firme adesão e a posterior transmigração dos leucócitos são mediadas por integrinas. As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas, aderentes, transmembrana, constituídas de cadeias α e β . As integrinas, então, se ligam a moléculas da família das imunoglobulinas expressas nas células endoteliais. Essa ligação permite firme adesão entre o leucócito e o endotélio (VOILLEY et al., 2011);

Transmigração: O processo de transmigração pela célula endotelial poderá, então, ocorrer e depende de interações moleculares semelhantes àquelas necessárias à firme adesão (SERHAN; SAVIL, 2010).

Figura 5 - Mecanismo de recrutamento de leucócitos através do endotélio.



Fonte: Adaptado de CUNHA, 2011.

Os diversos leucócitos, como os neutrófilos, monócitos, eosinófilos e linfócitos, utilizam moléculas distintas, entretanto, superpostas para o processo de recrutamento. Isso explica, em parte, a seletividade por certos tipos celulares em determinadas respostas inflamatórias. Este modelo de recrutamento também é válido para a migração de diferentes leucócitos para os órgãos linfoides, contribuindo para a homeostase do sistema imunológico (SALLUSTO; MACKAY, 2014).

Após a transmigração pelo endotélio, os leucócitos migram através do tecido em direção ao tecido inflamado por um mecanismo orientado pelo gradiente quimiotático. Substâncias exógenas e endógenas podem exercer esse papel quimiotático para os diversos leucócitos (SCHULTE et al., 2011).

4.6 Mediadores inflamatórios

Os mediadores da inflamação são substâncias formadas e liberadas concomitantemente ou sequencialmente, no local da lesão (ZHOU et al., 2007). Originam-se do plasma ou das células. Aqueles oriundos do plasma, a exemplo do sistema complemento, estão em suas formas precursoras e devem ser ativados, em geral por uma série de clivagens proteolíticas, a fim de adquirir suas propriedades biológicas (CONTRAN, 2005).

Os mediadores oriundos de células normalmente estão sequestrados nos grânulos intercelulares, que precisam ser secretados, a exemplo da histamina nos grânulos dos mastócitos, ou são sintetizados originalmente, a exemplo das citocinas e prostaglandinas, em resposta a um estímulo (COLLINS, 2009). Essas substâncias estão envolvidas na geração e manutenção dos eventos característicos da reação inflamatória e interagem com receptores específicos nas células-alvo podendo, inclusive, estimular a liberação de outros mediadores (ADEREM; SMITH, 2005).

4.6.1 Quimiocinas

As quimiocinas são proteínas com atividade quimioatrativa e peso molecular variando de 8 a 12 KDa. São produzidas por várias células, incluindo: células endoteliais (NAKANO et al., 2013), células epiteliais (OH et al., 2013), fibroblastos, monócitos/macrófagos, células dendríticas (HOEFFEL et al., 2013), células T e eosinófilos (ROTH et al., 2013).

Quimiocinas são caracterizadas pela presença de quatro resíduos de cisteína conservados na porção amino-terminal. Na presença ou ausência de aminoácidos entre as duas primeiras cisteínas são classificadas como CC (CCL1-28), CXC (CXCL1-16), CX3C (CX3CL1) e, ainda, existe a quimiocina C que possui somente uma cisteína na porção N-terminal (XCL1 e XCL2) (GUERREIRO et al., 2013).

Tais proteínas contribuem para resposta inflamatória dada sua capacidade de induzir recrutamento e ativar populações de leucócitos, induzindo degranulação e levando à liberação de mediadores inflamatórios de células efectoras tais como basófilos, mastócitos, neutrófilos e eosinófilos. Entretanto, essas moléculas também podem exercer um papel na homeostase do sistema imune. Algumas delas dirigem o recrutamento de células para os tecidos linfoides (JOHNSON et al., 2014).

Contudo, o estudo das quimiocinas nos últimos anos tem contribuído para o entendimento do seu papel nas diversas doenças inflamatórias, na hematopoiese, na angiogênese, na geração de metástases, na rejeição de tumores, na diferenciação de células T e na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. Assim, as quimiocinas são fatores essenciais para a migração celular, atuando sobre receptores com sete domínios transmembrana associados à proteína G, levando à ativação de cascatas de sinalização intracelular (OH et al., 2013).

4.6.2 Cininas

As cininas são glicoproteínas que são produzidas e secretadas por diferentes tipos celulares em virtude de variados estímulos. Exercem sua função ligando-se a receptores específicos de célula alvo, em diversas situações críticas, como defesa, reparo e crescimento do organismo. A cascata da cinina é desencadeada na ativação em conjunto com a cascata de coagulação, portanto, ocorre uma ligação entre a cascata da cinina, cascata de coagulação e sistema complemento (SC) (RANG et al., 2007).

As cininas, em especial, a bradicinina, são potentes agentes nociceptivos. A bradicinina excita os neurônios sensoriais primários e provoca a liberação de neuropeptídeos. Na dor aguda, os receptores β_2 medeiam a algesia da bradicinina, enquanto que na dor da inflamação crônica, parece envolver a participação de receptores β_1 . Os receptores β_1 em células inflamatórias, como macrófagos, podem desencadear a produção das citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e TNF- α (BROWN; ROBERT, 2006).

4.6.3 Histamina

A liberação da histamina ocorre pelo processo de exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas, através da interação de fatores do sistema complemento (C3a e C5a) e de antígenos com anticorpos IgE fixados nos mastócitos. A atividade biológica da histamina ocorre através de sua interação a pelo menos quatro subtipos de receptores acoplados à proteína G, denominados H₁, H₂, H₃, H₄ e H₅ (HUANG; THURMOND, 2008).

A histamina exerce sua ação quando interage com seus receptores específicos (H₁, H₂, H₃ e H₄). A ativação dos receptores H₁ resulta numa vasodilatação de início rápido e de curta duração, além de aumentar a permeabilidade vascular, enquanto a ativação dos receptores H₂ causa uma vasodilatação mais prolongada e de início lento, via do monofosfato cíclico de adenosina/proteína quinase A (AMPC-PKA) (LEURS; WANTANABE; TIMMERMAN, 2001). A interação entre a histamina e os receptores H₁ aumenta a expressão de P-selectina nas células endoteliais (promovem a adesão neutrofílica) (GABOURY et al., 1995).

A interação da histamina com receptores do tipo H₁ desencadeia aumento de permeabilidade vascular em nível de vênulas pós-capilares, além de estar envolvida com a contração de músculos lisos em brônquios, intestino e útero, aumento da secreção nasal de muco, produção de prostaglandinas pelo tecido pulmonar, aumento da quimiotaxia de leucócitos, entre outras funções (SILVA; CARVALHO, 2004). O estímulo simultâneo de receptores H₁ e H₂ promove vasodilatação máxima (MONTENEGRO; FECCHIO, 2009).

Os receptores H₃ funcionam como receptores pré-sinápticos, que estão envolvidos na regulação autócrina negativa de histamina e de outros neurotransmissores do SNC (BELL et al., 2004). Quanto aos efeitos do receptor H₄ pouco se sabe, porém, a literatura sugere que esteja envolvido na indução de prurido (LING et al., 2004) e na inflamação alérgica (DUNFORD et al., 2006).

Agonistas dos receptores H₄ causam um aumento de células T regulatórias e de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o TGF- α . Por outro lado, o receptor H₄ da histamina também participa de outras respostas, favorecendo a quimiotaxia de células inflamatórias, como neutrófilos, células dendríticas e mastócitos (ZAMPELI; TILIGADA, 2009).

4.6.4 Citocinas

As citocinas são mediadores proteicos ou peptídeos que regulam a atividade celular, principalmente do sistema imune. Incluem as interleucinas (IL), linfocinas, interferons e fator de necrose tumoral (TNF). O efeito biológico depende da citocina e do tipo da célula envolvida, sendo que, de um modo geral, as citocinas apresentam influência na ativação, divisão, apoptose e quimiotaxia celular (KRAYCHETE; CALASANS; VELENTE, 2006).

Em doenças que cursam com processo inflamatório agudo ou crônico, é possível que as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF) induzam o organismo a criar uma série de respostas caracterizadas por febre, aumento do sono e da síntese de proteínas no fígado, redução da ingestão de água e de alimentos, aumento da liberação de cortisol, alteração da atividade das monoaminas, diminuição de atividades diárias e da interatividade social e hiperalgesia (TYSON et al., 2009). Essas alterações ocorrem como forma de acelerar as reações enzimáticas defensivas, reduzir a replicação de

patógenos, aumentar a proliferação de células imunes, imobilizarem a área que foi lesada e conservar energia (GRELLNER, 2009).

4.6.5 Óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) é outro importante mediador da resposta inflamatória. Trata-se de um gás solúvel produzido pelas células endoteliais, macrófagos e alguns neurônios cerebrais (FILHO; ZILBERSTEIN, 2002). É sintetizado a partir da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidina da L-arginina, que é convertido em L-citrulina, pela ação da NO sintase (NOs). Foram identificadas três isoformas da NOS: A NOS endotelial (eNOS), neural (nNOS) e NOS induzida (iNOS) (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2006).

A eNOS e nNOS são produzidas de forma constitutiva e suas expressões aumentam com o fluxo de cálcio, enquanto iNOS é produzida através de leucócitos ativados após a exposição a citocinas pró-inflamatórias ou a produtos microbianos (BROCHU; ROBERTS, 2009). Alguns estudos versam que o aumento na produção de NO, devido à indução da expressão de iNOS por citocinas inflamatórias, é instrumento da patofisiologia do processo inflamatório (CHANDRASEKHARAN; ROSS, 2005).

Outros estudos mostram que o NO ainda atua no vasorrelaxamento dependente do endotélio, na inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária, na regulação da pressão sanguínea basal, como vasodilatador, aumentando a permeabilidade vascular e estimulando a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias, além de apresentar atividade anti-inflamatória (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

4.6.6 Mediadores derivados do sistema complemento (SC)

O sistema complemento é composto por proteínas da membrana plasmática e solúveis no sangue, que participam das defesas inatas (natural) e adquiridas (memória) ao opsonizar os patógenos e induzir uma série apropriada de respostas inflamatórias que auxiliam no combate à infecção. Inúmeras dessas proteínas reagem entre si para complemento, como proteases que se ativam por clivagem proteolítica (BRANDÃO et al., 2006).

Para que o SC exerça suas funções, ele deve ser ativado, originando assim uma série de fragmentos com diferentes características e funções específicas. Esta ativação ocorre por duas vias: clássica e alternativa. Cada uma delas é desencadeada por fatores diferentes, sendo o início da ativação diferente para cada uma, mas que convergem em uma via comum. Sua ativação tanto pela via clássica como pela via alternativa leva à formação do complexo lítico de membrana (CLM) que destrói células (PARK; VASKO, 2005).

4.6.7 Hidroxitriptamina (5-HT)

A 5-HT ou 5-hidroxitriptamina é uma indolamina, produto da hidroxilação e carboxilação do aminoácido triptofano. É produzida nos núcleos da rafe e lançada em todo o cérebro. A 5-HT é um neurotransmissor e, como tal, serve para conduzir a transmissão de uma célula nervosa (neurônio) para outra. A 5-HT é secretada por neurônios serotoninérgicos e age em receptores de neurônios pós-sinápticos (COLDWELL et al., 2007).

É o segundo mediador vasoativo pré-formado com ações semelhantes às da histamina (RACKE; SCHWORER, 2001). Cerca de noventa por cento da 5-HT é produzida por células enterocromafins, encontrada no epitélio do trato gastrointestinal, e absorvida pelas plaquetas (YOUNG; FURNESS, 2001).

É proveniente principalmente de plaquetas, mastócitos e células endoteliais, bem como de terminais serotoninérgicos centrais e ajuda na sensibilização e ativação dos neurônios nociceptivos, o que promove a sensibilização ou ativação direta dos nociceptores, induzindo hiperalgesia por ação direta contribuindo, dessa forma, para a dor inflamatória (JULIUS; BASBAUM, 2001).

4.6.8 Metabólitos secundários do ácido araquidônico

Os principais eicosanoides envolvidos tanto na geração da inflamação como também na dor, são os LTs e as PGs. As PGs e os LTs promovem vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e edema nos sítios de inflamação, enquanto que na dor podem causar hiperalgesia a estímulos mecânico, térmico ou químico (SUBONGKOT et al., 2003).

