

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade

Allyne Aparecida Dias da Silva Castro

**ESTUDO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DA *Alocasia macrorrhizos* EM
MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE REUMATOIDE**

Teófilo Otoni

2022

Allyne Aparecida Dias da Silva Castro

**ESTUDO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DA *Alocasia macrorrhizos* EM
MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE REUMATOIDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – Campus Mucuri, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Tecnologia, Ambiente e Sociedade.

Orientador: Prof. Dr. Caio César de Souza Alves

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Alessandra de Paula Carli

Colaboradora: Prof^ª. Dr^ª. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro

Teófilo Otoni

2022

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

C355 Dias da Silva Castro, Allyne Aparecida
2022 ESTUDO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DA *Alocasia macrorrhizos* EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE REUMATOIDE [manuscrito] / Allyne Aparecida Dias da Silva Castro. -- Teófilo Otoni, 2022.
51 p. : il.

Orientador: Prof. Caio Cesar de Souza Alves.
Coorientador: Prof. Alessandra de Paula Carli.

Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia, Ambiente e Sociedade) -- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade, Teófilo Otoni, 2022.

1. Inflamação. 2. Auto imune. 3. Planta medicinal. 4. Experimento. 5. Artrite. I. de Souza Alves, Caio Cesar. II. Carli, Alessandra de Paula . III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFVJM com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Este produto é resultado do trabalho conjunto entre o bibliotecário Rodrigo Martins Cruz/CRB6-2886
e a equipe do setor Portal/Diretoria de Comunicação Social da UFVJM


**ESTUDO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DA *Alocasia macrorrhizos*
EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE REUMATOIDE**

Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM TECNOLOGIA,
AMBIENTE E SOCIEDADE, nível de
MESTRADO como parte dos requisitos
para obtenção do título de MESTRA
EM TECNOLOGIA, AMBIENTE E
SOCIEDADE


Orientador (a): Prof. Dr. Caio Cesar
de Souza Alves

Co-orientadora: Prof. Dr. Alessandra
de Paula Carli


Data da aprovação : 14/09/2022

Documento assinado digitalmente
 CAIO CESAR DE SOUZA ALVES
Data: 19/09/2022 16:56:52-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>


Prof.Dr. CAIO CESAR DE SOUZA ALVES - UFVJM

Documento assinado digitalmente
 ALESSANDRA DE PAULA CARLI
Data: 27/09/2022 14:34:18-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>


Prof.Dr.^a ALESSANDRA DE PAULA CARLI - UFVJM

Documento assinado digitalmente
 ALEXANDRE SYLVIO VIEIRA DA COSTA
Data: 20/09/2022 09:18:12-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.Dr. ALEXANDRE SYLVIO VIEIRA DA COSTA - UFVJM


Documento assinado digitalmente
 RAQUEL DE SOUZA POMPERMAYER
Data: 21/09/2022 12:15:09-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.Dr.^a RAQUEL DE SOUZA POMPERMAYER - UFVJM

Documento assinado digitalmente
 FERNANDO DE SA SILVA
Data: 25/09/2022 18:11:26-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.Dr. FERNANDO SA - UFJF - GV

Prof.Dr. WAGNER DE FÁTIMA PEREIRA - UFVJM - DIAMANTINA

Documento assinado digitalmente
 WAGNER DE FATIMA PEREIRA
Data: 26/09/2022 13:45:43-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

TEÓFILO OTONI

Aos meus pais, José e Estelita, pelo apoio absoluto, por toda dedicação e esforço nos meus estudos.

Aos meus filhos Aline e José Ernesto, meu bem mais precioso, meu impulso diário. Por vocês, consegui finalizar esse trabalho, esperando ser orgulho e exemplo para vocês em um breve futuro, a busca pelo conhecimento.

Ao meu esposo Luiz Gustavo pela compreensão, incentivo e parceria que formamos para a vida.

Àqueles, pelos quais, cada minuto deste trabalho foi realizado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força constante que me fez chegar ao fim desse desafio.

À minha família que me conceberam minhas maiores virtudes.

Aos meus sogros Ildete e Pio, pelo apoio e disponibilidade em preencher o dia dos meus filhos com tanto amor e cuidado.

Aos meus pacientes, pela sensibilidade em compreender a disponibilidade do meu trabalho nestes últimos dois anos. Este trabalho também é por eles.

À Francielle Sambüç Lieberenz, pela sublime demonstração de amizade.

Aos meus orientadores Caio e Alessandra, pela oportunidade, pelo compartilhamento de conhecimentos, pela presença constante que ultrapassou a simples orientação. Como discente, sou grata por tudo.

À Dra. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro, por sua presença constante e ensinamentos que qualificaram esta pesquisa.

Ao Dr. Wagner de Fátima Pereira e sua indispensável presença neste projeto, estendendo estes agradecimentos ao Biotério da UFVJM de Diamantina, na pessoa do Fidélis.

Ao Prof. Dr. Eric Andrade - UFLA pelas instruções em processamento de descalcificação.

À Dra. Lízia Colares Vilela, pelo seu acolhimento, instruções e direcionamento nas análises histológicas.

A Tiago Barbosa, do departamento de Microscopia, por cada ensinamento, pelo raro desprendimento.

Aos companheiros de laboratórios Náthale e Layde, pelos auxílios tão importantes; Everton e Jander pelo sempre brilhante acompanhamento dos procedimentos internos.

Aos alunos da iniciação científica Roberta e Vinícius pela parceria nas atividades do projeto.

À Gabriela, Igor, Beatriz, Samuel por doarem um pouco do tempo de vocês em alguns momentos dos experimentos.

Aos servidores da universidade que participaram do meu dia a dia, com tanto carinho. Carla, Cilene, Rômulo e Robson, saibam que vocês fizeram meu dia mais produtivo.

Aos integrantes da Banca Examinadora, por aceitarem o convite para essa defesa e contribuições na minha formação. A UFVJM pela existência e transformação na vida de muitos que antes não tinham a oportunidade de estudar.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

A Artrite Reumatoide é uma doença inflamatória crônica, autoimune que pode afetar múltiplas articulações. Apresenta grande impacto social e na vida pessoal, devido à gravidade das manifestações dos sintomas conforme o avanço da doença. Quanto mais precoce for realizado o diagnóstico, tratamento e ou reabilitação dos pacientes acometidos, melhor o prognóstico. O tratamento convencional por mais benéfico que possa aparecer, traz consigo eventos adversos que podem ser irreversíveis. Por isso, cada vez mais se tem procurado tratamentos eficazes e que possuam menos efeitos colaterais. O uso das plantas medicinais pela população e os avanços ocorridos na área científica têm contribuído para uma nova opção terapêutica para a doença. Com efeito, a utilização da *Alocasia macrorrhizos* tem-se mostrado favorável na medicina popular por possuir poucos efeitos colaterais em comparação ao tratamento convencional. No presente estudo, foram avaliados os efeitos do extrato aquoso da *Alocasia macrorrhizos* (EAAM) em Artrite Induzida por Adjuvante. Utilizou-se ratos da linhagem Holtzman, de ambos os sexos. A indução ocorreu por injeção intradérmica de 100 µL de CFA na base da cauda e 30 µL intra-articular no joelho esquerdo. Os animais foram avaliados através da mensuração das patas posteriores e aplicado o teste de vocalização até o vigésimo primeiro dia após a indução (dpi). O tratamento ocorreu a partir dos primeiros sinais de inflamação após a dose de reforço até a conclusão do experimento. No 21º dpi os animais foram eutanasiados e coletados articulação tibiofemoral, amostras de sangue e linfonodo inguinal para análise histológica e dosagem de citocinas. Os animais artríticos (AIA) apresentaram reações inflamatórias intensas e manifestações sistêmicas quando comparado aos animais controle. A partir da mensuração dos joelhos, houve redução do edema de pata após a administração 100 µL (100µg/kg) de EAAM. Na avaliação do comportamento nociceptivo houve uma redução da frequência de vocalização no grupo EAAM comparados aos demais grupos. Verificou-se a redução de infiltrado inflamatório em lavado articular, na análise histopatológica, assim como, na quantificação de citocinas em animais tratados com o EAAM comparado aos animais não tratados. Desse modo, *Alocasia macrorrhizos* demonstrou potencial ação anti-inflamatória, podendo ser utilizada como suporte científico a futuras pesquisas e desenvolvimento de novos fármacos no tratamento da artrite reumatoide.

Palavras chave: Artrite Reumatoide. Planta Medicinal. Artrite Induzida por Adjuvante.

Modelo *in vivo*.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis is a chronic inflammatory, autoimmune disease that can affect multiple joints. It has a major impact on social and personal life, due to the severity of the symptom manifestations as the disease progresses. The earlier the affected patients are diagnosed, treated, and/or rehabilitated, the better the prognosis. Conventional treatment, as beneficial as it may appear, brings with it adverse events that may be irreversible. For this reason, different studies are seeking effective treatments that have fewer side effects. The uses of medicinal plants by the population and the advances in the scientific area have contributed to a new therapeutic option for the disease. Indeed, the use of *Alocasia macrorrhizos* has proven favorable in popular medicine for having few side effects compared to conventional treatment. In the present study, the effects of the aqueous extract of *Alocasia macrorrhizos* (EAAM) on adjuvant induced arthritis were evaluated. Rats of the Holtzman strain, of both sexes, were used. Induction occurred by intradermal injection of 100 μ l of CFA at the base of the tail and 30 μ l intra-articular in the left knee. The animals were evaluated by measuring the hind legs and vocalization test was applied until the twenty-first day after induction (dpi). Treatment with EAAM (100 μ g/kg) occurred from the first signs of inflammation, after the booster dose, until the end of the experiment. On the 21st dpi the animals were euthanized and the femur-tibial joint, blood samples and inguinal lymph node were collected for histological analysis and cytokine dosage. Arthritic animals (AIA) showed intense inflammatory reactions and systemic manifestations when compared to control animals. From the measurement of the knees, there was a reduction in paw edema after the administration of 100 μ l of EAAM. In the evaluation of nociceptive behavior there was a reduction in the frequency of vocalization in the EAAM group compared to the other groups. There was a reduction of inflammatory infiltrate in joint lavage, in histopathological analysis, as well as in the quantification of cytokines in animals treated with EAAM when compared to untreated animals. Thus, the aqueous extract of *Alocasia macrorrhizos* showed a potential anti-inflammatory action, and may be used as scientific support for future research and development of new drugs for the treatment of rheumatoid arthritis.

Keywords: Rheumatoid Arthritis. Medicinal Plant. Adjuvant Induced Arthritis. *In vivo* model.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Progressão do dano da Artrite Reumatoide 16
- Figura 2 - *Alocasia macrorrhizos* no pátio da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) – Teófilo Otoni/MG 21
- Figura 3 - Tubérculo da *Alocasia macrorrhizos* (A); Cortes do tubérculo após aquecimento em estufa (B); Filtragem do processamento do tubérculo (C); Tubérculo moído (D) 23
- Figura 4 - Esquema do Protocolo Experimental 25
- Figura 5 – Medidor de espessura digital (A); Paquímetro digital (B) 26
- Figura 6 – Mobilização do animal para avaliação da vocalização a partir da extensão (A) e flexão (B) de cada membro posterior 27
- Figura 7 - Microplacas sensibilizadas em Ensaio Imunoenzimático (Elisa) – Sanduíche. Determinação da citocina IFN- γ (A), IL-6 (D), IL-12 (B), IL-10(C) 29
- Figura 8 – Avaliação de sinais inflamatórios em ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante 31
- Figura 9 – Comparativo entre os dois joelhos em ratos machos, do grupo Controle Negativo após incisão na região anterior do joelho 38
- Figura 10 – Comparativo entre os dois joelhos em ratos machos, dos grupos Induzido e que recebeu o Extrato Aquoso da *Alocasia macrorrhizos* após incisão na região anterior do joelho. 38
- Figura 11 – Fotomicrografias representativas de cortes histológicos da articulação tibiofemoral de animais Controle Negativo (a, b), Induzido (a, b), após injeções de CFA 39

Figura 12 - Fotomicrografias representativas de cortes histológicos da articulação tibiofemoral de animais Induzido e tratado com PBS e Induzido e Tratado com EAAM **40**