São produtos do processamento do ácido araquidônico (AA) que normalmente é encontrado esterificado a fosfolipídios de membrana, de onde é liberado por ação de fosfolipases, como a fosfolipase A₂ (PLA₂). Os AA podem sofrer metabolização pelas vias das enzimas, ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) para produzir uma grande família de eicosanoides (SILVA et al., 2002).

Dentre as ciclooxigenases, a COX-1 é constitutivamente expressa, ou seja, está presente nas células em condições fisiológicas, principalmente nos vasos sanguíneos, plaquetas, estômago e rins (HIKIJ *et al.*, 2008). A COX-2, por outro lado, é geralmente ausente na maioria dos tecidos normais, porém pode ser rapidamente induzida em resposta a uma variedade de estímulos, entre eles mitógenos, hormônios, citocinas e fatores de crescimento, como IL-1, TNF- α e demais mediadores inflamatórios, sendo responsável também pela produção de concentrações elevadas de prostanoides durante a inflamação (SANTOS et al., 2007).

Existe ainda, a COX-3, que se encontra distribuída principalmente no córtex cerebral, medula espinal e coração. Alguns estudos sugerem que a inibição da COX-3 poderia representar o mecanismo central primário pelo qual os fármacos analgésicos e antipiréticos, como os AINES, desenvolveriam suas atividades de redução de dor e da febre (FONSECA et al., 2002).

4.7 Atrite reumatoide: conceito e patogenia

A artrite reumatoide é uma doença inflamatória sistêmica de caráter autoimune caracterizada pela presença de poliartrite crônica, de ordem simétrica e erosiva, podendo causar manifestações extra-articulares múltiplas, deformidades e redução da função articular (CARVALHO et al., 2010). Caracteriza-se por apresentar sinovite, presença de auto anticorpos e pela formação do tecido de granulação denominado *pannus*, que invade e destrói as estruturas próximas à articulação, tais como a cartilagem articular, o osso subcondral, os tendões e os ligamentos (BARBOSA et al., 2013).

Em geral, esta afecção acomete grandes e pequenas articulações, de forma simétrica, em associação com manifestações sistêmicas, como rigidez matinal, fadiga e perda de peso, com um curso clínico flutuante, com períodos de melhora e exacerbação dos sintomas articulares (KHURANA, 2015). A avaliação da qualidade de vida relacionada à saúde tem sido utilizada como um bom indicador do impacto da artrite, uma vez que esta afecção raramente leva à morte, porém causa sintomas como dor, edema e rigidez articulares que afetam significativamente a funcionalidade (ABELL et al., 2010).

A característica principal da artrite reumatoide é a simetria poliartétrica que afeta principalmente os pés, as mãos e os punhos. Contudo, a maioria das articulações diartroidais também é acometida (MACGREGOR, 2009). As grandes articulações geralmente tornam-se sintomáticas após as pequenas articulações. Apresentações assimétricas, com simetria desenvolvida no curso da doença não são muito comuns (BARROS et al., 2006).

A artrite reumatoide acomete as estruturas articulares, periarticulares e os tendões, porém a estrutura anatômica mais afetada é a membrana sinovial (CRUZ; BRANCO, 2012). A sinóvia normal, membrana que envolve as articulações, apresenta três camadas de células e estroma subsinovial avascularizado. Na artrite, a membrana sinovial está espessada, hiperêmica e edematosa e apresenta seis a dez camadas, dilatação venosa, alterações vasculares focais e segmentares, obstrução capilar, áreas de trombose, hemorragia perivascular e o estroma subsinovial com a presença de células mononucleares (SKARE, 2009).

Em humanos, o líquido sinovial normal contém 10-200 células por mm^3 e o aspecto do líquido é claro e amarelado, em indivíduos com artrite reumatoide o líquido sinovial contém em média 20000 células por mm^3 e o fluido é escuro, turvo ou opaco e apresenta cor esverdeada (GOLDING, 2011). A intensa inflamação articular, com destruição da cartilagem e do osso, edema, dor e impossibilidade ou dificuldade em executar atividades habituais caracteriza a artrite reumatoide (LESUIS et al., 2012).

O sítio inicial da inflamação articular é a membrana sinovial, que normalmente secreta o líquido sinovial que reduz o atrito e nutre a cartilagem articular. A cápsula articular consiste de duas camadas: uma externa de tecido conjuntivo denso com vasos sanguíneos e nervos, e uma camada interna chamada de membrana sinovial (DE VITA et al., 2012).

A semelhantes aos macrófagos e as células sinoviais tipo B semelhantes aos fibroblastos. Nesse contexto, os macrófagos se acumulam na membrana sinovial e na junção cartilagem denominada *pannus*, produzindo algumas citocinas pró-inflamatórias tais como, TNF- α , IL-1 e quimiocinas (KINNE et al., 2010) que estimulam a atração de leucócitos para a membrana sinovial com subsequente sinovite (KALE et al., 2009).

O TNF- α estimula a proliferação de sinoviócitos, induzindo a hiperplasia sinovial e a formação do *pannus* e a IL-1 estimula a proliferação de fibroblastos sinoviais que estão envolvidos na regulação da expressão de moléculas de adesão, citocinas e metaloproteinases (PAP et al., 2009).

As células T CD4⁺ encontram-se em grande quantidade na membrana sinovial de pacientes com artrite reumatoide (MATSUOKA et al., 2000). Os linfócitos, uma vez ativados, estimulam os monócitos, macrófagos, fibroblastos sinoviais e células B (QIAO et al., 2009). Embora os linfócitos T sejam predominantes no infiltrado leucocitário, as células B também estão envolvidas na patogênese da artrite reumatoide, produzindo o fator reumatoide (FR). Cerca de 80% dos portadores da AR apresentam esse fator. O termo FR engloba um grupo de auto anticorpos das classes IgG, IgM e IgA que tem em comum a capacidade de reagir com diferentes epítomos da porção Fc da molécula de IgG humana (SHMERLING; DELBANCO, 2009).

Outro leucócito que merece destaque na patogênese da AR é o neutrófilo, uma das primeiras células a chegar no local acometido, o qual exerce um papel importante no quadro inflamatório agudo (ABRAMSON, 2015). Os neutrófilos estimulam a produção de IL-8 no fluido sinovial, exercendo participação na atração de leucócitos

para o interior da articulação e na destruição da cartilagem através da produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enzimas proteolíticas (CHATAM et al., 2013).

Estudos em modelos experimentais resultam em um melhor entendimento do papel de diferentes tipos celulares e mediadores inflamatórios envolvidos no desenvolvimento da artrite. Pesquisas têm demonstrado que dentre os diferentes tipos celulares, os neutrófilos se destacam, pois regulam e orquestram a resposta inflamatória aguda e participam também da inflamação crônica (QUITANS et al., 2010).

O acúmulo de produtos potencialmente tóxicos, como serino proteases, colagenase, espécies reativas de oxigênio e fibronectina no líquido sinovial ocorrem devido a processos de ativação de neutrófilos *in situ*. A presença deste tipo celular tem sido associada aos principais danos articulares observados na artrite reumatoide (ELLIOTT et al., 2011). Sendo assim, o modelo de artrite se torna um modelo para se estudar o recrutamento de neutrófilos, a resolução da resposta inflamatória e a participação de diferentes moléculas nestes processos (CUNHA et al., 2015).

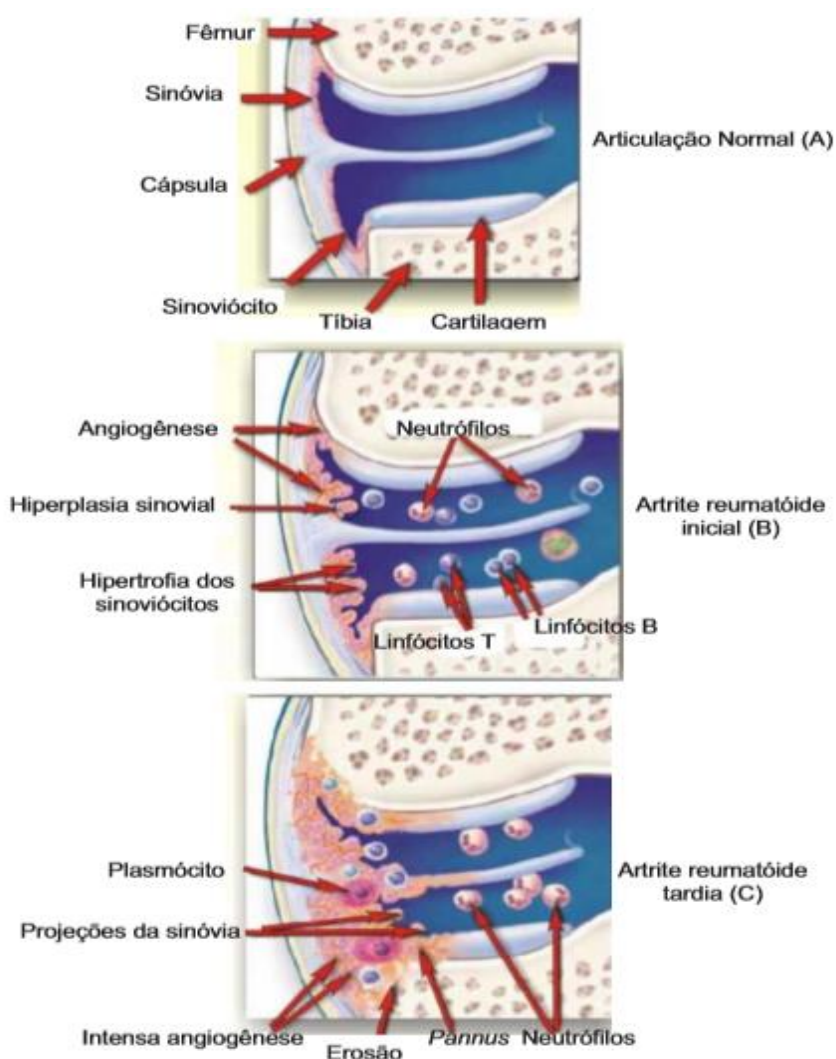
Outro importante ponto citado acima é a intensa dor articular gerada na AR. Como resultado de lesão tecidual e reatividade imune anormal ou lesão neural, a dor está frequentemente relacionada a processos inflamatórios (STEIN et al., 2013). Tais processos geram a sensibilização de nociceptores aferentes primários, que é caracterizada pela diminuição do limiar de excitabilidade necessário para ativá-lo, pelo aumento da atividade espontânea da célula nervosa e pelo aumento na frequência de disparo em resposta a estímulos supralimiáres (COSTIGAN et al., 2011).

A consequência de tais alterações leva a dois fenômenos clínicos relevantes, a hiperalgesia, caracterizada pela resposta exacerbada a estímulos dolorosos, e alodínia, que é o surgimento da dor em resposta a um estímulo normalmente inócuo (MISHARIN et al., 2012), melhor descrito como hipernocicepção em modelos animais (OLIVEIRA et al., 2011).

Existem diversos mediadores químicos finais da hipernocicepção inflamatória que podem ativar diretamente e/ou indiretamente os nociceptores. Entretanto, o estímulo inflamatório normalmente não libera estes mediadores diretamente, mas são precedidas por outros mediadores como as citocinas (VERRI et al., 2011). Assim sendo, células residentes (principalmente macrófagos, mastócitos e células dendríticas) e células infiltradas liberam diversos mediadores inflamatórios, como as citocinas, que

desempenham papel essencial para o desenvolvimento da hipernocicepção inflamatória (DENG et al., 2009).

Figura 6: Mecanismos celulares que envolvem a Artrite Reumatóide. Articulação em indivíduo saudável (A), articulação em paciente com AR inicial (B), articulação em paciente com AR tardia (C).



Fonte: modificado de <http://www.genocites.com/aferrante.geo/AR.htm>

4.7.1 Artrite induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA): histórico e caracterização

O entendimento dos mecanismos pelos quais a artrite reumatoide desencadeia é baseado em estudos de cunho clínico e em modelos experimentais em animais (KANNAN, 2005). A indução de artrite em animais tem sido realizada através da administração de agentes do tipo artrigênicos, como o pristane, zymosan, o adjuvante completo e incompleto de Freund (CFA), entre outros (CANNON et al., 2013).