Gráfico 1 – Efeito do tratamento do Extrato Aquoso da *Alocasia macrorrhizos* na mensuração dos joelhos de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante **33**

Gráfico 2 – Efeito do tratamento do Extrato Aquoso da *Alocasia macrorrhizos* na emissão de vocalização de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante **34**

Gráfico 3 – Efeito do tratamento do Extrato Aquoso da *Alocasia macrorrhizos* em lavado sinovial de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante **35**

Gráfico 4 – Efeito do tratamento do Extrato Aquoso da *Alocasia macrorrhizos* sobre a produção de citocinas em soro de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante **36**

Gráfico 5 – Efeito do tratamento do Extrato Aquoso da *Alocasia macrorrhizos* sobre a produção de citocinas em linfonodo inguinal de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante **37**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ G	Micrograma
μ L	Microlitro
mg	Miligramas
ml	Mililitros
<i>A. macrorrhizos</i>	<i>Alocasia macrorrhizos</i>
ACR	American College of Rheumatology
AIA	Artrite Induzida por Adjuvante
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de Variância
AR	Artrite Reumatoide
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
CFA	Adjuvante Completo de Freund
CIA	Artrite Induzida por colágeno
CN	Controle Negativo
COX-2	Ciclooxigenase 2
DA	Diâmetro Articular
Dpi	Dia após indução
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EEAm	Extrato Aquoso da <i>Alocasia macrorrhizos</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EUA	Estados Unidos da América
FR	Fator Reumatoide
HCL	Ácido Clorídrico
HLA-DR	Human Leucocyte Antigen DR
HLA-DRB1	Human Leucocyte Antigen DRB1
I.D	Intra Dérmica
ICET	Instituto de Ciência, Engenharia e Tecnologia
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-6	Interleucina 6
IL-15	Interleucina 15
IL-18	Interleucina 18
IL-23	Interleucina 23
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMDC	Medicações Modificadoras do Curso da Doença
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline com Tween
PIA	Artrite Induzida por Pristano
RAW 264.7	Linhagem de células de macrófagos murinos
ROS	Reactive Oxygen Species
SFB	Soro de Feto Bovino

SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SUS	Sistema Único de Saúde
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFVJM	Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Artrite reumatoide	13
2.2 Etiofisiopatologia da artrite reumatoide	14
2.3 Modelos Experimentais da artrite reumatoide	16
2.4 Tratamento da artrite reumatoide	18
<i>2.4.1 A Fitoterapia como recurso no tratamento da artrite reumatoide</i>	<i>19</i>
<i>2.4.1.1 Alocasia macrorrhizos</i>	<i>20</i>
3 OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos Específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Obtenção do extrato da <i>Alocasia macrorrhizos</i>	23
4.2 Animais	24
4.3 Modelo de Artrite Induzida por Adjuvante	24
<i>4.3.1 Tratamento com o extrato aquoso da <i>Alocasia macrorrhizos</i></i>	<i>26</i>
<i>4.3.2 Avaliação de edema nas patas posteriores e articulações do joelho</i>	<i>26</i>
<i>4.3.3 Avaliação do comportamento nociceptivo pela vocalização</i>	<i>27</i>
<i>4.3.4 Coleta do lavado sinovial</i>	<i>28</i>
<i>4.3.5 Análise do número de células do lavado sinovial</i>	<i>28</i>
<i>4.3.6 Determinação de níveis de IFN-γ, IL-6, IL-12, IL-10</i>	<i>28</i>
<i>4.3.7 Análise histopatológica</i>	<i>29</i>
4.4 Análises Estatísticas	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Artrite Induzida por Adjuvante	31
<i>5.1.1 Avaliação da espessura dos joelhos</i>	<i>32</i>
<i>5.1.2 Avaliação do comportamento nociceptivo pela vocalização</i>	<i>33</i>
<i>5.1.3 Análise do número de células do lavado sinovial</i>	<i>34</i>
<i>5.1.4 Determinação de níveis de IFN-γ, IL-6, IL-10, IL-12</i>	<i>35</i>
<i>5.1.5 Análise Histopatológica</i>	<i>37</i>
6 Conclusão	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica de grande abrangência, atingindo aproximadamente 1% da população mundial (ALAMANOS *et al.*, 2006). No Brasil existem poucos estudos confirmando a prevalência da AR e estima-se que esta afete 0,22-0,50% da população (MOTA *et al.*, 2013). Segundo Thomé (2011) é uma doença autoimune, caracterizada por dor, inchaço, enrijecimento das articulações e, nos casos mais graves, deformação óssea, consequentes da ativação do sistema imune contra as proteínas presentes nas cartilagens. Os termos “reumático” e “reumatoide” referem-se a doenças em que as articulações, músculos, ou tecidos conjuntivos do corpo são os alvos da invasão por elementos do sistema imune (MAK; SAUNDERS, 2005, p.971).

Nesse contexto, a AR alcança um grande número de indivíduos em idade produtiva, repercutindo na redução da qualidade de vida, com diversos graus de incapacitação funcional e aumento dos gastos médicos e previdenciários que geram grande impacto social e econômico (THOMÉ, 2011; GOELDNER *et al.*, 2011). A sobrevida dos pacientes com AR é menor que a da população em geral e a expectativa de vida pode decrescer de três a dez anos, pois afeta sobremaneira a qualidade de vida e a capacidade funcional da pessoa, sobretudo por algumas complicações como a depressão, que pode afetar cerca de 40% dos pacientes e o maior predisposição a infecções, linfomas, assim como o câncer de pulmão e de pele (BATHON, 2008; BUENDGENS, 2017; KVALVIK *et al.*, 2000; SCOTT, 2010).

Dessa forma o tratamento deve ser iniciado com a maior brevidade possível de modo a monitorar a progressão da erosão articular e diminuir a probabilidade de morbidade e mortalidade (MEIRINHOS *et al.*, 2016). O início imediato do diagnóstico e tratamento são fundamentais para o controle da atividade da doença e prevenir incapacidade funcional e lesão articular irreversível. Sendo assim, é necessário avaliar o uso de anti-inflamatórios não hormonais e analgésicos ou iniciar as Medicações Modificadoras do Curso da Doença (MMDC), como: metotrexato, cloroquina, hidroxicloroquina, sulfasalazina e leflunomida (ALBERS *et al.*, 2001; HAZLLEWWOD, 2011; PASSOS, 2016). Ainda assim, o processo contínuo da utilização de drogas antirreumáticas nos tratamentos convencionais possuem potenciais riscos e efeitos colaterais, sendo, portanto, necessário o acompanhamento regular do paciente (BRASIL, 2020).

Além dos possíveis eventos adversos relacionados ao tratamento convencional, os custos relacionados a AR são elevados, devido os gastos com diversos medicamentos, alguns

deles de alto custo, como as drogas biológicas, despesas médicas e hospitalares, além de afetar diretamente os pacientes como, por exemplo, perda da produtividade pessoal, absenteísmo e aposentadoria por invalidez, para aqueles com perda total da capacidade laboral (DE AZEVEDO *et al.*, 2008).

Diante disso, há um crescente interesse por produtos de origem natural que apresentem efeitos terapêuticos com menor toxicidade, menor custo e que levem a redução dos efeitos adversos, constituindo, portanto, alternativa promissora no tratamento de pacientes com AR (YANG *et al.*, 2013).

O Brasil é um país privilegiado em sua flora nativa, em especial no cenário das plantas medicinais, responsável por um terço de toda a diversidade mundial, esse é um dos motivos para o incentivo à inserção de plantas medicinais no Sistema Único de Saúde - SUS (BRASIL, 2017). Com efeito, o tratamento realizado com plantas medicinais promove maior adesão ao tratamento por possuir poucos efeitos colaterais e interações medicamentosas em menor escala, sem perder sua eficácia (BRUNING *et al.*, 2012). A planta medicinal *Alocasia macrorrhizos* (*A. macrorrhizos*), é utilizada em moléstias inflamatórias na medicina popular e cujos estudos demonstram seu efeito anti-inflamatório (CORDEIRO *et al.*, 2021; FANG *et al.*, 2012; MULLA *et al.*, 2010; RAHMAN *et al.*, 2011).

Cordeiro *et al.*, (2021) utilizou-se de uma planta medicinal comumente encontrada na região do Vale do Mucuri, estado de Minas Gerais, e concluiu que o extrato obtido a partir dos tubérculos de *A. macrorrhizos* demonstrou ser uma promissora opção no tratamento do vitiligo em modelo experimental *in vitro* e *in vivo*, como um potencial anti-inflamatório.

Fang *et al.*, (2012) em sua pesquisa demonstraram alguns resultados do tubérculo da planta *A. macrorrhizos* como: antioxidante, anti-hiperglicêmico, combate ao câncer, laxante, diurético, anti-inflamatório, analgésico, antimicrobiano, hepatoprotetor, antitrombótico, antimalárica, hemaglutinante, imunomodulador, anti-helmíntico e antiprotozoário.

O presente estudo teve como propósito a avaliação do potencial efeito anti-inflamatório do extrato aquoso do tubérculo da *A. macrorrhizos* em modelo experimental de Artrite Induzida por Adjuvante (AIA).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Artrite reumatoide

AR é uma doença inflamatória crônica, autoimune que se caracteriza por poliartrite periférica, que leva à deformidade e à destruição das articulações por desgaste do osso e cartilagem, além de manifestações sistêmicas como: rigidez matinal, nódulos reumatoides, vasculite, fadiga e perda de peso (CHAIN *et al.*, 2013, p.79; KHURANA, BERNEY 2005; LAURINDO *et al.*, 2004). Afeta aproximadamente 1% da população mundial (ALAMANOS *et al.*, 2006), sendo mais frequente em países em desenvolvimento. A sua incidência aumenta com a idade, acometendo duas vezes mais mulheres do que os homens, na faixa etária entre 30-50 anos (KHURANA, BERNEY 2005; MOTA *et al.*, 2012). Quando diagnosticada antes dos 16 anos, o quadro clínico é denominado AR juvenil (RAVELLI & MARTINI, 2007).

Seja no campo socioeconômico, seja individualmente, a AR é responsável por um impacto econômico significativo (BUENDGENS, 2017). Uma vez que, indivíduos com a doença necessitam de cuidados contínuos e, em alguns casos, intervenções de alto custo. A incapacidade física gerada pela doença e que reduz a produtividade, adiciona à macroeconomia custos indiretos substancialmente elevados (KVIEN, 2004; DE AZEVEDO *et al.*, 2008).

A AR era considerada uma doença benigna e com bom prognóstico, o tratamento era de custo baixo e tinha como principal objetivo apenas o controle dos sintomas, aguardando-se a regressão da doença. Atualmente, no entanto, a AR foi caracterizada como sendo uma doença agressiva e associada ao aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes (GOELDNER, 2011).

Além do acometimento das articulações, a AR tem efeitos em outros órgãos como inflamações nos olhos e vasculite (MAK; SAUNDERS 2005, p. 971) assim como algumas complicações como a depressão, que afeta até 40% dos pacientes, infecções, duas vezes mais predisposição ao linfoma, assim como o câncer de pulmão e de pele (BATHON, 2008; SCOTT, 2010).

Mota *et al.*, (2013) destaca a importância de avaliar um paciente com sintomas articulares na primeira oportunidade possível, considerando que a definição da fase inicial da AR compreende as primeiras semanas ou meses de sintomas (em geral, menos de 12 meses),

destacando-se como período crítico as primeiras 12 semanas de manifestações como a "AR muito inicial" ou muito precoce.

Ainda sobre o diagnóstico, os critérios do ACR (American College of Rheumatology) citado por EULAR (2010) se baseiam em um sistema de pontuação através de um escore de soma direta. As manifestações são divididas em quatro domínios: envolvimento articular (pontuação de 0 a 5), sorologia (pontuação de 0 a 3, prova de atividade inflamatória (escala de 0-1) e duração dos sintomas (2 níveis; intervalo 0-1). Assim, uma pontuação maior ou igual a 06 classifica um paciente como tendo AR. Cabe ressaltar que os novos critérios do ACR ainda não são diagnósticos propriamente ditos, e sim uma aproximação classificatória.