A artrite induzida por adjuvante foi descrita pela primeira vez por Pearson em meados de 1956, sendo caracterizada como uma doença induzida em camundongos com susceptibilidade genética por uma inoculação simples de micobactéria (*Mycobacterium*) suspensa em óleo, a qual dá-se o nome de Adjuvante de Freund (CFA) (DONALDSON, 2003). Carl Pearson foi um médico americano que pesquisou sobre doenças musculares de caráter degenerativo. Visando induzir polimiosite através da injeção por via intramuscular de CFA, Pearson notou que houve o desenvolvimento de uma artrite de cunho crônico nos animais. Este modelo, portanto, reproduzia e traduzia sinais e sintomas muito semelhantes aos da artrite em seres humanos (PEARSON, 1956).

O adjuvante completo e o incompleto de Freund têm sido utilizados para a indução de artrite em animais. O adjuvante incompleto de Freund (IFA) é composto por óleo de parafina contendo mono-oleato de manitol como surfactante. Já o adjuvante completo de Freund (CFA) contém os mesmos componentes do IFA, porém com adição de uma micobactéria morta (DAHER, 2005).

A indução da artrite por CFA em animais tem revelado extensas variações na frequência e severidade de lesões de acordo com a raça. Os camundongos, em sua grande maioria, não são susceptíveis à indução de artrite por adjuvante (WHITEHOUSE, 2004). Por outro lado, os ratos desenvolvem com maior facilidade a artrite induzida por CFA. Em relação à idade, as diferenças são em relação à indução da artrite. Camundongos jovens, de até 7 dias de nascimento, não são considerados suscetíveis à doença, apenas animais com mais de 21 dias de vida (SERHAN, 2005).

4.7.2 Indução

O modelo de artrite é induzido por meio da micobactéria morta, em óleo adjuvante, que consiste em óleo de parafina contendo mono-oleato de manitol como surfactante (KAVUNCU, 2005). A concentração ideal para causar artrite severa é de 10,0 mg/mL e quando 0,1 mL da suspensão é injetado (WAUBEN, 2004).

Segundo o mesmo autor, em experimentos que visam testar casos menos severos, uma concentração da micobactéria de 1,0 mg/mL a 5,0 mg/mL em óleo é adequada. Todavia, são comercializados por laboratórios especializados nas concentrações de 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 5,0 mg/mL, sendo esta última pouco encontrada. Doses mais elevadas apresentam a opção de serem manipuladas por meios apropriados.

Em um estudo realizado por Cai e colaboradores (2010), animais que foram injetados com 100 µg de CFA manipulado, desenvolveram sinais artríticos a partir do 9º dia, ao mesmo tempo que animais que foram injetados com 100 µL contendo 5 mg/mL de CFA só desenvolveram sinais artríticos a partir do 18º dia de indução.

4.7.3 Vias de indução em modelos experimentais

A via preferencial de imunização é a intradérmica, na base da cauda. Outra via a ser utilizada é a injeção intracutânea na pata traseira e intra-articular nas articulações tíbio-femural e tíbio-társica (IIGO et al., 2001).

A indicação do volume de adjuvante a ser administrado varia entre os autores, pois cada pesquisador padroniza o tipo de indução adequado aos objetivos de suas pesquisas. Cook e Moore (2010) injetaram 100 µL de CFA, contendo 5,0 mg/mL de *Micobacterium butyricum*, intraplantar em ratos. Por sua vez, Zhang e colaboradores (2001) injetaram 100 µL de CFA, contendo 0,5 mg/mL de *M. tuberculosis*, intradérmica na base da cauda de ratos; Zheng et al (2002) empregaram 100 µL de adjuvante, contendo 10 mg/mL de *M. tuberculosis*, intradérmico na base da cauda. Todos obtiveram uma indução de artrite por adjuvante satisfatória padronizada de acordo com seus propósitos.

4.7.4 Curso da doença

A artrite induzida surge geralmente entre 10 a 12 dias após a estimulação por via intraplantar na face dorsal da pata traseira do camundongo, e entra em remissão por volta de 6 a 10 semanas, para este modelo descrito por Ottawa (2004). Após a indução ativa da doença, sua progressão e severidade podem ser quantificadas fisicamente, histologicamente, radiograficamente e por ressonância magnética (LE BARS; GAZARIUM; CADDEN, 2004). A severidade pode ser observada na primeira ou segunda semana e cessa nas três semanas subsequentes.

O edema e deformidades podem ser vistas por um longo período (MEDZHITOV, 2010). No exame físico o que se verifica, na maioria das vezes, é o edema, pelo volume da pata ou espessura da articulação (geralmente joelho ou tornozelo), e o grau de artrite é verificado por meio de eritema, edema periarticular e deformidade (TRENTHAN et al., 2007).

Na artrite por adjuvante severa há intensa difusão, infiltrado celular inflamatório denso composto por celular mononucleares, polimorfonucleares e neutrófilos. A sinóvia e o tecido conectivo subsinovial apresentam como característica edema com área de necrose. Ao mesmo tempo, o tecido de granulação reativo, chamado de *pannus*, estende-se para o tecido periarticular, ocasionando destruição da cartilagem articular e consequente invasão para o espaço medular do osso (TERRIER et al., 2005).

Como a artrite induzida por adjuvante apresenta remissão espontânea, a utilização de camundongos visando intervenção terapêutica e de cunho farmacológico é limitada (COSTA et al., 2008). Assim que a doença entra em ação, a imunoregulação é ativada como parte da resposta fisiológica. Concomitantemente, a destruição da articulação é completa e ocasiona não restabelecimento articular, e assim, não é, na maioria dos casos, ideal a realização de testes com vista à discretas intervenções (MEDZHITOV, 2008).

4.7.5 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico precoce da artrite reumatoide e o início imediato ao tratamento são fundamentais para o controle da atividade da doença e para a prevenção de incapacidade funcional e lesões articulares irreversíveis (ROSEN, 2004). Entre as características físicas do paciente, estão a fadiga, inchaço e limitação dos movimentos (VAN VENROOIJ, 2004). Nesse contexto, o quadro laboratorial da artrite reumatoide pode incluir, entre outras características, anemia, aumento da velocidade de hemossedimentação e da proteína C reativa (VOULGARI et al., 2009).

Mesmo após décadas de pesquisas, a patogênese desta doença ainda não está completamente elucidada. Admite-se que os fatores que a desencadeiam sejam múltiplos, incluindo fatores imunes, genéticos e ambientais (JAYSON, 2009). O mesmo autor mostra que uma porcentagem elevada de indivíduos que desenvolvem artrite, apresentam o antígeno de histocompatibilidade da classe II. A presença deste antígeno tem sido reconhecida como um fator de risco para o desenvolvimento da doença.

Outras pesquisas indicam que o sistema imune inato pode estar envolvido no desenvolvimento da artrite reumatoide, por meio da ativação de receptores reconhecidos por bactérias, sendo o responsável pelo recrutamento de células inflamatórias para a cavidade articular, culminando com a liberação de citocinas e prostaglandinas, que contribuem para a intensificação da inflamação. Alguns estímulos ambientais, a exemplo de infecções, vacinas e traumas emocionais também apresentam estreita relação com o desenvolvimento da artrite reumatoide (MULLER-LADNER, 2010).

O tratamento inicia com a educação do paciente e seus familiares sobre a doença e o tratamento, com seus riscos e benefícios. O paciente deve ser constantemente avaliado, preferencialmente, por uma equipe multidisciplinar. O tratamento farmacológico varia de acordo com o estágio da doença, assim como com sua atividade e severidade (LAURINDO et al., 2009).

Os objetivos do tratamento da artrite reumatoide são voltados com vistas a aliviar a dor, reduzir a inflamação, evitar ou reduzir os danos nas articulações, melhorar a função e trazer bem-estar e qualidade de vida ao paciente (ALBERS et al., 2005). São comumente utilizados medicamentos que auxiliam na remissão dos sintomas como dor e inflamação, sendo destaque para os anti-inflamatórios não esteroidais, a exemplo do naproxeno, ibuprofeno e alguns analgésicos, como o acetaminofeno e o propoxifeno,

além dos glicocorticoides, como é o caso da cortisona e prednisona (DAVIS et al., 2007).

Além desses medicamentos, há também aqueles que possuem a capacidade de modificar o curso da doença, os chamados fármacos antirreumáticos modificadores da doença, sendo o metotrexato o mais utilizado (PISETSKY, 2003). Existem alvos terapêuticos que são conhecidos como modificadores de respostas biológicas, eles são o infliximab e o etanercept, que atuam como bloqueadores do TNF α , assim como a anakinra que atua como antagonista da IL-1. Ambos apresentam custos elevados e sua administração por via parenteral limitam o uso (FURST et al., 2012).

A escolha de um fármaco, por sua vez, é condicionada à gravidade da doença, às características individuais e à condição econômica do paciente (RAZA et al., 2006). O tratamento também contempla outras medidas, como o repouso, dieta adequada, fisioterapia e acompanhamento com profissional de educação física (KITSIS, 2010).

Em casos avançados, pode haver indicação de um tratamento cirúrgico. Em casos de lesão estrutural, recomenda-se, se necessário, diferentes tipos de técnicas cirúrgicas, a exemplo da sinovectomia, utilizada em casos de sinovite persistente por mais de seis meses, correções de tendões, utilização de próteses e até em casos de artroplastia total (CAILLIET, 2001).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Tipo de estudo e Local de realização

Pesquisa básica, delineada nos moldes da pesquisa experimental. Os testes *in vitro* e *in vivo* foram realizados no laboratório de Farmacologia e Imunidade pertencente ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – LaFI/ICBS-UFAL, coordenado pelas Professoras Doutoras Eliane Aparecida Campesatto e Magna Suzana Alexandre Moreira.

5.2 Material botânico

As folhas da *C. spiralis* foram coletadas no município do Crato (região do cariri, estado do Ceará, Brasil), no ano de 2012 e a identificação botânica foi realizada no Herbário Prisco Bezerra (Universidade Federal do Ceará), onde a exsicata foi depositada sob o número 044500.

5.3 Preparo e obtenção das frações de *C. spiralis*

Todos os procedimentos de extração e fracionamento foram realizados no BioMol-Lab (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas – Universidade Federal do Ceará) sob orientação do professor Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha no ano de 2012.

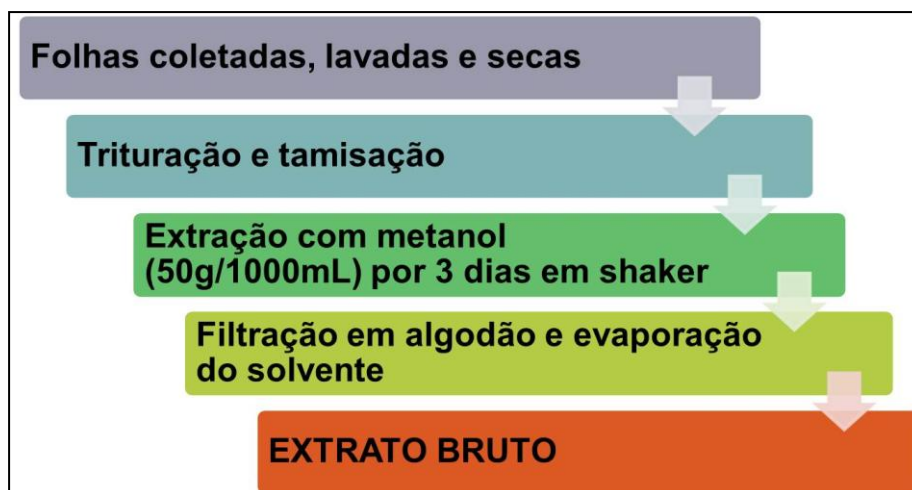
Inicialmente, as folhas da *C. spiralis* foram coletadas, lavadas com água destilada e passaram pelo processo de secagem à temperatura ambiente (~25 °C). Já com o material seco, o segundo passo foi triturar as folhas (tritador) e tamisar o material para separar as partículas de menor grau de divisão.