Baseado em estudos sobre doenças autoimunes, especificamente a AR, provavelmente se desenvolve principalmente por fatores associados ao risco genético, autoimunidade assintomática e ambiental (DEANE *et al.*, 2011). Desta maneira, novas investigações durante o desenvolvimento da doença oferece percepções importantes sobre os fatores que levam à doença, assim como, o desenvolvimento de modelos preditivos para a doença, bem como estratégias de prevenção e tratamento para a Artrite Reumatoide.

2.2 Etiofisiopatologia da artrite reumatoide

A etiologia da AR ainda não está totalmente esclarecida, mas existem alguns fatores correlacionados que podem ser os potenciais “gatilhos” para o desenvolvimento da doença. Como, por exemplo, a susceptibilidade genética citada por Raychaudhuri *et al.*, (2012), onde está bem determinada a participação de genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II (MHC), sendo o antígeno leucocitário humano HLA-DR e o locus HLA-DRB1.

Alguns fatores como a idade avançada, história familiar da doença, sexo feminino e o tabagismo estão associados ao aumento do risco de desenvolver AR. (COSTENBADER *et al.*, 2005; FIRETEIN e KELLEY, 2013). Dentre eles, o tabagismo é o maior fator de risco conhecido para a AR, sendo maior o agravo conforme a quantidade e tempo de uso do cigarro, além de permanecer em risco após a cessação por 20 anos ou mais (LIAO *et al.*, 2009).

Na fisiopatogênese da AR há um evento multimediado, onde os linfócitos B atuam na apresentação de antígenos, em secreção de citocinas inflamatórias, no envolvimento no processo de organogênese linfóide ectópica presente no sinóvio reumatoide, participando na formação do complexo imune, na coestimulação de células T (MARSTON *et al.*, 2010) e

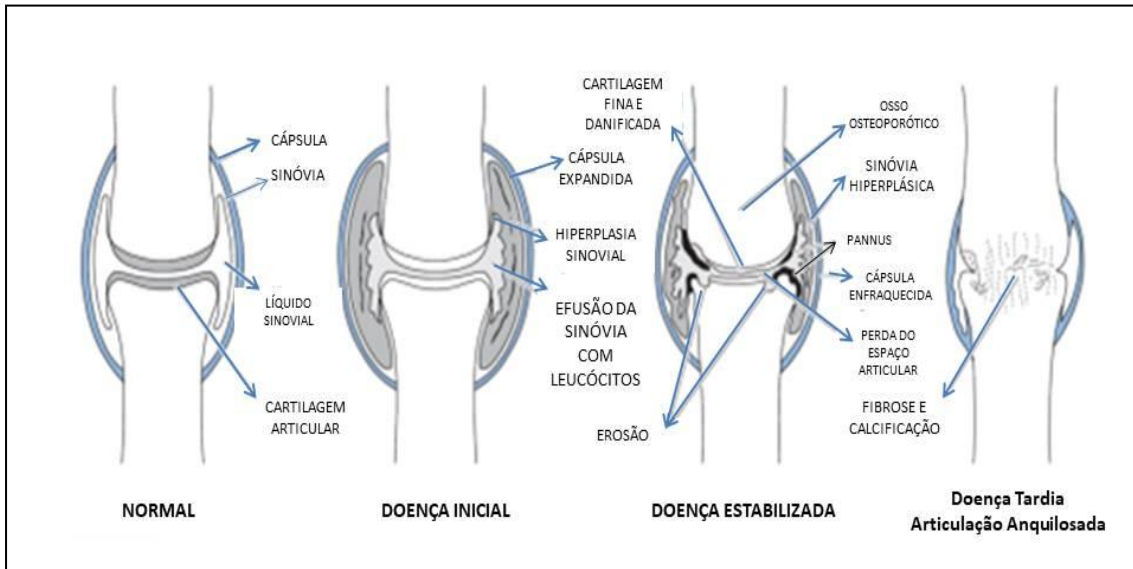
na produção do Fator Reumatoide (FR), que são um grupo de anticorpos que é encontrado entre 60% a 70% dos pacientes com AR (SATO, 2004). Os macrófagos e neutrófilos, por sua vez, possuem participação bem estabelecida nesse processo, com visibilidade aos neutrófilos que produzem várias citocinas inflamatórias e induzem danos teciduais (MENEZES, 2013).

A membrana sinovial é a principal fonte de citocinas pró-inflamatórias e proteases, juntamente com os osteoclastos e os condrócitos, promovem a destruição articular. A invasão de um tecido proliferativo na cavidade articular, na cartilagem e no tecido ósseo, forma o “pannus”, tecido localmente invasivo que contém uma infiltração maciça de células imunes, vasos proliferativos e aumento do número de osteoclastos (JUNG *et al.*, 2014). Desta maneira, no estabelecimento inflamatório da membrana sinovial, há ampla evidência de vias imunológicas inatas e adaptativas que coexistem e se interagem para perpetuar a inflamação e destruição dos tecidos (ASQUITH *et al.*, 2009).

Em relação aos mecanismos de resposta imune inata, os neutrófilos, macrófagos, mastócitos e células Natural Killer participam da resposta inflamatória na membrana sinovial (ANAYA *et al.*, 2013 *apud* OLIVEIRA *et al.*, 2017), e também auto anticorpos (o FR) (CHAIN *et al.*, 2013, p.83).

O dano articular começa na membrana sinovial e cobre a maioria das estruturas, levando a dor e inchaço nas articulações causadas pelo processo inflamatório. Seja qual for o caso, a liberação de TNF- α e IL-1 causa a patologia principal ao ativar a degradação da cartilagem (GOELDNER *et al.*, 2011; CHOY, 2012).

A AR possui um processo de lesão tecidual intermitente, ocasionando destruição cartilaginosa, erosão ósseas, deformidade articular e consequentemente atrofia muscular (HITCHON & GABALAWY, 2011; GREENE & HARRIS, 2008). A progressão grave da doença leva a fibrose da articulação e consequentemente, calcificação, enrijecimento e perda funcional, (apesar de já não gerar dor), conforme demonstra a Figura 1.

Figura 1 – Progressão do dano da Artrite Reumatoide.

Fonte: Greene & Harris, 2008. Adaptado.

Segundo Korhonen *et al.*, (2005) as espécies reativas de oxigênio (ROS) e os radicais de nitrogênio, incluindo o superóxido, o peróxido de hidrogênio, os radicais hidroxila, o ácido hipocloroso e o óxido nítrico (NO), além de participarem da fisiopatogênese da AR, também contribuem para os danos celulares da AR e de outras doenças inflamatórias.

Durante o desenvolvimento da AR, outras células infiltram nas articulações, mesmo em quantidades menores como os linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, produzindo citocinas que ajudam na ativação de células B e dos macrófagos, perpetuando assim a inflamação (MAK; SAUNDERS, 2005, p.971).

2.3 Modelos experimentais da artrite reumatoide

O gatilho para o surgimento da doença articular é desconhecido e os fatores que levam a cronicidade das respostas são igualmente pouco compreendidos. Esta fase da doença, embora potencialmente crucial para futuras terapêuticas preventivas, é impossível estudar em seres humanos e, portanto fornece um incentivo crucial para o desenvolvimento de modelos animais relevantes de doenças, nos quais mecanismos e caminhos podem ser modelados e explorados. (ASQUITH *et al.*, 2009) As medicações utilizadas na clínica podem induzir reações adversas e toxicidade que impedem o seu uso a longo prazo ou o uso de doses que podem modificar de forma favorável o curso da doença. Modelos animais frequentemente predizem esses fenômenos (MENEZES, 2013).

Vários modelos foram descritos no intuito de induzir artrite em animais tentando reproduzir os achados da AR. A rigor, um modelo ideal de artrite deveria preencher os seguintes requisitos: ter achados clínicos, radiológicos e histopatológicos semelhantes aos observados na AR, sem sistematização; ser de fácil indução, baixo custo, boa reprodutibilidade, utilizando animal de fácil acesso; ter confiabilidade quanto ao início, incidência e avaliação da gravidade das alterações; responder a agentes terapêuticos de forma semelhante ao observado na AR; ter parâmetros de alterações imunológicas e de atividade mensuráveis (OLIVER; BRAHN, 1996 *apud* JÚNIOR; ROCHA, 2006).

Além disso, manipulações genéticas, gerando animais transgênicos ou knockout, vieram agregar uma nova ferramenta aos modelos animais, permitindo avaliar o papel de genes individuais na fisiopatologia da AR, na homeostasia normal e no desenvolvimento de autoimunidade, bem como de citocinas envolvidas na fisiopatologia dessa doença (JUNIOR; ROCHA, 2006).

Modelos de AR ocasionalmente podem apresentar alguma característica fisiopatológica que é similar à que ocorre na AR humana, contudo, diferenças importantes são observadas. Assim, em modelos animais de AR, a doença progride muito mais rapidamente do que na doença humana, conferindo um aspecto de doença inflamatória aguda. Outro aspecto interessante é que roedores desenvolvem uma reabsorção óssea intensa em resposta a inflamação articular, de forma diferente do que se observa em humanos (BANDELE, 2001).

Asquith *et al.*, (2009), descreveu em seu estudo a Artrite induzida por zymosan, um polissacarídeo da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, levando à indução de citocinas pró-inflamatórias, mobilização de araquidonatos, fosforilação de proteínas e também ativa o complemento através da via alternativa resultando na proliferação da AR, com o pico por volta do terceiro dia e a inflamação desaparecendo no sétimo dia. Este é um modelo mais limitado devido ser de natureza monoartrítica, de injeção intra-articular.

Os modelos de artrite mais utilizados para o conhecimento da fisiopatogênese da AR, assim como também para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas são: os modelos induzidos com injeções de colágeno tipo II (CIA) com o Adjuvante Completo de Freund (CFA) (WILLIAMS, 2004; SONG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2013); proteoglicano combinado com óleos adjuvantes, com adjuvante de Freund completo (AIA) e pristano (artrite induzida por pristano - PIA) (GULKO, 2007).

As variações de modelos referidas tem sua adequação para avaliação de doença articular imune-medida, tendo-se em vista grupos compreendidos como a espécie empregada

(rato, camundongo ou porco-da-índia), o tipo de doença analisada (induzida, espontânea ou por modificação genética) e agente indutor (adjuvantes, polissacarídeo, proteoglicanas, colágeno e outras proteínas) (BOLON *et al.*, 2011).

Considerando tais critérios, a AIA apresenta um rápido início e progressão, inflamação articular de fácil mensuração e procedimentos de inicialização e caracterização bem definidos sendo o que comporta as maiores vantagens para o estudo, ainda mais quando esse modelo é o mais empregado em testes pré-clínicos de novos agentes antiartríticos e comumente usado para estudar a inflamação. (ALMARESTANI *et al.*, 2011; BAUEROVÁ *et al.*, 2011; ONISHI *et al.*, 2018, SNEKHALATHA *et al.*, 2012). Utiliza-se o CFA como antígeno na imunização, sendo um composto por óleo de parafina contendo mono-oleato de manitol como um surfactante em suspensão com uma micobactéria (*Mycobacterium tuberculosis* ou *M. butyricum*) morta (BILLIAU & MATTHYS, 2001).

2.4 Tratamento da artrite reumatoide

As manifestações articulares da AR podem ser reversíveis em sua fase inicial, porém, a sinovite persistente não controlada determina destruição óssea e cartilaginosa, lesões tendinosas e ligamentares irreversíveis (MOTA *et al.*, 2013). Desse modo, o tratamento deve ser iniciado com a maior celeridade possível de modo a acompanhar a progressão da erosão articular e diminuir a probabilidade de morbimortalidade (MEIRINHOS *et al.*, 2016).

O tratamento preconizado indica os medicamentos e demais produtos apropriados, consequente o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da AR (BRASIL, 2020) inclui anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), glicocorticoides, imunossupressores que são os medicamentos modificadores do curso da doença (MMCD) sintéticos (metotrexato, sulfassalazina, leflunomida, hidroxicloroquina, cloroquina), MMCD sintético alvo específico (tofacitinibe), MMCD biológicos anti-TNF (adalimumabe, certolizumabe pegol, etanercepte, infliximabe e golimumabe); e MMCD biológicos não anti-TNF (abatacepte, rituximabe e tocilizumabe).

Estes medicamentos visam controlar os sintomas, porém, não estancam o processo de destruição articular que permanece como indicador da incapacidade futura (WIENS *et al.*, 2009). Além disso, são responsáveis por efeitos adversos comumente encontrados entre a maioria dos medicamentos, como: a anemia, leucopenia, trombocitopenia e disfunção renal e hepática, além de efeitos adversos sistêmicos como: lesão gástrica (AINES), o aumento de

risco cardiovascular (AINES seletivos para a enzima COX-2) e desenvolvimento de Síndrome de Cushing (glicocorticóides) (BRASIL, 2020).

Dentre os medicamentos mais indicados no tratamento da AR, os MMCD, são os mais utilizados, porém, seu uso é limitado, devido seus efeitos colaterais. A procura por outros tipos de tratamentos é crescente, a contar que estes sejam seguros e econômicos. A terapia à base de ervas tem efeito favorável nessa busca (ELAKKIYA *et al.*, 2020).

Segundo Mota *et al.* (2012), uma das dificuldades encontradas durante o tratamento é o acesso ao sistema de saúde e o custo da medicação (sistema privado). Além disso, a terapia biológica tem ainda, efeito supressivo (não curativo), com possível toxicidade, alto custo e inconveniência por tratar-se de proteínas necessariamente parenterais (WOOD; O'DELL, 2004). Isto, talvez justifique o interesse, sobretudo dos países em desenvolvimento, por produtos naturais com ação imunomoduladora para AR. (MERINI *et al.*, 2012). Portanto, é necessário desenvolver estudos farmacoeconômicos com base na realidade nacional capazes de gerar informações que orientem racionalmente as tomadas de decisão no tratamento dos pacientes com AR.

2.4.1 A Fitoterapia como recurso no tratamento da artrite reumatoide

O Brasil é reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como o possuidor de uma das floras mais ricas do mundo seja contando as espécies ou mesma a quantidade de indivíduos, condição essa que associada à diversidade cultural e étnica possui uma grande capacidade de desenvolvimento de fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos a partir das plantas medicinais (BRASIL, 2009).

O consumo de plantas teria sido a primeira forma de uso de medicamento de que se tem notícia. A origem da utilização de ervas medicinais pode ser creditada à prática indígena, que, mais tarde foi influenciada pela cultura africana e portuguesa. De fato, os saberes e práticas do uso terapêutico das plantas estão diretamente ligados aos territórios e aos recursos disponíveis de cada comunidade (BRASIL, 2009; MENDES, 2018).

A fitoterapia e o uso de plantas medicinais fazem parte da medicina popular com crescente aumento de seu uso, devido aos avanços ocorridos na área científica, reconhecidamente seguros e eficazes e também pela crescente busca de terapias menos agressivas por parte da população, especialmente para a população de baixa renda (BRUNING *et al.*, 2012; MENDES, 2018). No Brasil, para assegurar a comercialização e

aplicação dos produtos fitoterápicos, existe a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que ainda tem como responsabilidade a fiscalização dos estudos que comprovam a eficácia e segurança destes medicamentos (BRASIL, 2010).

Alguns estudos com produtos naturais, utilizando-se de plantas da família *Araceae* nos experimentos artríticos, observaram a supressão de processos inflamatórios, por meio da alteração de mediadores moleculares específicos como as células T, anticorpos, citocinas e as quimiocinas. Um exemplo aderente é o uso do extrato dos tubérculos das plantas *Arisaema rhizomatum* e *Homalomena oculata* em modelo *in vivo* que demonstraram efeitos como potentes anti-inflamatórios, resultando na atenuação do inchaço das articulações e destruição das cartilagens (CHUNXIA *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2019; VENKATESHA *et al.*, 2011).

2.4.1.1 *Alocasia macrorrhizos*

A *A. macrorrhizos* pertencente à família *Araceae*, é nativa das florestas tropicais da Malásia (RAHMAN *et al.*, 2011). Descrita também por Lorenzi e Filho (2001), é herbácea perene, ereta, com tubérculo inicialmente subterrâneo e com o tempo tornando-se volumoso e elevando-se a cerca de 50 cm da superfície, de grande efeito ornamental pela folhagem (FIGURA 2), adequada para plantio isolado ou em grupo, a meia sombra ou em pleno sol, multiplica-se por sementes e por brotações laterais do tubérculo.

Também conhecida como taioba brava, cocó, coió, taió, tajá, orelha de elefante e taro gigante. Ingerida em sua forma natural pode manifestar sensações de queimação, inchaço nos lábios, boca e língua, náuseas, vômitos e dificuldade de engolir, devido presença dos cristais de oxalato de cálcio em todas as partes da planta (BRASIL, 2012).

Rahman *et al.*, (2011) descreveram e estudaram o extrato etanólico do rizoma seco da *Alocasia indica* (Roxb.) Schott. da mesma família da *A. macrorrhizos* em modelo murino. A planta contém flavonoides, glicosídeos, cinogenéticos, ácido ascórbico, ácido gálico, ácido maleico, ácido oxálico, aminoácidos, ácido succínico e β -lectinas e demonstrou efeito analgésico e anti-inflamatório comparável ao uso do diclofenaco de sódio.

Mulla *et al.*, (2010) em seu ensaio também demonstraram que o extrato etanólico da *A. macrorrhizos* apresentou atividade antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória nos modelos de edema de pata induzido por carragenina, edema de pata induzido por formalina, em edema de orelha induzido por ácido araquidônico, e modelo de edema de orelha induzido por xileno comparável ao ácido ascórbico da droga de referência padrão, pode ser devido à

presença de flavonoides e outras metades poli fenólicas nela presente, o que parece apoiar o uso desta planta na medicina tradicional.

Figura 2 - *Alocasia macrorrhizos* no pátio da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) – Teófilo Otoni/MG.



Figura 2: Localização: 17°52'56.3"S 41°29'46.5"W. Fonte: a autora.

A *A. macrorrhizos* evidenciou possuir terapêutica para doença autoimune inflamatória crônica, a partir do modelo murino de vitiligo, sendo possível a mensuração da sua potencialidade como: inibitório de tripsina, hemaglutinante e antioxidante; aferir a viabilidade celular, produção de óxido nítrico (NO) e liberação de citocinas TNF- α (CORDEIRO *et al.*, 2021).

Foram isolados a partir do tubérculo da *A. macrorrhizos*, novas lignanamidas e um novo alcaloide monoindólico, sendo avaliados quantos aos efeitos inibitórios na produção de NO em células RAW 264.7 (HUANG *et al.*, 2017), demonstrando resultados em que sugerem que estes compostos podem ser os responsáveis pelo efeito anti-inflamatório significativo da *A. macrorrhizos*.

No entanto, em que pese tal histórico, em relação à AR não há investigações tendo como objeto de estudo a *A. macrorrhizos*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial anti-inflamatório do extrato aquoso da *Alocasia macrorrhizos* no tratamento da artrite.

3.2 Objetivos Específicos

- Induzir o modelo de Artrite Induzida por Adjuvante (AIA) em ratos;
- Obter o extrato a partir do tubérculo da *A. macrorrhizos*;
- Tratar o modelo AIA com o extrato aquoso da *A. macrorrhizos*;
- Avaliar a espessura das articulações das patas posteriores e joelhos dos animais induzidos e não induzidos.
- Avaliar o comportamento nociceptivo através da vocalização de todos os animais;
- Analisar o número de células do lavado articular;
- Realizar a quantificação de citocinas por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), a partir da amostra de sangue e macerado de linfonodo;
- Realizar análise histopatológica das articulações dos joelhos de animais induzidos e não induzidos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do extrato da *Alocasia macrorrhizos*

A coleta da planta adulta ocorreu no pátio do Instituto de Ciência, Engenharia e Tecnologia (ICET) da UFVJM, Campus Mucuri, localizada nas coordenadas 17°52'56.3"S 41°29'46.5"W e submetida ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) com número A7DD07D, sob o registro de nº HDJF3335 no Herbário Dendrológico Jeanine Felfili da UFVJM Campus JK em Diamantina-MG.

As partes foram retiradas e mantidas apenas os tubérculos, devido à mesma apresentar o potencial de ação anti-inflamatório como nos estudos de Fang *et al.*, (2012) e Cordeiro *et al.*, (2021). Os tubérculos foram lavados em água corrente e realizados cortes menores para melhor manuseio, com processamento na estufa pelo período de 24 horas a 60C°, em seguida triturados (FIGURA 3).

O extrato moído e aquecido foi preparado usando 400 mL de água destilada/200 g de amostra, sendo homogeneizados e deixados em repouso por 24h refrigerados ao abrigo da luz. Após 24 horas, foram filtrados com algodão e realizou-se a filtração dos extratos a vácuo (CORDEIRO *et al.*, 2021). O extrato foi liofilizado e armazenado a -80° C.

Figura 3 - Tubérculo da *Alocasia macrorrhizos* (A); Cortes do tubérculo após aquecimento em estufa (B); Tubérculo moído (C); Filtragem do processamento do tubérculo (D).



Fonte: a autora.

4.2 Animais

Foram utilizados ratos, fêmeas (174 – 234g) e, machos (224 – 299g) da linhagem Holtzman, entre 7 a 8 semanas provenientes do Biotério da UFVJM – Campus Diamantina.

Os animais receberam água filtrada e ração própria industrializada da marca NUVILAB-CR1[®] *ad libitum*, com temperatura e foto período em ciclos de 12 horas controlados durante todo o experimento. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com cama de maravalha de pinus, autoclavada. As caixas mantidas foram identificadas em estantes ventiladas, com exaustão do ar, em sala climatizada no Biotério localizado na Faculdade de Medicina do Mucuri – Campus do Mucuri - UFVJM. Os protocolos envolvendo o uso de animais de laboratório foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFVJM, sob o protocolo n° 09-2021 R.

4.3 Modelo de Artrite Induzida por Adjuvante

As inoculações foram administradas por via intradérmica (i.d) na base da cauda e intra-articular na articulação do joelho esquerdo; o joelho é comumente afetado na artrite reumatoide, apresentando inchaço, dor e calor (KHURANA; BERNEY, 2005); sendo a primeira injeção de 100 µl de CFA (i.d) contendo *Mycobacterium tuberculosis* (1 mg/mL) na base da cauda e após sete dias, a segunda de 30 µl de CFA, contendo *Mycobacterium tuberculosis* (1 mg/mL) intra-articular (no joelho esquerdo).

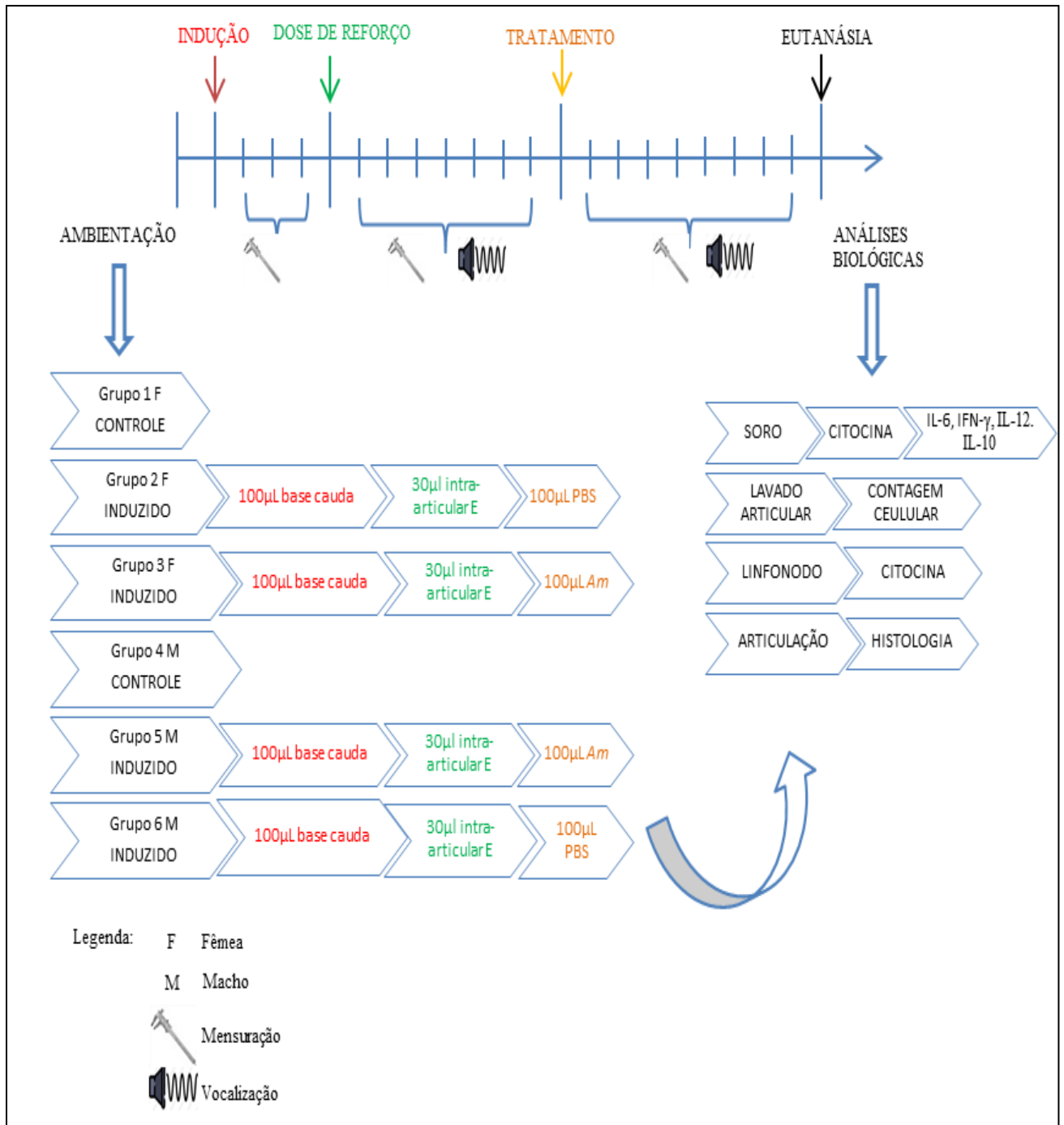
Anteriormente a indução foram registrados o peso dos animais e as medidas das articulações dos joelhos (tibiofemoral) e das patas posteriores (tibiotársica).