Após a obtenção do pó, iniciou-se o processo de extração a frio, utilizando metanol (na proporção de 50 g de material vegetal para 1000 mL de solvente em um erlenmeyer) e um agitador do tipo Shaker. A agitação perdurou por um período de três dias, sendo interrompida diariamente para uma agitação manual por alguns minutos. Feita a extração, a amostra foi filtrada em algodão com o auxílio de um funil de vidro para separar o extrato da matéria orgânica que foi acondicionado em recipiente de vidro âmbar.

O solvente foi evaporado com o auxílio de um rotaevaporador a uma temperatura, inferior a 50 °C e o extrato concentrado foi colocado em uma placa de petri (previamente pesada), onde teve o restante de solvente evaporado utilizando-se um banho-maria, também com temperatura inferior a 50 °C e por tempo necessário à completa evaporação.

Foi observado que o rendimento aproximado da extração gira em torno 6% (3 g de extrato metanólico bruto a cada 50 g de material vegetal) (Figura 7).

Figura 7– Etapas do processo de extração.



Fonte: SILVA, 2013.

O fracionamento do extrato foi realizado através de uma coluna de vidro, com sílica gel (SiO_2) como fase estacionária e solventes de diferentes polaridades como fase móvel (Figura 8).

O aparato da coluna foi montado em uma capela, a sílica acondicionada com o solvente de início (hexano) e o material vegetal (macerado com auxílio de almofariz e pistilo) depositado na parte superior da coluna. Foi padronizada a proporção de 1:15 (1g de extrato bruto e 15g de SiO_2). A quantidade de cada solvente utilizado foi uma proporção de oito vezes o volume de sílica na coluna (calculada pela equação: $V_{\text{SiO}_2} = \pi \cdot r^2 \cdot h$, onde “r” é o raio da coluna e “h” a altura que a sílica ocupa na coluna, em cm). Observou-se na coluna utilizada (1,0 cm de raio) que 15,0 g de SiO_2 atinge uma altura de aproximadamente 10 cm.

Portanto, aplicando os valores na equação chegamos ao volume de 30 mL, ou seja, a quantidade de cada solvente a ser utilizada foi de 240 mL (8 vezes o volume de sílica).

As frações foram acondicionadas em vidro âmbar e em seguida tiveram o solvente evaporado com o auxílio de placas de Petri (previamente pesadas) no banho-maria com temperatura inferior a 50 °C.

Figura 8 – Fracionamento do extrato bruto da *C. spiralis*. A (fase clorofórmica); B (fase metanólica).



Fonte: SILVA, 2013.

5.4 Ensaios farmacológicos

5.4.1 Substâncias

As frações testadas (FCCS e FMCS) foram suspensas em CMC 5% (carboximetilcelulose) com o auxílio de quantidade suficiente do tensoativo Tween 80[®].

Para realização dos experimentos foi utilizado adjuvante completo de Freund (Sigma) 1 mg/mL), na dose de 20 µL/animal, via intraplantar, uma única vez no primeiro dia do teste de artrite. No dia seguinte, foi administrada solução salina de Cloreto de sódio (NaCl 0,9%) na dose de 10 mg/kg via oral (v.o.), durante 7 dias, posteriormente aos 14 dias da indução da artrite. Como fármaco padrão foi utilizada Dexametasona, na dose de 1 mg/kg, v.o, durante 7 dias, posteriormente aos 14 dias da indução da artrite

5.4.2 Ensaio de Viabilidade Celular pelo método de MTT

Para o ensaio da viabilidade celular, foram plaqueados em placa de 96 poços, macrófagos da linhagem J774.A1 numa concentração de 5×10^4 células por poço cultivados em meio DMEM (meio Dulbecco modificado por Eagle) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Foi adicionado 200 µL do meio com as células em cada cavidade. As células foram tratadas com as FCCS e FMCS nas concentrações de 0,05, 0,5, 1,5, 5, 15, 50 e 100 µg/mL por 24 h e mantidas em estufa a 5% de CO₂.

Uma hora antes de adicionar o MTT, três poços foram lisados com 2 µL de Triton 100X para comparação de morte celular. Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e adicionado em cada poço 100 µL de uma solução de MTT (500 µg/mL) e reincubadas por 1 h em estufa a 37° C e a 5% de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspensionado com 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a placa foi lida imediatamente com o auxílio de um leitor de microplacas no comprimento de onda 530 nm. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade celular e o estado metabólico da célula a partir da redução do sal

de tetrazólio (coloração amarela) a formazan (coloração azul escuro), sendo bastante útil para avaliar a citotoxicidade (MOSMANN, 1983).

5.4.3 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss*, fêmeas (6 a 8 semanas), pesando entre 25-35 g, provenientes do Biotério Central da UFAL. Após o período de desmame, os animais foram alimentados com ração própria para este tipo de roedores e água mineral em quantidade suficiente.

Os animais foram mantidos em grupos de 5 por caixa, 2 dias antes dos procedimentos experimentais para fins de adaptação, mantidos em gaiolas do tipo Kaefiq produzida em polipropileno, autoclavável, resistente a ácidos, nas medidas 30x20x13 – LxCxA), com grade aramada de aço inoxidável contendo comedouro e encaixe para bebedouro, onde serão aclimatados a 22 ± 2 °C, em um ciclo claro-escuro de 12/12h (fase escura: 19:00 às 07:00h) e tratados com água e ração *ad libitum*. Antes da realização dos ensaios farmacológicos, os animais foram mantidos em jejum por um período de 8 horas, com livre acesso à água. Todos os experimentos foram realizados no período de 08h00 às 16h00 horas.

Durante os experimentos, foram utilizadas técnicas de imobilização animal em consonância com os métodos preconizados pelo Comitê de Ética para utilização de animais de laboratório. Ao término dos ensaios, os animais foram sacrificados e, posteriormente, congelados e armazenados, até o recolhimento de materiais biológicos realizados pela empresa SERQUIP Tratamentos de Resíduos AL Ltda., empresa responsável pela coleta e posterior descarte seguro de materiais biológico, infectocontagiosos e perfurocortantes, através de cronograma estabelecido previamente pelo ICBS.

Todos os animais utilizados neste trabalho foram manipulados de acordo com normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFAL (protocolo nº 040/2018) – **Anexo 1**.

5.4.5 Padronização do modelo de indução da artrite induzida por Adjuvante Completo de Freund

Este ensaio consiste na administração de 20 μ L de adjuvante completo de Freund (emulsão viscosa, incolor, constituída de 85% de óleo mineral, 15% de emulsificante com 500 μ g de *M. tuberculosis* inativada por mililitro de emulsão - 1 mg/mL) por via intraplantar na face dorsal da pata do camundongo.

O ensaio teve uma duração de 21 dias, nos quais os animais foram pesados diariamente e o volume de suas patas foi mensurado com auxílio de pletismômetro após a realização da indução da artrite no dia zero.

A partir do 14º dia, com exceção do grupo branco (onde não houve indução de artrite, nem tratamento com substâncias), os animais foram tratados de acordo com o seguinte planejamento, conforme mostra a **Tabela 1**: grupo controle negativo – tratamento com veículo (solução salina, NaCl 0,9%), 10 mL/kg, v.o.; grupo controle inflamatório (com indução de artrite e sem tratamento; grupo controle positivo – tratamento com dexametasona, 1 mg/kg, v.o.; grupos testes – tratamento com FCCS ou FMCS, nas doses de 100 mg/kg cada, v.o. O tratamento foi mantido até o 21º dia de tratamento. No 22º dia, os animais foram eutanasiados e o baço, estômago, fígado e rim foram removidos de cada animal para análise macroscópica. Os estômagos foram pesados e analisados em uma lupa quanto a possíveis lesões gástricas seguindo os scores: 0,5 – vermelhidão; 1,0 – pontos ulcerosos; 1,5 – estrias hemorrágicas; 2,0 – úlceras \leq 5; úlceras $>$ 5.

A pontuação média de cada grupo tratado, menos a média da pontuação do grupo controle, foi considerado como índice de gravidade de lesão da mucosa gástrica (CIOLI et al., 1999).

Tabela 1 – Distribuição dos animais por grupo no ensaio de artrite induzida por Adjuvante Completo de Freund.

<i>Ensaio de artrite induzida por adjuvante completo de Freund</i>				
<i>Grupo</i>	<i>Substância</i>	<i>Dose</i>	<i>Via de Administração</i>	<i>Quantidade de Animais</i>
1	Sem tratamento e sem indução de artrite	<i>Não se aplica</i>	<i>Não se aplica</i>	6 (fêmeas)
2	Solução Salina (NaCl 0,9%)	10 ml/Kg	v.o.	6 (fêmeas)
3	Dexametasona	1 mg/Kg	v.o.	6 (fêmeas)
4	FCCS	100 mg/Kg	v.o.	6 (fêmeas)
5	FMCS	100 mg/Kg	v.o.	6 (fêmeas)
			Total	30 (fêmeas)

5.5 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média, conforme indicado nas legendas das tabelas e figuras e as diferenças estatísticas entre os grupos experimentais e controle foram verificadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Dunnet*. Os valores foram considerados significantes quando $p^* < 0,05$. Todas as análises foram realizadas no tutorial GraphPad Prism[®], versão 5.0.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Preparo e obtenção das frações de *C. spiralis*

No final do processo extrativo, podemos observar que o extrato bruto tem como características uma consistência pastosa, de cor escura (marrom esverdeado). Utilizando-se 50,0 g das folhas da *C. spiralis*, o rendimento médio é de 3,0 g de extrato bruto.

Já as frações apresentaram uma consistência um pouco mais sólida e uma tonalidade mais clara (marrom claro). A partir dos 3,0 g de extrato bruto foi obtido as frações que foram avaliadas quanto às propriedades farmacológicas. O rendimento médio das frações está descrito na **tabela 2**.

Tabela 2 – Rendimento médio das frações da *C. spiralis* a partir de 3,0 g de extrato bruto.

Frações	Rendimento (mg)	%
FCCS	30	1
FMCS	160	5,3

Fonte: SILVA, 2013.

6.2 Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT

Os ensaios de citotoxicidade fornecem, prioritariamente, informações sobre diferentes funções ou compartimentos celulares, tais como a perda seletiva da permeabilidade celular, a redução da função mitocondrial e as mudanças na morfologia e replicação celular (AZEVEDO, 2005).

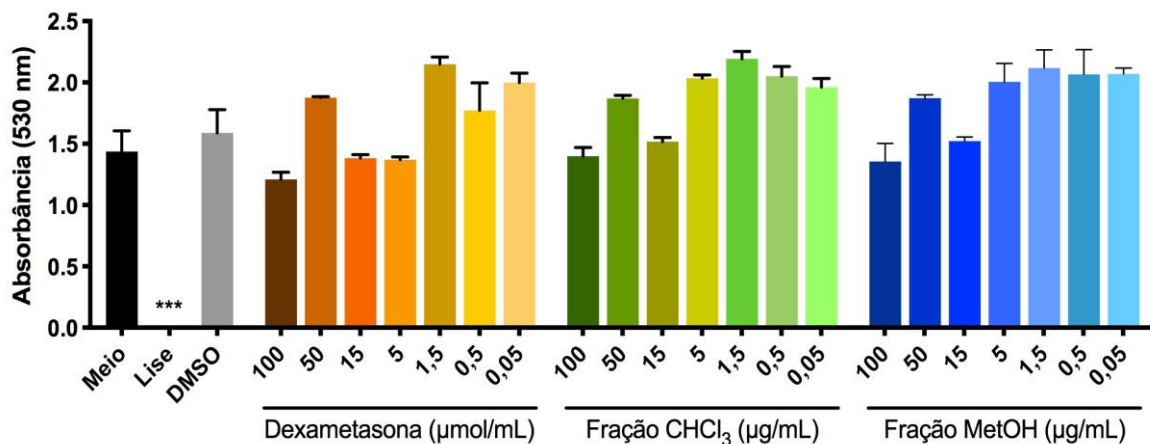
No entanto, a perda da função mitocondrial é uma das respostas mais comuns e pode ser utilizada como sinal precoce de citotoxicidade (MELO et al., 2006). Inicialmente foi investigado um possível efeito tóxico das frações de *C. spiralis* através do ensaio de viabilidade celular, utilizando macrófagos da linhagem J774 A1, foi possível avaliar o possível efeito citotóxico.