Os animais foram divididos aleatoriamente entre os dois gêneros em grupos experimentais: Fêmeas não induzidas; induzidas e tratadas com Phosphate Buffered Saline (PBS), sendo o controle positivo; induzidas e tratadas com o extrato aquecido da *A. macrorrhizos*. Machos não induzidos; induzidos e tratados com PBS (controle positivo); induzidos e tratados com o extrato aquecido da *A. macrorrhizos*, conforme descrito abaixo e demonstrado na Figura 4:

- GRUPO I - Fêmea: Não induzido;
- GRUPO II – Fêmea: Induzido e tratado com 100 µl de PBS;
- GRUPO III – Fêmea: Induzido e tratado com 100 µl (100 mg/kg) de *A. macrorrhizos*;

- GRUPO IV – Macho: Não induzido;
- GRUPO V – Macho: Induzido e tratado com 100 µl de PBS;
- GRUPO VI – Macho: Induzido e tratado com 100 µl (100 mg/kg) de *A. macrorrhizos*;

Figura 4 - Esquema do Protocolo Experimental.



Fonte: A autora.

4.3.1 Tratamento com o extrato aquoso da *Alocasia macrorrhizos*

O tratamento ocorreu a partir dos primeiros sinais de inflamação, através da avaliação clínica e da mensuração joelhos. Os animais receberam 100 μ l do extrato aquoso do tubérculo aquecido da *A. macrorrhizos* (100 mg/kg) diluídos em PBS por Gavagem (orogástrica), diariamente durante nove dias.

4.3.2 Avaliação de edema nas patas posteriores e articulações do joelho

As avaliações foram realizadas inicialmente a cada três dias e após a dose de reforço, a cada dois dias em todos os animais, induzidos e não induzidos.

As mensurações das patas posteriores (tibiotársicas) e joelhos (tibiofemoral) foram realizadas com o medidor de espessura digital (Figura 5 – A) e o diâmetro articular (DA) médio lateral dos joelhos com o paquímetro digital conforme Figura 5 (B).

Figura 5 – Medidor de espessura digital (A); Paquímetro digital (B).



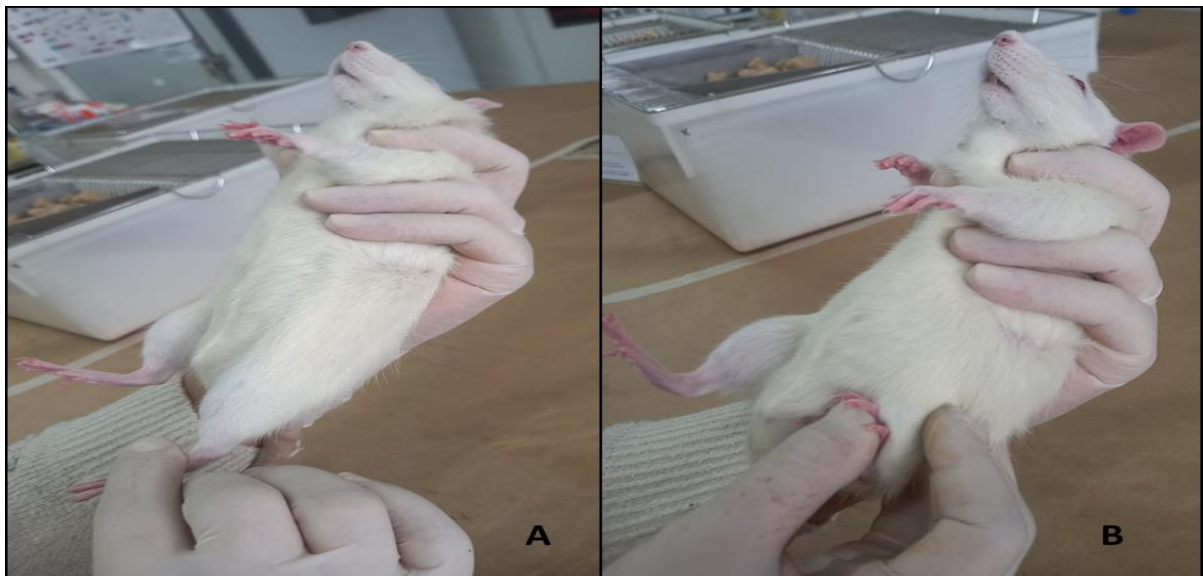
Fonte: a autora

4.3.3 Avaliação do comportamento nociceptivo pela vocalização

A avaliação comportamental, realizada através da vocalização, um dos testes comportamentais quantificáveis utilizados para analisar a hiperalgesia primária da articulação do joelho após indução de inflamação (YUN *et al.*, 2002).

O limiar foi medido através da extensão (Figura 6 – A) e flexão (Figura 6 – B) dos membros posteriores, a fim de se obter vocalização (audível) (HAN *et al.*, 2005) . As flexões foram repetidas por cinco vezes consecutivas, de 0 a 5 flexões (0 - nenhuma vocalização, 1 uma vocalização, 2 – vocalizações, 3 vocalizações, 4 – vocalizações e nota máxima 5, equivalente a 5 vocalizações), tanto na pata posterior esquerda, quanto na pata posterior direita de todos os animais induzidos e não induzidos a cada três dias e após a dose de reforço foi feito a cada dois dias.

Figura 6 – Mobilização do animal para avaliação da vocalização a partir da extensão (A) e flexão (B) de cada membro posterior.



Fonte: a autora.

4.3.4 Coleta do lavado sinovial

No 22º dia após a imunização os animais foram eutanasiados. Após a eutanásia, foi feita tricotomia em ambos os joelhos e procedeu-se a lavagem da cavidade articular com uma injeção de solução fisiológica a 0,9% e recolhendo-se o exsudato articular. As amostras foram colocadas em tubos eppendorff, centrifugadas e coletado o sobrenadante e mantidas em banho de gelo para contagem total de leucócitos.

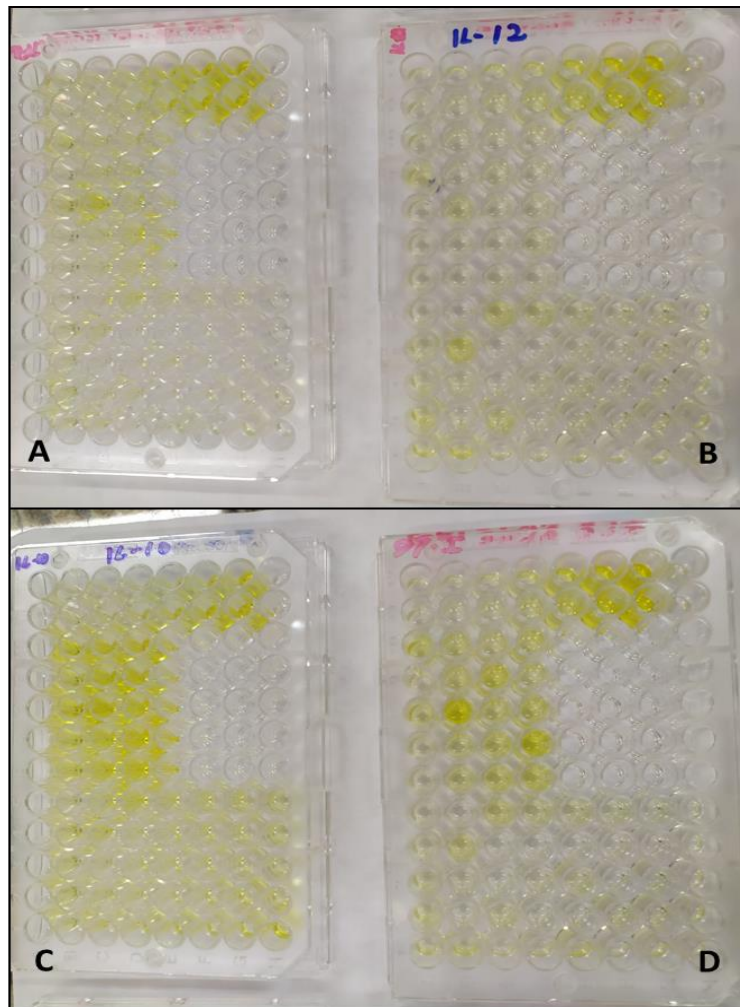
4.3.5 Análise do número de células do lavado sinovial

Amostras do lavado sinovial foram utilizadas para a contagem global de células na câmara de Neubauer (10^4 células/mm³), diluídas em solução de Turk (composto de ácido acético glacial, azul de metileno e água destilada), em proporção de 1:20 (BRESSAN *et al.*, 2006).

4.3.6 Determinação de níveis de IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-10.

A detecção de mediadores inflamatórios da artrite reumatoide nas amostras de sangue e linfonodo inguinal de animais induzidos e não induzidos foi realizada por ELISA seguindo as instruções do fabricante (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, EUA). Brevemente, placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluído em tampão e incubadas por 16h a 4º C (Figura 7). Após este período os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS – Tween 20 (PBST) + 10% Soro de Feto Bovino (SFB), por 1 hora. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes em PBST e adicionadas às curvas-padrão para as respectivas citocinas, diluídas na razão de 1:2. Nos poços seguintes, as amostras foram distribuídas e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Terminada a incubação as placas foram lavadas e o 2º anticorpo biotilado + streptavidina foi adicionado e incubado por mais 1 hora à temperatura ambiente. Mais sete lavagens foram feitas e a reação revelada pela adição do substrato contendo Tetramethylbenzidine (TMB). A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1 M e a leitura feita em leitor de ELISA (EZ Read 2000, Biochrom) a 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações.

Figura 7 - Microplacas sensibilizadas em Ensaio Imune Enzimático (Elisa) – Sanduíche. Determinação das citocinas *IFN- γ* (A), *IL-6* (D), *IL-12* (B), *IL-10*(C).



Fonte: a autora.

4.3.7 Análise histopatológica

No 22º dia após a imunização os animais foram eutanasiados e a região da articulação tibiofemoral foi isolada e imersa em formalina a 10%, mantida à temperatura ambiente por aproximadamente 48h, para a fixação. Em seguida, as peças foram lavadas em água corrente e imersas em solução descalcificadora contendo: EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) com HCL (ácido clorídrico) e PBS durante 11 dias. Após a confirmação da desmineralização das peças, foram submetidas à bateria de desidratação e diafanização, em resumo: álcoois 70%, 85%, 95% e três banhos de Xilol. As amostras foram colocadas em parafina dos quais feitos cortes histológicos de 07 μ m para obtenção das lâminas. Em seguida, coradas com hematoxilina/eosina e avaliadas para a presença de infiltrados inflamatórios.