A citotoxicidade é um fator limitante para a liberação e consumo de fármacos, sendo assim, a análise da citotoxicidade associada à atividade biológica de um composto são fatores primordiais para determinar sua aplicação, bem como seu índice terapêutico (FRESHNEY, 2009).

O método de MTT é um ensaio colorimétrico que avalia a atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do sal de MTT à formazan pela atividade destas enzimas. Desta forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Os resultados obtidos, conforme mostra o **Gráfico 1**, demonstraram que não houve redução da viabilidade celular dos grupos tratados com as concentrações de 0,05, 0,5, 1,5, 5, 15, 50 e 100 µg/mL FCCS e FMCS, em comparação com o grupo controle. Analisando o fármaco padrão, a dexametasona, observa-se que houve uma redução da viabilidade celular na concentração de 100 µmol/mL em relação às demais concentrações, contudo não significativa.

Gráfico 1 – Efeito da FCCS e FMCS no ensaio de MTT



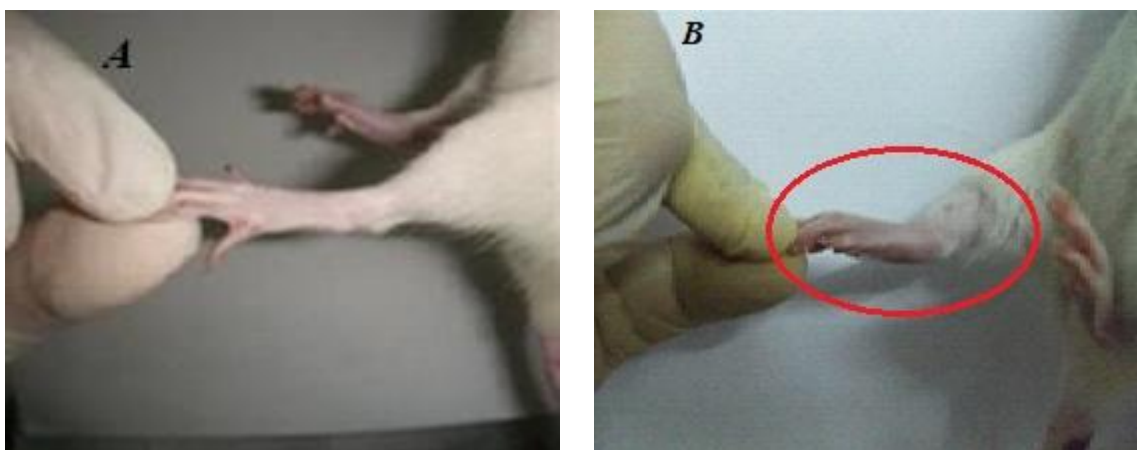
Nota: Os dados representam a média \pm e.p.m. dos grupos tratados comparados ao controle através de uma Análise de variância (One-way ANOVA), seguidos do Teste de *Dunnet*, onde foram considerados significantes quando $***p < 0,001$.

Para que determinada substância seja aprovada no ensaio de citotoxicidade *in vitro*, não deve ocasionar a morte celular ou afetar suas funções (ROGERO et al., 2003). Não foram constatados neste estudo sinais de citotoxicidade para a FCCS e FMCS. Estes resultados representam indícios de segurança na utilização terapêutica da espécie vegetal nos testes pré-clínicos *in vivo*.

6.3 Ensaio de artrite induzida por adjuvante completo de Freund

A artrite foi estabelecida em todos os camundongos pela administração do adjuvante completo de Freund. Como esperado, os animais controle não apresentaram nenhuma alteração no diâmetro da pata, uma vez que nestes foram administrados apenas salina (**Figura 9 A**). Nos animais que receberam o adjuvante observou-se inflamação na pata administrada (**Figura 9 B**).

Figura 9 - Pata dos camundongos no ensaio de artrite induzida por adjuvante completo de Freund.

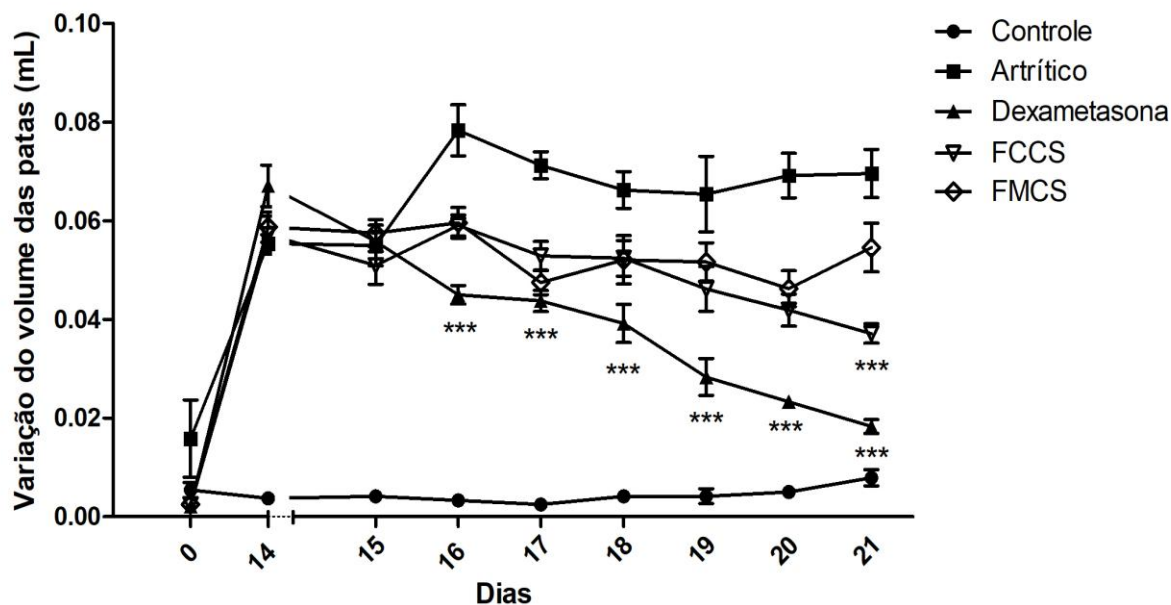


Fonte: Autor, 2019.

Nota: animal Controle normal (A) e animal artrítico administrado com adjuvante (B) após 14 dias de indução da artrite → eritema e edema na pata direita do animal artrítico causados pela administração do Adjuvante Completo de Freund.

O tratamento com FMCS não foi capaz de reduzir o volume da pata estimulada pelo adjuvante completo de Freund, quando comparada ao controle positivo, durante os sete dias de tratamento. Por outro lado, a FCCS causou uma inibição estatisticamente significativa do tamanho da pata (**p < 0,001) quando comparada ao controle positivo a partir do 19º dia. O fármaco padrão utilizado, dexametasona, foi capaz de inibir o aumento de volume da pata significativamente no período de 18 a 21 (**Gráfico 2**).

Gráfico 2 – Efeito da FCCS e FMCS no ensaio de artrite induzida por Adjuvante Completo de Freund



Nota: Os dados representam a média \pm e.p.m. dos grupos comparados ao controle através de uma Análise de variância (One-way ANOVA) seguidos do Teste de Dunnet, onde foram considerados significantes quando $***p < 0,001$.

O modelo de artrite induzida por adjuvante em camundongos é amplamente utilizado para avaliação da atividade anti-inflamatória crônica de diversos compostos. É um experimento imunopatológico que apresenta características semelhantes à artrite reumatoide em humanos. Neste modelo, a artrite se desenvolve dentro de duas semanas e é caracterizada por edema de pata, bem como o desenvolvimento de lesões inflamatórias.

A artrite reumatoide é uma desordem sistêmica autoimune caracterizada por hiperplasia sinovial e inflamação crônica e dor nas articulações persistentes (CALABRESI et al., 2018). Embora as causas exatas da artrite reumatoide permaneçam desconhecidas, desregulação imunológica por citocinas inflamatórias pode estar envolvidos no seu desenvolvimento (WANG et al., 2005).

Na artrite reumatoide são produzidos altos níveis de IL-1 e TNF- α , que desempenham papéis essenciais na progressão da destruição conjuntiva e proliferação da membrana sinovial. Estudos demonstraram que a IL-1 e TNF- α reforçam a proliferação de fibroblastos, estimulam a produção de PGE2, aumento da expressão de citocinas e colágeno por células sinoviais. O TNF- α exerce a sua atividade através da indução de IL-1 (AKRAMAS, 2017).

Assim, a IL-1 e TNF- α são dominantes na indução de inflamação e erosão óssea. Prostaglandinas estão envolvidas em uma série de atividades biológicas relevantes para a patogênese da artrite. Estudos sugerem que alguns dos aspectos pró-inflamatórias da doença são mediados por PGE2. A neutralização da PGE2 com anticorpos monoclonais reduziram tanto os sinais inflamatórios quanto os níveis de marcadores de doença (XU et al., 2010).

Corroborando com os achados do presente estudo, foram vistos na literatura dois estudos que versam sobre a ação da FCCS e FMCS em outras espécies de *Costus*. O primeiro estudo avalia os efeitos da fração metanol de *Costus spicatus* em modelos animais. Para tanto, foi utilizado o modelo de artrite induzida por carragenina. Os animais receberam doses da fração metanol de *C. spicatus*, nas concentrações de 200 e 400 mg / kg (i.p.).

Ambas as concentrações não apresentaram redução do volume da pata, o fato é que a toxicidade do metanol é considerada baixa, porém, no seu processo metabólico, é produzido aldeído fórmico e ácido fórmico, os quais podem diminuir o processo de absorção (ONAJOBİ et al., 2014).

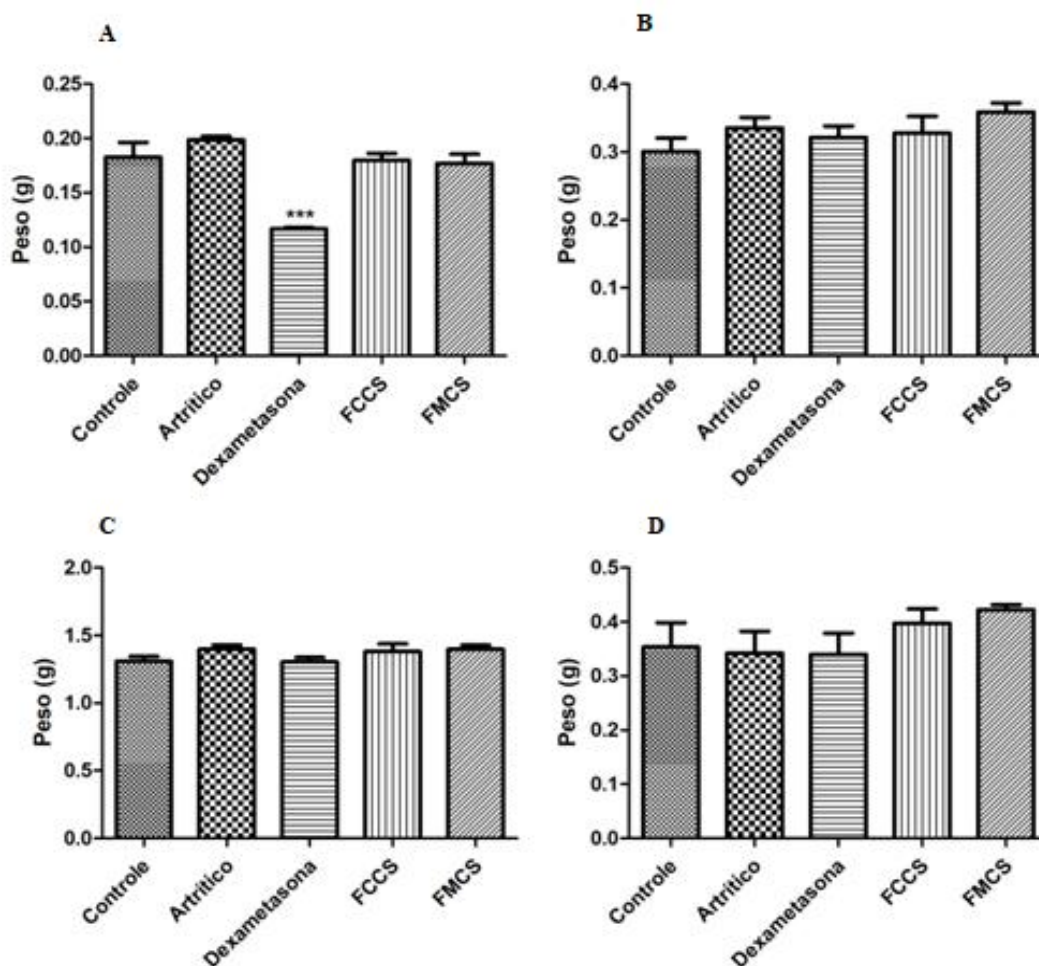
Quintans e colaboradores (2010) trouxeram em seu estudo a atividade anti-inflamatória da fração clorofórmio de *Costus afer* em modelos de ratos artríticos. Os animais controle nos quais a artrite foi induzida com carragenina, ácido araquidônico, formaldeído ou CFA apresentaram aumentos significantes ($P < 0,05$) no edema de pata quando comparados aos animais normais. O tratamento dos ratos com a fração clorofórmio de *C. afer* na dose de 100 mg/kg v.o. suprimiu o edema. O clorofórmio possui ação anestésica, que ocorre devido ao fato deste ser muito volátil, desta forma ele absorve calor da pele, a qual tem temperatura diminuída, o que faz com que os nervos sensitivos que mandam as informações ao cérebro ficam inativos e a sensação de dor é diminuída.