4.4 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graph Pad Prism versão 5.0. Os resultados foram demonstrados como média \pm desvio padrão, representativos de pelo menos três experimentos independentes. A significância entre os grupos foi analisada utilizando testes não paramétricos de Mann-Whitney ou Two-way. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Artrite Induzida por Adjuvante

Esse modelo apresenta uma incidência próxima a 100% e uma reprodutibilidade da duração e curso da inflamação com a artrite humana como: infiltração de células inflamatórias, hiperplasia sinovial, neoangiogênese, formação de pannus e destruição da cartilagem (SCHAIBLE *et al.*, 2010); (FERRACCIOLI *et al.*, 2010).

Ao exame físico verificou-se que a articulação de alguns animais em que fora inoculado a solução, ficou enrijecida, resultando em uma articulação comprometida (Figura 8 - A), característica importante em pacientes artríticos citado por Gomes (2008) que a rigidez articular, seguido de fraqueza muscular, edema e dor, são fatores que geram problemas biomecânicos futuros por promover deformidades funcionais e estruturais.

Foram observados sinais inflamatórios em outros locais como: no tornozelo contralateral ao membro experimental, como demonstrado por Kelly *et al.*, (2007) que artrite induzida por CFA pode-se obter aumentos contralaterais, que podem ser responsáveis pela disseminação simétrica da AR. Outros achados como, nódulos articulares em patas dianteiras se estendendo para as falanges, semelhante à manifestação em pacientes com AR (KHURANA, BERNEY, 2005) como mostrado na Figura 8 - B, eritemas na cauda e orelha (Figura 8 - C) corroborando com os achados de Bevaart (2010), onde a artrite em humanos possui efeito sistêmico, podendo se manifestar também na pele.

Figura 8 – Avaliação de sinais inflamatórios em ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante.

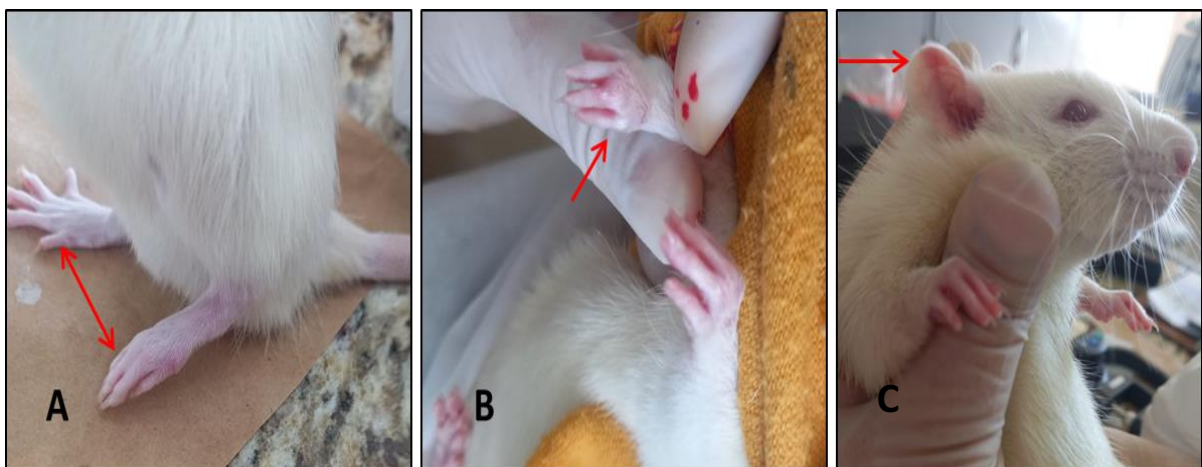


Figura 8: As setas em destaque representam registros de reações inflamatórias em animais induzidos por CFA. Pata do membro induzido com falanges enrijecidas, membro posterior não funcional (A); Nódulos articulares em patas dianteiras (B); eritema em orelha (C). Fonte: a autora

5.1.1 Avaliação da espessura dos joelhos

A administração intra-articular promoveu aumento do edema do joelho esquerdo a partir do 3º dia como constatado nos estudos de Oliveira *et al.*, (2007), onde a artrite induzida por CFA inicia entre o 3º e 7º dias após a inoculação. Os animais dos grupos induzidos, de ambos os gêneros apresentaram edema. No comportamento nociceptivo, os machos revelaram diferenças em relação às fêmeas, observações feitas também nos achados de Cai *et al.*, (2002) e Cook; Moore (2006) diferentemente de alguns autores, que em seus experimentos analisaram a severidade da AIA em espécies Holtzman e verificaram que não há diferenças entre os sexos, que tanto machos como fêmeas desenvolveram a doença, com indicadores clínicos semelhantes ao final do período experimental (SWINGLE *et al.*, 1969; WAUBEN *et al.*, 1994; XAVIER *et al.*, 2012).

A elevação máxima ocorreu no 8º dia, 24 horas após a segunda imunização, em ambos os grupos induzidos. Diminuindo no 12º dia, com destaque ao grupo que recebeu o extrato aquoso da *Alocasia macrorrhizos* (EAAM) com regressão significativa de medidas em comparação aos demais grupos (Gráfico 1), demonstrando que o extrato aquoso da *Alocasia macrorrhizos* influenciou a redução do edema articular dos animais induzidos por CFA, testificado também por Zhang *et al.*, (2008) que a planta que foi utilizada em seu estudo na qual continha flavonoides também foi eficaz na redução do processo inflamatório e destruição da cartilagem em AIA.

Gráfico 1 – Efeito do tratamento do Extrato Aquoso da *Alocasia macrorrhizos* na mensuração dos joelhos de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante.

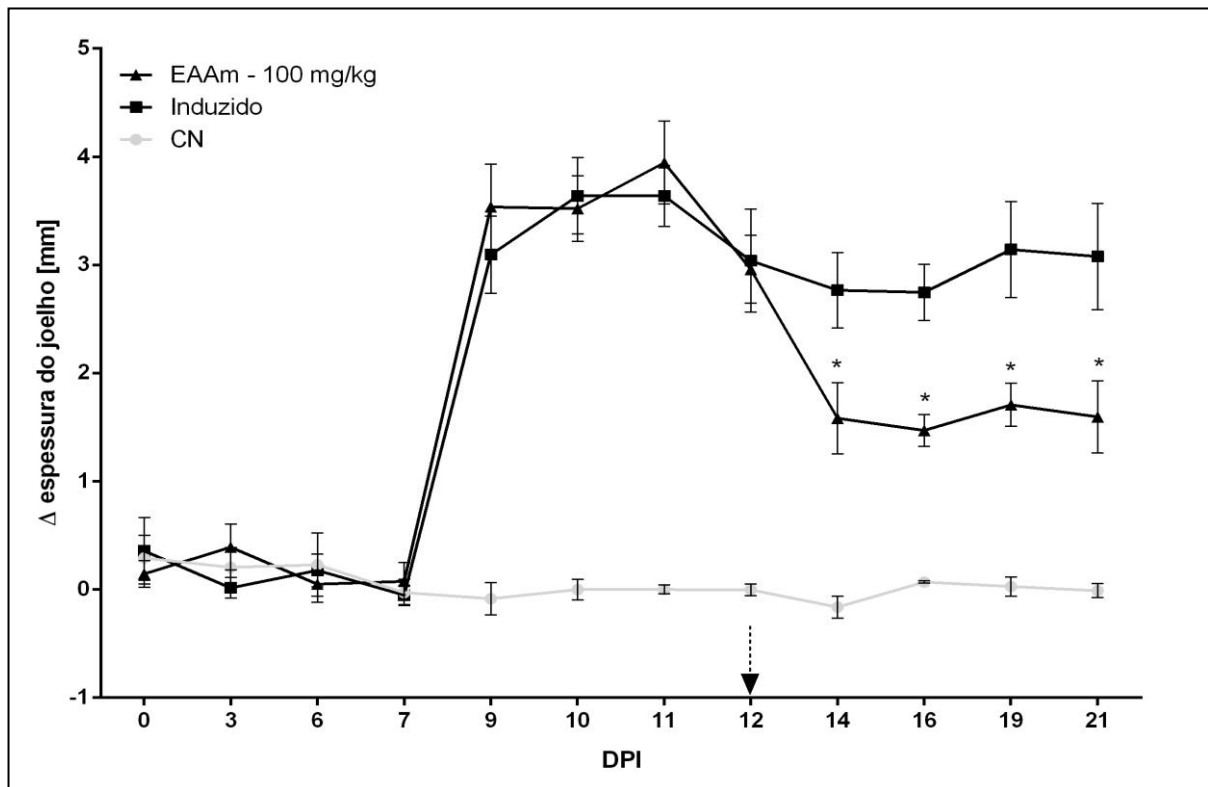


Gráfico 1.– Avaliação da espessura do joelho de ratos, fêmeas e machos, do grupo CN, grupo Induzido, no qual, recebeu a injeção 100 μ L de CFA, i.d, na base da cauda e 30 μ l de CFA, i.d, intra-articular e administrado 100 μ L de PBS por gavagem e grupo Induzido EAAm tratado com 100 mg/kg diluído em 100 μ L PBS por gavagem. *O grupo EAAm obteve redução estatisticamente significativa na espessura dos joelhos em comparação ao grupo Induzido ($p < 0,05$). DPI = dia após a indução. Seta tracejada = início do tratamento.

5.1.2 Avaliação do comportamento nociceptivo pela vocalização

Foi realizada a avaliação comportamental através da vocalização emitida pelos animais visando averiguar a nocicepção espontânea, como descrito por Yu *et al.*, (2002) e Neugebauer *et al.*, (2007). Os animais vocalizam nas faixas audíveis e ultrassônicas. Quando evocadas por estímulos nocivos, as vocalizações audíveis representam uma reação nocifensiva (HAN *et al.*, 2005).

As vocalizações foram realizadas nos grupos: controle negativo (CN), no grupo Induzido e no grupo EAAm como demonstrado no Gráfico 2. Houve uma tendência a um aumento crescente do número de vocalizações após a segunda dose de reforço nos grupos Induzido e EAAm, essa observação sugere uma resposta inflamatória da AIA, que segundo HAN *et al.*, (2005) a duração das vocalizações audíveis aumentam no estado de dor artrítica.

Em adição, após o início do tratamento com o extrato aquoso do tubérculo da *A. macrorrhizos*, houve uma redução da frequência de vocalização no grupo EAAM comparados aos demais grupos atestando o potencial efeito anti-inflamatório da *A. macrorrhizos*.

Gráfico 2 – Efeito do tratamento do Extrato Aquoso da *Alocasia macrorrhizos* na emissão de vocalização de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante.

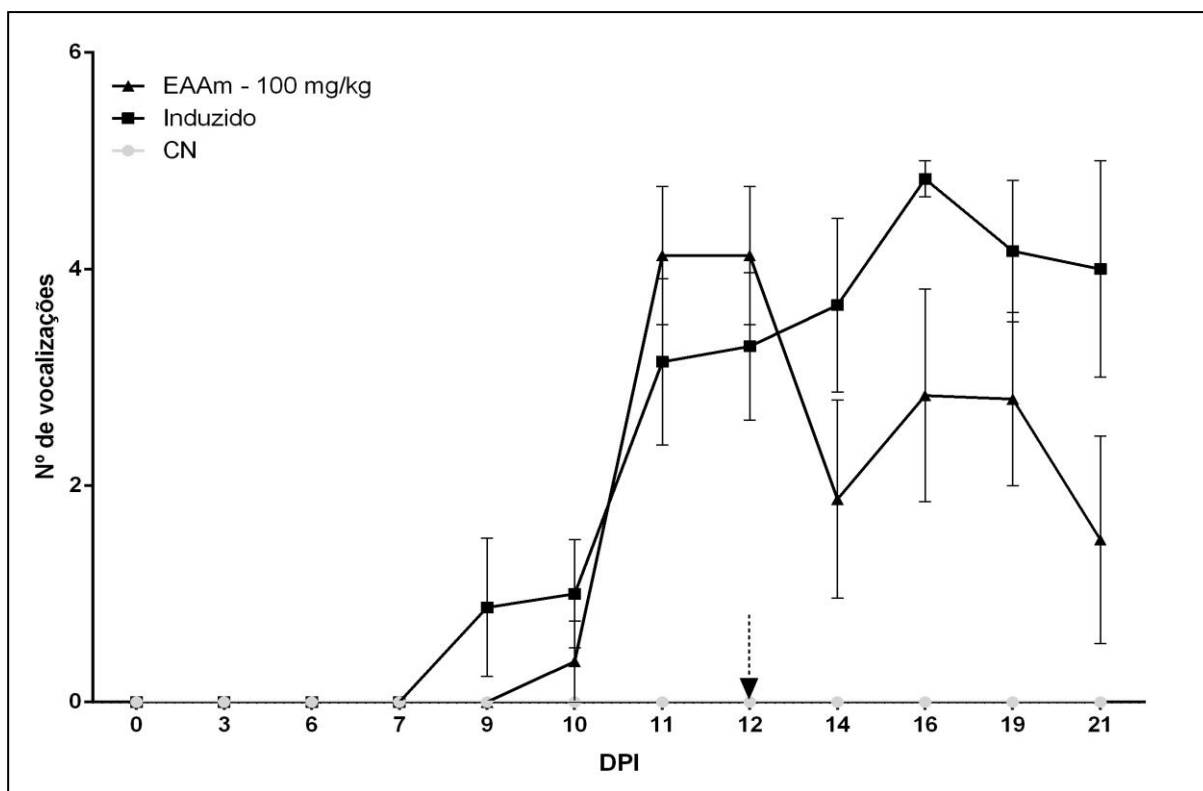


Gráfico 2 – Avaliação da vocalização de ratos, fêmeas e machos através da flexão e extensão das patas posteriores do grupo Controle Negativo, grupo Induzido, no qual, recebeu a injeção 100 μ L de CFA, i.d, na base da cauda e 30 μ l de CFA, i.d, intra-articular e administrado 100 μ L de PBS por gavagem. e grupo Induzido EAAM tratado com 100 mg/kg diluído em 100 μ L PBS por gavagem. Os dados são apresentados como a diferença entre as médias dos valores medidos das patas. DPI = dia após a indução. Seta tracejada = início do tratamento.

5.1.3 Análise do número de células do lavado sinovial

Os animais do grupo CN apresentaram na contagem global do lavado sinovial coletado uma média de 10 células ($\times 10^4$ /ml) conforme demonstrado no Gráfico 3. O grupo experimental Induzido apresentou valores médios superiores, comparado ao CN na contagem global de células, sendo que, o influxo de leucócitos é um dos eventos fundamentais para o desenvolvimento do processo inflamatório na artrite reumatoide e também por estar envolvido na destruição tecidual (GOMES *et al.*, 2013), (TARRANT; PATEL, 2006).

O grupo induzido e tratado com 100 mg/kg do EAAM apresentou redução significativa de células no lavado sinovial comparado ao grupo Induzido (Gráfico 3). Sendo assim, a notável diminuição de células sinoviais pelo tratamento da *Alocasia macrorrhizos* foi um efeito positivo.

Gráfico 3 – Efeito do tratamento do Extrato Aquoso da *Alocasia macrorrhizos* em lavado sinovial de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante.

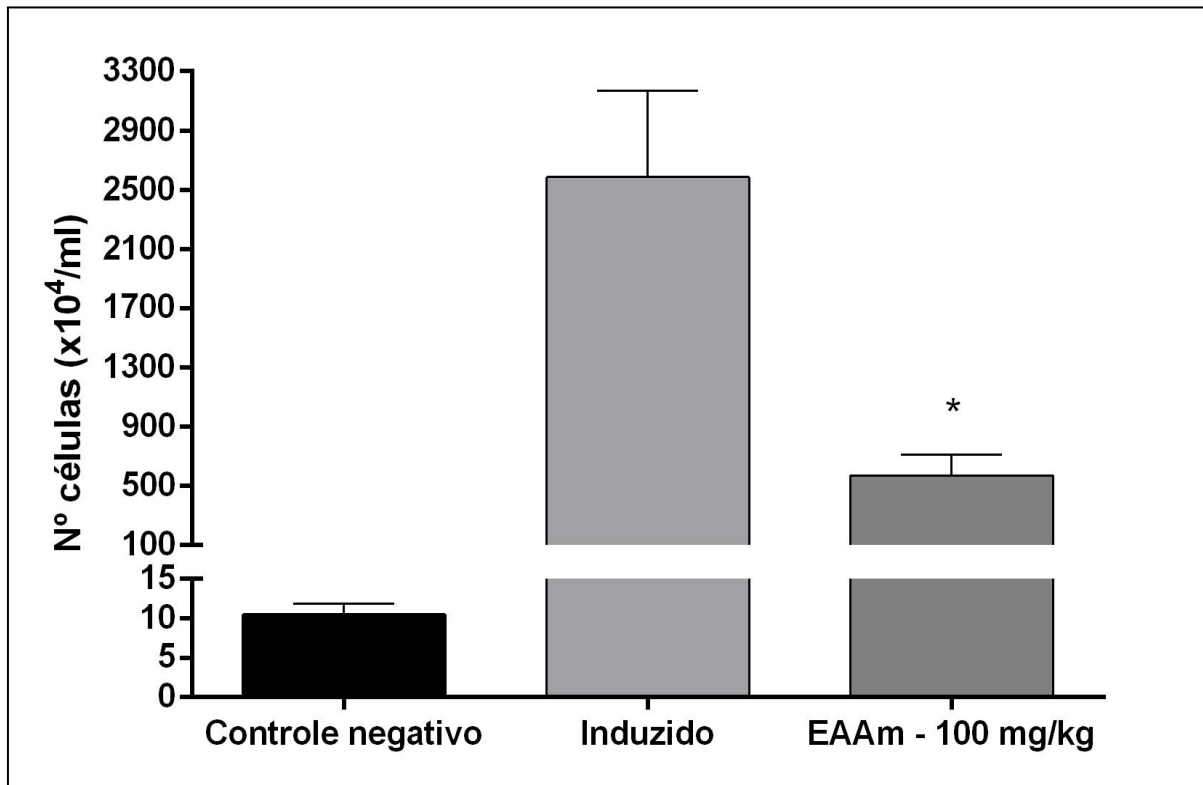


Gráfico 3 – Análise do número de células em lavado sinovial em ratos fêmeas e machos. O grupo Induzido recebeu a injeção 100 µL de CFA, i.d, na base da cauda e 30 µl de CFA, i.d, intra-articular e administrado 100 µL de PBS por gavagem. O Grupo EAAM tratado com 100 mg/kg diluído em 100 µL PBS por gavagem. O grupo assinalado por um asterisco (*) obteve redução estatisticamente significativa na infiltração leucocitária intra-articular em comparação ao grupo Induzido ($p < 0,05$).

5.1.4 Determinação de níveis de IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12

Com os resultados obtidos verificamos um aumento na produção das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , IL-6 e IL-12 tanto no soro dos animais (Gráfico 4) quanto no macerado do linfonodo inguinal (Gráfico 5). A produção foi maior no grupo Induzido quando comparados aos demais grupos. A expressão destas citocinas nas amostras de ratos tratados com o extrato aquoso da *Alocasia macrorrhizos*, foi significativamente mais reduzida quando comparado ao grupo Induzido, com destaque IFN- γ e IL-6, aproximando aos níveis do grupo

Controle Negativo. A citocina IFN- γ apresenta função inflamatória clássica com processo potencializado pela expressão da citocina IL-12 (POPE e SHAHRARA, 2012), ambas com concentrações elevadas no soro e no macerado do linfonodo (Gráficos 4 e 5) dos animais Induzidos, que estão geralmente associados com sérios danos estruturais na cartilagem e no osso (THOMÉ, 2011); (VAN DEN BERG, 2001).

Na artrite a produção da IL-6 resulta na convocação de células inflamatórias mononucleares, promovendo o recrutamento de células T por meio da regulação da secreção de quimiocinas durante a inflamação, contribuindo assim para o desenvolvimento de células B e a proliferação de fibroblastos sinoviais. Estes mediadores pró-inflamatórios iniciam e perpetuam o desenvolvimento da inflamação crônica imuno-mediada, levando à destruição articular e manifestações sistêmicas (SILVA *et al.*, 2011).

Observa-se também o aumento da citocina IL-10 nas amostras do soro do que nos dos linfonodos inguinais dos animais em todos os grupos (Gráficos 4 e 5). A IL-10 é produzida por monócitos, macrófagos, células B e células T que corresponde à citocina marcadora de atividade anti-inflamatória (CAMPO *et al.*, 2011); (CHOY; PANAYI, 2001).

Gráfico 4 – Efeito do tratamento do Extrato Aquoso da *Alocasia macrorrhizos* sobre a produção de citocinas em soro de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante.

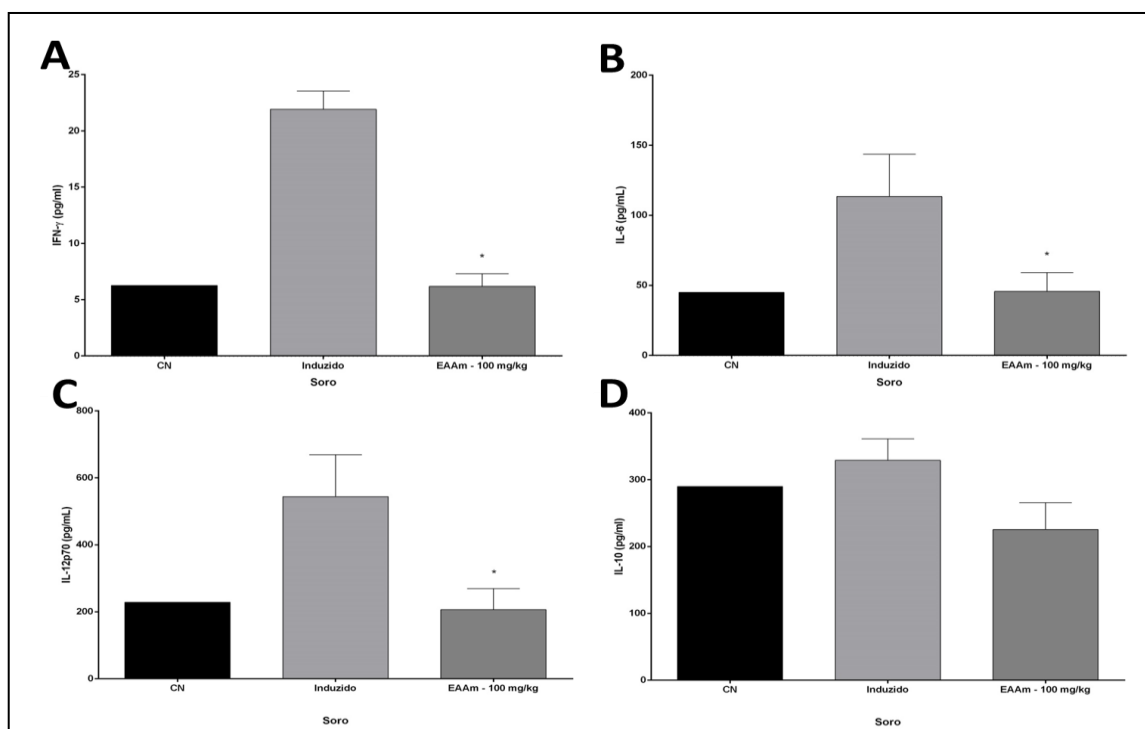


Gráfico 4 – Dosagem das citocinas IFN- γ , IL-6, IL-12 e IL-10 (painés A-D, respectivamente) em amostra de soro, empregando Kits de Elisa (BD Biosciences). O grupo assinalado por um asterisco (*) obteve redução estatisticamente significativa no aumento das citocinas pró-inflamatórias em comparação ao grupo Induzido ($p < 0,05$).

Gráfico 5 – Efeito do tratamento do Extrato Aquoso da *Alocasia macrorrhizos* sobre a produção de citocinas em linfonodo inguinal de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante.