É interessante considerar que os animais utilizados neste experimento possuem uma postura quadrúpede e não uma postura bípede, como a humana. O animal quadrúpede apresenta boa estabilidade, pois ao caminhar, desloca a projeção do seu centro de gravidade em uma base retangular, formada pelos quatro membros. Já o centro de gravidade do ser humano quando caminha, se desloca apenas poucos centímetros, pois os pés se localizam próximos à linha média do corpo, possuindo menos estabilidade na marcha, e assim, exigindo mais dos músculos e das articulações dos membros inferiores (BORGES FILHO; ALMEIDA, 2004)

Considerando também que, neste estudo, foi realizada uma monoartrite, ou seja, a indução de artrite apenas em uma pata, durante a deambulação os animais permaneceram com três patas “livres de dor” para o apoio (não é possível afirmar que estes animais não sentiram dor nas outras patas). Em humanos, isto não seria possível, devido ao apoio bipodal e pela característica simétrica da artrite reumatoide.

Depois da eutanásia dos animais foram retirados baço, estômago, rim e fígado para pesagem e análise macroscópica, respectivamente. O **Gráfico 3** demonstra que o tratamento com nenhuma das frações testadas foi capaz de reduzir a massa do baço, tal qual é vista quando este parâmetro foi estatisticamente significativo para o grupo tratado com dexametasona (***) $p < 0.001$), um glicocorticoide que se caracteriza por apresentar ação imunossupressora.

Gráfico 3 - Média de peso dos órgãos dos camundongos submetidos ao tratamento com veículo, dexametasona ou frações de *C. spiralis* no ensaio de artrite induzida por adjuvante de Freund



Nota: A – média do peso dos baços; B – média do peso dos estômagos; C – média do peso dos fígados; D – média dos pesos dos rins. Os dados representam a média \pm e.p.m. dos grupos comparados ao controle através de uma Análise de variância (*One-way* ANOVA) seguidos do Teste de *Dunnet*, onde foram considerados significantes quando $***p < 0,001$.

Como imunossupressor, a dexametasona atua na redução da concentração de linfócitos dependentes do timo, monócitos e eosinófilos, na inibição à síntese ou liberação de interleucinas, na estimulação do catabolismo, como também no aumento à disponibilidade de glicose (TURESSON, 2013).

Para exercer seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, os corticóides inibem a liberação de mediadores químicos da inflamação. Assim, inibem a via do ácido araquidônico através da inibição da enzima fosfolipase A2, as aminas vasoativas, os radicais livres do oxigênio, as citocinas, e na reação alérgica reduzem a expressão das moléculas de adesão e a liberação de mediadores de neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, monócitos, plaquetas e linfócitos (DIASIO, 2016). Dessa forma, em doses terapêuticas, reduzem a amplificação e a cronificação do processo, além de diminuir a repercussão clínica da inflamação.

Ao contrário dos anti-inflamatórios não esteróides (AINE), que são drogas ulcerogênicas da mucosa gastroduodenal por inibição na síntese de prostaglandinas, não há definição se os glicocorticóides causam danos à mucosa gástrica, se predispõe a mucosa aos danos induzidos por outros agentes e se interferem apenas com o reparo dos danos existentes.

7. CONCLUSÃO

- A FCCS e FMCS de *C. spiralis* não foram tóxicas para macrófagos J774.A1;
- O tratamento com a FCCS de *C. spiralis* foi capaz de reduzir o volume do edema de pata no ensaio de artrite induzida por Adjuvante Completo de Freund;
- Os resultados obtidos neste trabalho dão suporte não somente à pesquisa com plantas medicinais, como também à pesquisa por novos fármacos analgésicos e anti-inflamatórios;
- Novos estudos são necessários para definição dos mecanismos de ação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das FCCS e FMCS da *C. spiralis*, porém os resultados encontrados comprovam o uso popular da planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEREM, A.; SMITH, K. D. A. A systems approach to dissecting immunity and inflammation. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 16, n.1, p. 55-67, 2005.

ABELL, J. I. et al. Physical activity and health related quality of life among people with arthritis. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 59, n.8, p. 380-385, 2010.

ABRAMSON, S. B. et al. The role of nitric oxide in tissue destruction. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 15, n. 5, p. 831-845, 2013.

AKRAMAS, L. Anti-inflammatory effect of herbal preparations on adjuvant arthritis in rats. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 41, n. 6, p. 748-756, 2017.

ALBERS, J. M. C. et al. Treatment strategy, disease activity, and outcome in four cohorts of patients with early rheumatoid arthritis. **Medical Hypotheses**, v. 60, n. 3, p. 453-458, 2005.

ALBUQUERQUE, J. M. Plantas medicinais de uso popular. **Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior (ABEAS)**. Canoas, v. 27, n. 1, p. 17, 2011.

ALLER, M. A. et al. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**, v. 68, n. 3, p. 202-209, 2007.

ANTUNES, A. S.; SILVA, B. P. Flavonol glycosides from leaves of *Costus spiralis*. **Revista Brasileira de Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p.507-510, 2010.

ARAÚJO, M. V. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólico do caule de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (COSTACEAE)**. 2010. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Farmácia) – Escola de Enfermagem e Farmácia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2010.

ARAÚJO, F. P.; OLIVEIRA, P. E. Biologia floral de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (*Costaceae*) e mecanismos para evitar a autopolinização. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 1, p. 61-70, 2010.

AZEVEDO, M. M. M. **Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulando violaceína: caracterização, atividade biológica, consequências e perspectivas**. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química – IQ. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, SP, 2005.

- BARBOSA, W. L. R. et al. Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais. **Revista Científica da UFPA**. Belém-PA. v. 4 , n. 2, p. 115-121, 2012.
- BARROS, I. M. C. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Pluchea quitoc* ethanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 317-320, 2006.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Brazilian Journal Pharmacology**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2015.
- BELL, J. K. et al. Involvement of histamine h4 and h1 receptors in scratching induced by histamine receptor agonists in Balb C mice. **Brazilian Journal Pharmacology**, v. 142, n.12, p. 374-380, 2004.
- BRAGA, F. G. et al. Activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal. Ethnopharmacol**, v. 111, n. 9, p. 396-402, 2017.
- BRANDÃO, L. Avaliação da qualidade de vida na artrite reumatoide: revisão atualizada. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.37. n.5, p. 88-95, 2010.
- BRANDÃO, M. G. L. et al. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.3, p. 408-420, 2006.
- BRASIL. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. **Decreto da Presidência da República nº. 5.813, de 22 de junho, Ministério da Saúde GM/MS nº 971**, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Farmacêuticos. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de plantas medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas**. Artrite Reumatóide. Portaria SAS/MS, n. 865, 2017.
- BRITTO, M. R.; SENNA-VALLE, L. Plantas medicinais utilizadas na comunidade caiçara da Praia do Sono, Paraty, Rio de Janeiro, Brasil. **Sociedade Botânica Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 363-372, 2011.
- BROWN, N. J.; ROBERT II, L. J. Histamina, bradicinina e seus antagonistas. **As bases farmacológicas da terapêutica**, v. 25, n. 5, p. 485-502, 2006.
- BROCHU, S. M.; OLIVIER, S. Neuronal activity and transcription proinflammatory cytokines, ikappabalpha and iNOS in the mouse brain during acute endotoxemia and chronic infection with *Trypanosoma brucei*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, n. 6, p. 801-816, 2009.

BOORHEM, R. L.; LAGE, E. B. Drogas e Extratos Vegetais Utilizados em Fitoterapia, **Revista Brasileira de Fitoterapia**, Rio de Janeiro. v. 4, n.1, p. 37-55, 2009.

CAI, X.; et al. Manipulation of the induction of adjuvant arthritis in Sprague-Dawley rats. **Inflammation Research**, v. 55, p. 368-377, 2010.

CALABRESI, E. et al. One year in review: pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 36, n. 2, p. 175-184, 2018.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n. 6, p. 131-134, 2018.

CANNON, G. W.; WOODS, M. L.; CLAYTON, F. Induction of arthritis in DA rats by Incomplete Freund's Adjuvant. **The Journal of Rheumatology**, v. 20, n. 7, p. 38-54, 2013.

CARVALHO, M. R. P. et al. Artrite reumatoide: treinamento cardiovascular. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 40. n. 2, p. 88-98, 2010.

CARVALHO, E. S.; FERRAZ, M. B.; CICCONEI, R. M. *Mycobacterium Tuberculosis* versus artrite reumatoide: associação ou relação causal? Um século de história. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.42. n.2, p. 69-77, 2012.

CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, n. 3, p. 487-517, 2011.

CEOLIN, T. et al. Plantas Medicinais: transmissão do conhecimento nas famílias de agricultores de base ecológica no Sul do Rio Grande do Sul. **Revista da Escola de Enfermagem**, São Paulo, v. 45, n.1, p.47-54, 2011.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: uma revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; ROSS, K. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic and antipyretic drugs: cloning, structure and expression. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 10, p. 13926-13931, 2005.

CHATAM, W. W. et al. Degradation of human articular cartilage by neutrophils in synovial fluid. **Arthritis and Rheumatism**, v. 36, n. 4, p. 51-58, 2013.

CHEN, L. et al. The integrin-ligand interaction regulates adhesion and migration through a molecular clutch. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 7, n. 7, p. 402-422, 2013.

CHENG, J. K.; JI, R. R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **Neurochemistry Research**, v. 33, n. 2, p. 1970-1978, 2012.

CIOLI, V. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. **Journal Neurosciense**, v. 50, n. 1, p. 283-289, 1999.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. **Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal**, 2004.

CORRÊA, P. M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultiváveis. **Imprensa Nacional do Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal**. Rio de Janeiro, v. 20, n.1, p. 4324, 2014.

COSTA, V. P.; HAYASHI, A. H.; CARVALHO, M. A. M. Aspectos fisiológicos, anatômicos e ultra-estruturais do rizoma de *Costus arabicus* L. (*Costaceae*) sob condições de déficit hídrico. **Hoenhea**, v. 39, n. 3, p. 125-137, 2012.

COSTA, M. C.; SUTTER, P.; GYBELS, J. Adjuvant-induced arthritis in rats: a possible modelo of chronic pain. **Pain**, v. 10, n. 2, p. 173-185, 2008.

COSTIGAN, M. et al. T-cell infiltration and signaling in the adult dorsal spinal cord is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity. **Journal Neurosciense**, v. 18, n. 29, p. 14415-14422, 2011.

COLDWEEL, J. R. et al. Increased responsiveness of rat colonic splanchnic afferents to 5-HT after inflammation and recovery. **Journal of physiology**, v. 579, n. 1, p. 203-213, 2007.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. **Robbins pathologic basis of disease**, v. 20, n. 3, p. 63-72, 2009.

COOK, C. D.; MOORE, K. I. Effects of sex, hindpaw injection site and stimulus modality on nociceptive sensivity in arthritic rats. **Physiology & Behavior**, v. 87, n. 7, p. 552-562, 2010.

CUNHA, F. A. B. et al. *In Vitro* Antibacterial, Phototoxic, and Synergistic Activity of Ethanol Extracts from *Costus cf. arabicus* L. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 1, p. 964-968, 2011.

CUNHA, F. Q. Dor Inflamatória. In: ALVES NETO, O. (Org.). Dor: princípios e prática. Porto Alegre: **Artmed**, v. 11, n. 1, p. 147-212, 2011.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 1, n. 5, p. 1755-1760, 2015.

CURY, L. **Uso de plantas medicinais da tradição popular é regulamentado**. Brasil: Anvisa; 2010. Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+noticias+anos/2010+noticias/uso+de+plantas+medicinais+da+tradicao+popular+e+regulamentado>>. Acesso em: 11 de Março de 2019.

CRUS, M.; BRANCO, J. C. Artrite Reumatóide: fatores de prognóstico e seguimento. **Acta Reumática Portuguesa**, v. 27, n. 3, p. 183-190, 2012.

CRUZ, G. L. **Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil**. Belo Horizonte, p. 863, 2010.

CZARNECKI, R.; GRZYBEK, J. Antiinflammatory and vasoprotective activities of polysaccharides from fruit bodies of higher fungi. **Phytoterapy Research**, v. 9, n. 1, p. 123-127, 2005.

DAHER, J. B.; MELO, M. D. Evidence for a spinal serotonergic control of the peripheral inflammation in the rat. **Life Sciences**, v. 76, p. 489-491, 2005.

DA MATTA, C. B. B. et al. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activity from Algae of the Genus *Caulerpa*. **Marine Drugs**, v. 9, n. 1, p. 307-318, 2012.

DAVIS, D. et al. Anaemia of chronic disease in rheumatoid arthritis: in vivo effects of tumor necrosis factor alpha blockade. **Arthritis and Rheumatism**, v. 36, n. 9, p. 950-956, 2007.

DENG, G. M.; LEONARDO, M. The role of immune cells and cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Drug Discovery Today**, v. 3, n. 2, p. 163-168, 2009.

DE VITA, S. et al. Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence for a pathogenetic role of B cells. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 5, p. 2029-2033, 2012.

DI STASI, L. C. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica, 2ª Ed. Fundação da Editora UNESP, p. 608, 2012.

DIASIO, R.B. ; LOBUGLIO, A.F. Imunomoduladores: agentes imunossupressores e imunoestimulantes. In: A base farmacológica de terapêutica. **The Journal of Immunology**, v. 16, n. 1, p. 1292-308, 2016.

DONALDSON, L. F.; SECKL, J. R. A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: effects of adjuvant dose. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 49, n. 3, p. 5-10, 2003.

DUNFORD, P. J. et al. The histamine h4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 11, p. 7062-7070, 2006.

DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2006.

ELLIOTT, E. R. et al. A. Deletion of Syk in neutrophils prevents immune complex arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 15, n. 8, p. 4319-4330, 2011.

FANG, J. et al. The chemokine, macrophage inflammatory protein-2gamma, reduces the expression of glutamate transporter-1 on astrocytes and increases neuronal sensitivity to glutamate excitotoxicity. **Journal Neuroinflammation**, v. 12, n. 9, p. 267, 2013.

FAGUNDES, R. L.; COSTA, Y. R. Uso dos alimentos funcionais na alimentação. **Higiene Alimentar**, v.7, n.108, p. 42-48, 2013.

FEIN, A. Nociceptors and the perception of pain. Connecticut : University of Connecticut - Health Center, 2014.

FERREIRA, S. H. et al. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: **Academia Brasileira de Ciências**, v. 24, n. 2, p. 131-137, 2010.

FILHO, R. F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2002.

FLOR, H. Painful memories. **EMBO reports**, v. 3, n. 4, p. 288-291, 2002.

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. **The Journal of Immunology**, v. 39, n. 3, p. 88-96, 2009.

FONSECA, C. S. et al. Terapias sistêmicas e oncologia veterinária. **Nosso Clínico – Medicina Veterinária para Animais de Companhia**, v. 30, n. 3, p. 28-38, 2002.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia Clínica: Fundamentos da terapêutica racional**. Rio de Janeiro: G. Koogan., 2016.

FURST, D. E. et al. Update consensus statement on tumor necrosis factor blocking agents for the treatment of rheumatoid arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 59, n. 3, p. 1-12, 2012.

GAUTAM, R.; JACHAK, S. M. Recent Developments in Anti-Inflammatory Natural Products. **Medicinal Research Reviews**, v.29, n. 5, p.767-820, 2010.

GASPARRI, S. Tese – **Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus***. Canoas – RS, p. 79, 2015.

GILROY, D.W. et al. A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. **Faseb Journal**, v. 18, n. 1, p. 489-498, 2014.

GOLDING, D. N. Reumatologia em medicina e reabilitação. São Paulo: **Editora Atheneu**, 2011.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COST, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. The chemokines and their receptors: characteristics and physiological functions. **The Journal of Immunology**, v. 24, n. 4, p. 967-76, 2013.

GRELLNER, W. Time-dependent imunohistochemical detection of pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF) in human skin wounds. **Forens Science**, v. 130, n. 3, p. 90-96, 2009.

- HABSAH, M. et al. Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities, **Journal Ethnopharmacol**, v. 72, n.3, p. 403-10, 2004.
- HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 1, p. 413-421, 2013.
- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19, p. 894-901, 2008.
- HIKIJI, H. et al. The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. **Pathophysiology**, v. 47, n.2, p. 107-126, 2008.
- HOEFFEL, J.L.M. et al. Conhecimento tradicional e uso de plantas medicinais nas APA's Cantareira/SP e Fernão Dias/MG. **Revista Visões Transdisciplinares sobre Ambiente e Sociedade**, v. 11, n. 1, p. 1-25, 2013.
- HOLUB, B. J. et al. Functional Foods: biochemical and processing aspects. Washington: **Pathophysiology**, v. 11, n. 3, p. 213-279, 2013.
- HUANG, J. F.; THURMOND, R. L. The new biology of histamine receptors. **Pathophysiology**, v. 8, n.1, p. 21-27, 2008.
- IIGO, Y. et al. Dependent pathway is critically involved in the pathogenesis of adjuvant arthritis in rats. **The Journal of Immunology**, v. 15, n. 147, p. 4167-4171, 2001.
- JANTAN, I. B. et al. Antifungal activity of the essential oils of nine Zingiberaceae species. **The Journal of Immunology**, v. 41, n.2, p. 392-397, 2013.
- JAYSON, M. I. V. Rheumaoid Arthritis. **Textbook of Pain**, v. 18, n.1, p. 11-57, 2009.
- JOHNSON, M. D. et al. Transforming growth factor beta and monocyte chemotactic protein-1 are elevated in cerebrospinal fluid of immunocompromised patients with HIV-1 infection. **J. Neuro AIDS**, v. 2, n. 4, p. 33-43, 2014.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 11, p. 203-210, 2011.
- KALE, M. et al. Anti-inflammatory activity of Dalbergia lanceolata bark ethanol extract in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 300-304, 2009.
- KLAUMANN, P. R. et al. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2008.
- KANNAN, K. W.; ORTMANN, R. A. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. **Pathophysiology**, v. 12, n. 1, p. 197-181, 2005.
- KAVUNCU, V.; EVCİK, D. Physiotherapy in Rheumatoid Arthritis. **Medscape General Medicine**, v. 6, n. 3, p. 15-24, 2005.

KAY, K. M.; SCHEMSKE, D. W. Pollinator assemblages and visitation rates for 11 species of neotropical *Costus* (Costaceae). **Biotropica**, v. 35, n.2, p. 198-207, 2003.

KINNE, R. W. et al. Macrophages in rheumatoid arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 2, n. 1, p. 189-202, 2010.

KITSIS, E.; WEISSMANN, G. The role of neutrophil in rheumatoid arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 265, n. 3, p. 63-72, 2010.

KHURANA, R.; BERNEY, S. M. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, v.12, n.1, p.153-165. 2015.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n. 3, p. 199-206, 2006.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, p. 498-512, 2012.

KURAIISHI, Y. Involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia. **The Journal of Immunology**, v. 273, p. 245-254, 2003.

LAURINDO, I. M. M. et al. Consenso brasileiro para o diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 42, n. 6, p. 88-98, 2009.

LAURINDO, I. M. M. et al. Artrite reumatóide: Diagnóstico e Tratamento. **Sociedade Brasileira de Reumatologia**, v. 11, n.1, p. 11-20, 2009.

LE BARS, D.; GOZARIUM, M; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n.2, p. 597-652, 2004.

LEITE, J. P. V. Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas. **Ed. Atheneu**, São Paulo. p. 4-11, 2012.

LESUIS, N. et al. Gender and the treatment of immune-mediated chronic inflammatory diseases: rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease and psoriasis: an observational study. **Drug Discovery Today**, v. 1, n. 10, p. 82, 2012.

LIMA, L. M. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current Medicinal Chemistry**, v.12, n.1, p.23-49, 2012.

LING, P. et al. Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. **Baillière's Clinical Rheumatology**, v. 142, p. 161-171, 2004.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v. 353, n. 10, p. 1607-1609, 2009.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-477, 2011.

- LORENZI, H.; MATOS, F. J.. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa, SP: **Instituto Plantarum**, v. 10, n.1, p. 512-518, 2012.
- MACGREGOR, A. J. Classification criteria for rheumatoid arthritis. **Baillière's Clinical Rheumatology**, v. 9, n.2, p. 81-92, 2009.
- MAMET, J. et al. Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acidsensing ion channels. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 24, p. 10662-10670, 2012.
- MARCON, R. **Avaliação do efeito antinociceptivo e anti-inflamatório dos triterpenos semi-sintéticos: octanoato de alfa e beta-amirina**. 2009. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 2011.
- MAAS, P. J. M. Costoidae (Zingiberaceae). **Flora Neotropica**. New York, v. 21, n. 3, p. 333-345, 2002.
- MAAS, P. J. M.; KAMER, H. M. **Neotropical Costaceae**. 2011. 1 fotografia, color. Disponível em: <<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Costaceae.htm>>. Acesso em: 27 jan. 2019.
- MCCURDY, C. R.; SCULLY, S. S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life Sciences**, v. 78, n. 4, p. 476-484, 2015.
- MATSUOKA, N. et al. Phenotypic characteristics of T cells interacted with synovial cells. **Journal Rheumatology**, v. 18, n. 1, p. 1137-1142, 2000.
- MEDEIROS, M. F. T.; FONSECA, V. S.; ANDREATA R. H. P. Plantas medicinais e seus usos pelos sítiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 18, n. 3, p. 391-399, 2014.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 12, p. 428-435, 2008.
- MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**. v. 140, n. 8, p. 771-776, 2010.
- MELO, P. S. *et al.* Violace in cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cell Dev. Biol. Animal**, v. 36, n. 2, p. 539, 2006.
- MEYER, R.A. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: McMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M. **Wall and Melzack's Textbook of Pain**, v. 11, n. 1, p. 3-34, 2016.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos**. Brasília, p. 148, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. Artrite Reumatoide – relatório de recomendação. **Brasília: Ministério da Saúde**, 2017.

MISHARIN, A. V. et al. Development of a new humanized mouse model to study acute inflammatory arthritis. **The Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 190, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, n. 2, p.55-63, 1983.

MONTENEGRO, M. R.; FECCHIO, D. Inflamação: conceitos gerais e inflamação aguda. Patologia: Processos Gerais. 4ª ed. São Paulo: **Atheneu**, v. 6, p. 109-128, 2009.

MOODY, J. O.; OKWAGBE, K. E. Topical anti-inflammatory activity of *Costus afer*. **Nigerian Journal of Natural Products and Medicine**, v. 7, n. 1, p. 46-48, 2013.

MULLER-LADNER, U. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. **Nature**, v, 1, n. 2, p. 55-62, 2010.

NAKANO, M. et al. Type I interferon induces CX3CL1 (fractalkine) and CCL5 (RANTES) production in human pulmonary vascular endothelial cells. **The Journal of Neuroscience**, v.170, n.13, p. 94-100, 2013.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.74, n. 5, p.418-425, 2011.

NOEL, M. et al. The influence of children's pain memories on subsequent pain experience. **Pain**, v. 153, n. 4, p. 1563-1572, 2014.

OH, J. et al. Syk/Src pathway-targeted inhibition of skin inflammatory responses by carnosic acid. **Mediators Inflamm**, v. 15, n. 1, p. 7813-7820, 2013.

OLIVEIRA, P. G. et al. Protective effect of RC-3095, an antagonist of the gastrinreleasing peptide receptor, in experimental arthritis. **Arthritis Rheumatology**, v. 63, n. 10, p. 2956-2965, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Pautas para la evaluación de medicamentos herbários. **Ginebra**, 1999.

OTTAWA, P. Evidence based clinical practice guiderlines of therapeutic exercises in the management of rheumatoid arthritis in adults. **Physical Therapy**, v. 84, n. 10, p. 934-972, 2004.

PAP, T. *et al.* Fibroblast biology: role of fibroblast in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Arthritis Research**, v. 20, n. 1, p. 361-367, 2009.

- PARK, K. A.; VASKO, M. R. Lipid mediators of sensitivity in sensory neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 26, n. 11, p. 571-577, 2005.
- PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p. 55-68, 2017.
- PEARSON, C. M. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 91, n. 1, p. 95-101, 1956.
- PIO CORRÊA, M. Dicionário de plantas Úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. **Imprensa Nacional**, v.6, n.1, p.55-61, 2007.
- PISETSKY, D. S.; ST CLAIR, E. W. Progress in the treatment of rheumatoid arthritis. **Jama**, v.86, n.22, p.2787-2790, 2003.
- PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 237-243, 2010.
- PRAKASH, V.; MEHROTRA, B. N. Zingiberaceae of north-east India: diversity and taxonomic status. **The Journal of Neuroscience**, v.17, n.1, p. 262-273, 2005.
- QIAO, C. F. et al. Studies on chemical constituents of two plants from Costus. **Zhonggriao Zhong Yao ZaZhi**, v.27, n.2, 123-125, 2009.
- QUITANS JUNIOR, L. J. R. et al., Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Costus spicatus in experimental animals. **Pharmaceutical Biology**, v.48, n.10, p. 1097-1102, 2010.
- RACKE, K.; SCHWORER, H. Regulation of serotonin release from the intestinal mucosa. **Phytochemistry**, v. 23, n. 2, p. 13-25, 2001.
- RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 6ª ed, São Paulo: Elsevier, 2007.
- RATES, S. M. K. Plants as sources of drugs. **Toxicon Oxford**, v. 39, n. 1, p. 603-613, 2011.
- RAZA, K. et al. Treating very early rheumatoid arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 20, n. 5, p. 849-863, 2006.
- RODRIGUES, H. G. et al. Efeito Embriotóxico e abortivo da plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n. 3, p. 359-366, 2011.
- ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Material Research**, v. 6, n. 3, p.317-320, 2003.
- ROSEN, S. D.; BERTOZZI, C. R. The selectins and their ligands. **Phytochemistry**, v. 6, n. 4, p. 663-673, 2004.
- ROY, M. et al. Cerebral and spinal modulation of pain by emotions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 49, p. 1-6, 2011.

- SCADDING, J. Neuropathic pain. **Advances in Clinical Neuroscience and Rehabilitation**, v. 3, n. 2, p. 8-14, 2013.
- SCHEMSKE, D. W. Pollinator assemblages and visitation rates for 11 especies of Neotropical *Costus* (Costaceae). **Biotropica**, v. 35, n. 2, p. 198-207, 2007.
- SKARE, T. L. Reumatologia: princípios e prática. 1 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2009.
- SALINAS, N. R.; CLAVIJO, L.; BETANCUR, J. Una nueva especie de *Costus* (*costaceae*) de la amazonia colombiana. **Caldasia**, v.29, n. 1, p. 195-201, 2010.
- SALLUSTO, F.; MACKAY, C. R. Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, n. 6, p. 724-731, 2014.
- SALTER, M. W. Cellular signaling pathways of pain neuroplasticity as target for analgesic development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 5, n.1, p. 557-567, 2015.
- SANTOS, J. L. et al. Síntese e modelagem molecular do novo derivado indolinônico como candidato a anti-inflamatório COX-2 seletivo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 48, n. 2, p. 235-240, 2007.
- SAVILL, J.; SERHAN, C. N. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, n.1, p. 1191-1197, 2010.
- SERHAN, C. N. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunol**, v. 6, n.3, p. 1191-1197, 2005.
- SHMERLING, R. H.; DELBANCO, T. L. The rheumatoid factor: na analysis of clinical utility. **American Journal of Medicine**, v. 91, n. 11, p. 307-311, 2013.
- SCHNEIDER, E. A cura e a saúde pelos alimentos. São Paulo: **Casa Publicadora Brasileira**, 2010.
- SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2014.
- SCHULTE, D. et al. Stabilizing the VE-cadherin-catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability. **EMBO J**, v. 30, n. 20, p. 4157-70, 2011.
- STEIN, C.; SCHÄFER, M.; MACHELSKA, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nature Medical**, v. 9, n. 8, p. 1003-1008, 2013.
- SILMAN, A. J. Epidemiology of the Rheumatic Diseases. 2 ed. **Oxford University Press**. Oxford, 2010.

- SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R.; PARENTE, J. P. Flavonol glycosides from *Costus spicatus*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 3, p. 87-92, 2000.
- SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R.; PARENTE, J. P. A furostanol glycoside from rhizomes of *Costus spicatus*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 931-1935, 2010.
- SILVA, C. S.; CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. São Paulo: **Tecmedd**, 2004.
- SILVA, M. A. R. et al. Antibiotic activity of the extract of *Costus spiralis* Linn. over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 209-212, 2010.
- SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. New Steroidal Saponins from Rhizomes of *Costus spiralis*. **Z. Naturforsch.**, v. 59, n. 3, p. 81-85, 2017.
- SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. Bioactive polysaccharides from *Costus spicatus*. **Polymers**, v. 51, n. 1, p. 239-242, 2013.
- SILVA, D. F. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de frações das folhas da *costus cf. arabicus* L. (Costaceae)**. 2013. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2013.
- SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia - da Planta ao Medicamento. 5ª ed., Santa Catarina: **Editora da UFSC**, v. 11, n. 1, p. 821. 2014.
- SRIVASTAVA, S. et al. *Costus speciosus* (Keukand): A review. **Der Pharmacia Sinica**, v. 21, n. 2, p. 118-128, 2011.
- SUBONGKOT, S. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition: a target in cancer prevention and treatment. **Pharmacotherapy**, v. 23, n. 2, p. 9-28, 2003.
- TERRIER, F. et al. Magnetic resonance imaging and spectroscopy of the periarticular inflammatory soft-tissue changes in experimental arthritis of the rat. **Investigative Radiology**, v. 20, n. 1, p. 813-823, 2005.
- TOMINAGA, M. Nociception and TRP channels. **Handbook Experimental Pharmacology**, v. 90, n. 179, p. 489-505, 2017.
- TOMLINSON, P. B. Phylogeny of the Scitamineae - Morphological and anatomical considerations. **Evolution**, v. 16, n. 2, p. 192-213, 1962.
- TOWNSEND, M. J.; MCKENZIE, A. N. Unravelling the net? Cytokines and diseases. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 10, p. 3549-3550, 2005.
- TRACEY, I.; DICKENSON, A. SnapShot: Pain Perception. **Cell**, v. 148, n. 11, p. 1308-1308e2, 2012.

- TRACEY, I.; MANTYH, P.W. The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. **Neurology**, v. 55, n. 5, p. 377-391, 2017.
- TREDE, R. D. et al. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology**, v. 70, n. 7, p. 1630-1635, 2011.
- TRENTHAM, D. E.; TOWNES, A. S.; KANG, A. H. Autoimmunity to type II collagen na experimental modelo f arthritis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 146, n. 10, p. 857-868, 2007.
- TRESVENZOL, L. M. et al. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 22-28, 2016.
- TURESSON, C. Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years. **Annals of Rheumatic Diseases**, v. 62, n. 8, p. 722-727, 2013.
- TUSHARA, S. B.. Ethnomedical uses of Zingiberaceae plants of Northeast India. **J. Ethnopharmacol**, v. 132, n.1, p. 286-296, 2011.
- TYSON, J. J. et al. Network dynamics and cell physiology. **Phytochemistry**, v. 18, n. 1, p. 908-916, 2009.
- VALLANCE, P.; CHAN, E. N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. **Heart**, v. 85, n. 3, p. 342-350, 2009.
- VAN VERROOIJ, W. J.; VOSSENAAR, E. R.; ZENDMAN, A J. The new rheumatoid factor in the serology of rheumatoid arthritis. **Autoimmun**, v. 3, n. 1, p. 17-19, 2004.
- VERGNOLLE, N. Postinflammatory visceral sensitivity and pain mechanisms. **Eurogastroenterology and Motility**, v. 20, n. 5, p. 73-80, 2010.
- VERRI, W. A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacol Ther**, v. 112, n. 1, p. 116-138, 2011.
- VIEL, T. A. et al. Evaluation of the antiurolithiatic activity of the extract of *Costus spiralis* Roscoe in rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 66, n.2, p. 193-198, 2009.
- VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2010.
- VOILLEY, N. et al. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 20, p. 8026-8033, 2011.
- VOULGARI, P. V. et al. Role of cytokines in the pathogenesis of anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis. **Phytochemistry**, v. 92, n. 2, p. 153-160, 2009.

WAGNER, H. M. Fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas. São Paulo: **Pharmabooks**, 2016.

WAUBEN, M. et al. Adjuvant Arthritis. **Autoimmune diseases models: a guide book**, v. 13, n. 2, p. 211-216, 2004.

McKUNE, M. C. et al. Nociception and pain. **The fifth edition of Lumb and Jones**, v. 38, n. 4, p. 584-616, 2015.

WETERING, E. J. et al. Cognitive and behavioral interventions for the management of chronic neuropathic pain in adults – A systematic review. **European Journal of Pain**, v. 4, n. 7, p. 670-81, 2010.

WHITEHOUSE, M. W. et al. Freund's adjuvants: relationship of arthritogenicity and adjuvancity in rats to vehicle composition. **Immunology**, v. 27, n. 2, p. 311-330, 2004.

WONG, M. M.; FISH, E. N. Chemokines: Attractive mediators of the immune response. **Seminars in Immunology**, v. 15, n. 1, p. 5-14, 2013.

YOUNG, H. M.; FURNESS, J. B. Ultrastructural examination of the targets of serotonin-immunoreactive descending interneurons in the guinea pig small intestine. **Journal of Experimental Medicine**, v. 356, n. 2, p. 101-114, 2001.

ZAMPELI, E.; TILIGADA, E. The roel of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders. **Journal Pharmacology**, v. 157, n. 13, p. 24-33, 2009.

ZHANG, L. et al. The preventive effects of incomplete Freund's adjuvant and other vehicles on the development of adjuvant-induced arthritis in Lewis rats. **Immunology**, v. 98, n. 15, p. 267-272, 2001.

ZHENG, C. et al. Complete Freund's Adjuvant supresses the development and progression of Prsitane-induced arthritis in rats. **Clinical Immunology**, v. 103, n. 2, p. 204-209, 2002.

ZHOU, H. Y. et al. Antinflammatory activity of 21 (α , β) methykmelianodiol, novel compounds from poncirus trifoliolate rafinesque. **Journal Pharmacology**, v. 572, n. 20, p. 239-248, 2007.

ANEXO – Certidão de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

* 2ª Via

Certificamos que a proposta intitulada “*Avaliação do potencial anti-inflamatório no tratamento da artrite com extrato das folhas de Costus Spiralis*”, registrada com o nº 40/2018, sob a responsabilidade da pesquisadora **Profa. Dra. Eliane Campesatto**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), **para fins de pesquisa científica**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 08.02.2019.

Vigência da autorização	01.09.2018 a 31.05.2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongos / Swiss
Nº de animais	72
Peso/idade	25-35 g / Adulta
Sexo	Fêmea
Origem/Local de manutenção	Biotério Central da Ufal / Laboratório de Farmacologia e Imunidade - LaFI
Colaboradores	Geraldo J.S. Neto e Pedro H. S.Bezerra

Maceió, 18 de fevereiro de 2019.

Evvan Nascimento dos Santos Filho

Coordenador da CEUA

SIAPE 1756479