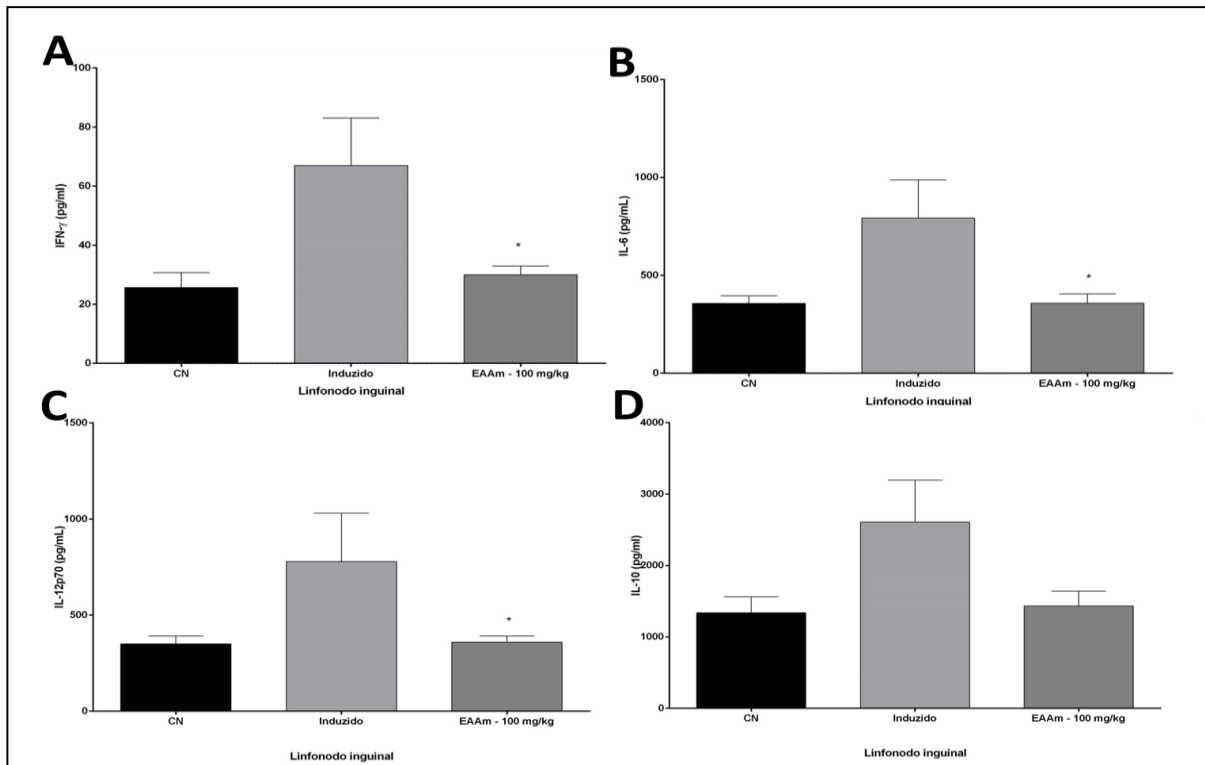


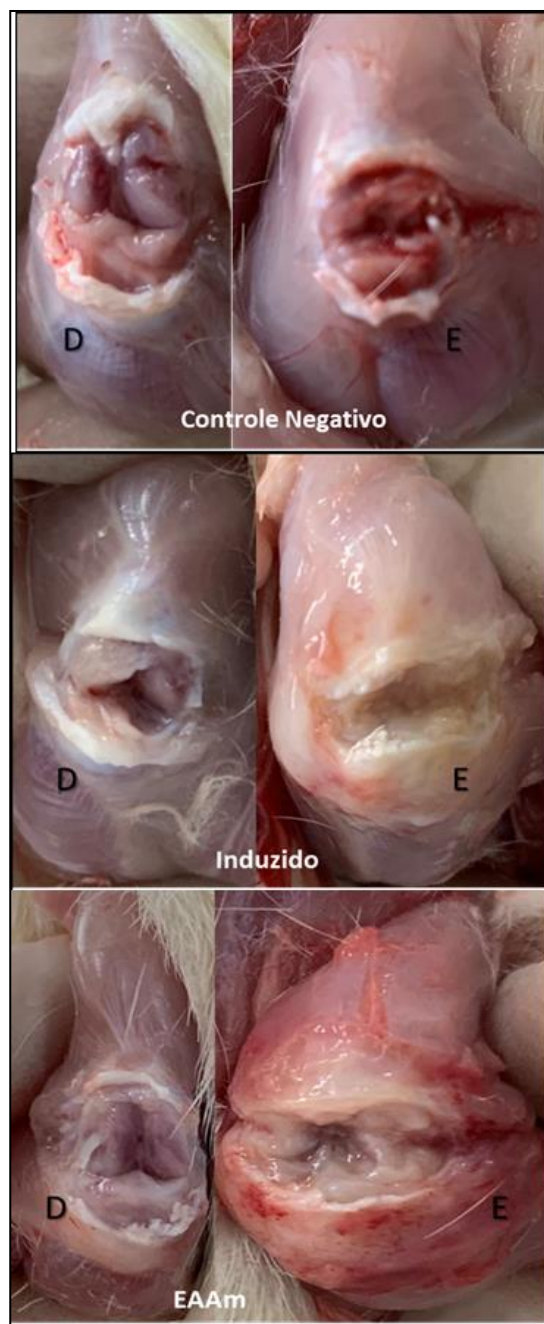
Gráfico 5 – Dosagem das citocinas IFN- γ , IL-6, IL-12 e IL-10 (painés A-D, respectivamente) em linfonodo inguinal, empregando Kits de Elisa (BD Biosciences). O grupo assinalado por um asterisco (*) obteve redução estatisticamente significativa no aumento das citocinas pró-inflamatórias em comparação ao grupo Induzido ($p < 0,05$).

5.1.5 Análise Histopatológica

Após eutanásia, os joelhos dos animais foram seccionados e a região anterior da articulação tibiofemoral foi exposta para análise macroscópica na cartilagem articular, conforme demonstrado na Figura 9.

Como exemplo, os joelhos do animal pertencente ao grupo Induzido (Figura 9), apresentaram aumento da espessura, com destaque o joelho esquerdo, no qual, recebeu a inoculação do CFA intra-articular, com presença de lesão condral e hipotrofia ao passo que os joelhos do grupo EAAM, observou uma preservação do membro e o membro induzido mais corado em relação ao grupo não tratado.

Figura 9 – Comparativo entre os joelhos em ratos, do grupo CN, Induzido e EAAm após incisão na região anterior do joelho. D = Direito e E=Esquerdo.



Fonte: a autora.

Após a coleta, as articulações dos joelhos foram preparadas e coradas com hematoxilina-eosina para análise microscópica.

Assim, foi possível observar que os animais do grupo Induzido apresentaram edema articular, alterações na morfologia do joelho, ainda desenvolveram expressiva inflamação na membrana sinovial, com acentuada degradação da cartilagem observada pela presença de intensa reação inflamatória na cavidade articular (Figura 11 – Induzido a) e

formação de novos vasos (Figura 11 – Induzido b), manifestações que precedem as alterações articulares também observadas por Oliveira *et al.*, (2007) e Menezes (2013).

Figura 11 – Fotomicrografias representativas de cortes histológicos da articulação tibiofemoral de animais Controle Negativo (a, b), Induzido (a, b) após injeções de CFA.

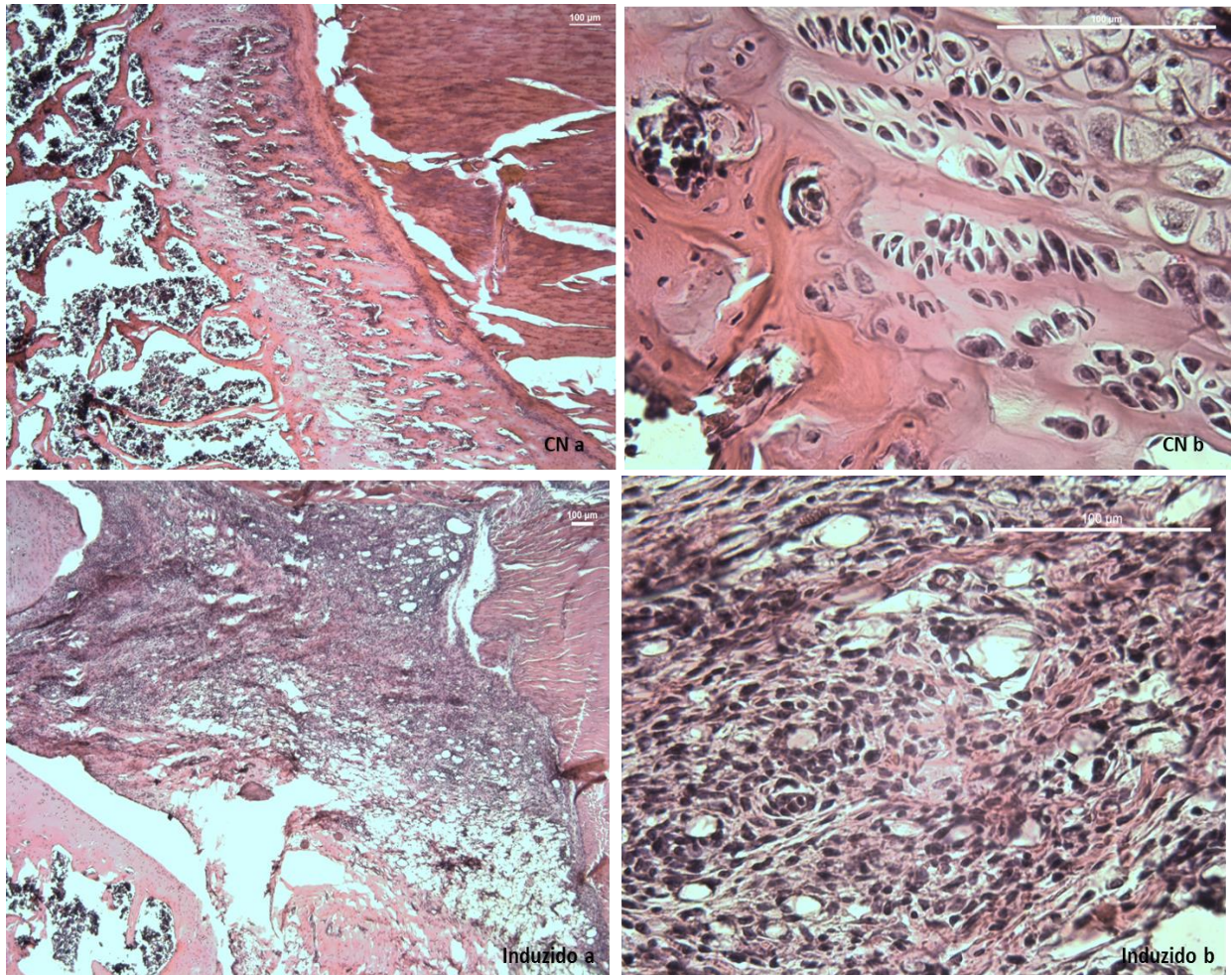


Figura 11 - Amostras histológicas das articulações tibiofemoral esquerdas. As amostras foram retiradas de um animal não induzido CN a (aumento de 40X) e CN b (400X), plano com tecido muscular, tecido conjuntivo frouxo e tecido cartilaginoso. E Induzido a (40X) e b (400X), com influxo inflamatório linfomononuclear e vasos neo-formados (Induzido b – 400x).

A inflamação da membrana sinovial ocorre por hiperplasia da camada interna, com uma grande proliferação de células, neoangiogênese, e infiltrado inflamatório (VAN DE SANDE; BAETEN, 2016) como representada na Figura 12, onde verifica-se na amostra histológica PBS (a) a formação grave de pannus, destruição da cartilagem e erosão óssea, alterações como essas também constatada por Cai *et al.*, (2006) .

Já no grupo Induzido e tratado com o extrato da planta EAAM (b), houve uma atenuação do processo inflamatório com preservação da matriz cartilaginosa e trabéculas.

Portanto, essa diferença revela-se um efeito positivo do extrato do tubérculo da *Alocasia macrorrhizos* em modelo experimental de artrite reumatoide.

Figura 12 – Fotomicrografias representativas de cortes histológicos da articulação tibiofemoral de animais Induzido e tratado com PBS e Induzido e Tratado com EAAM.

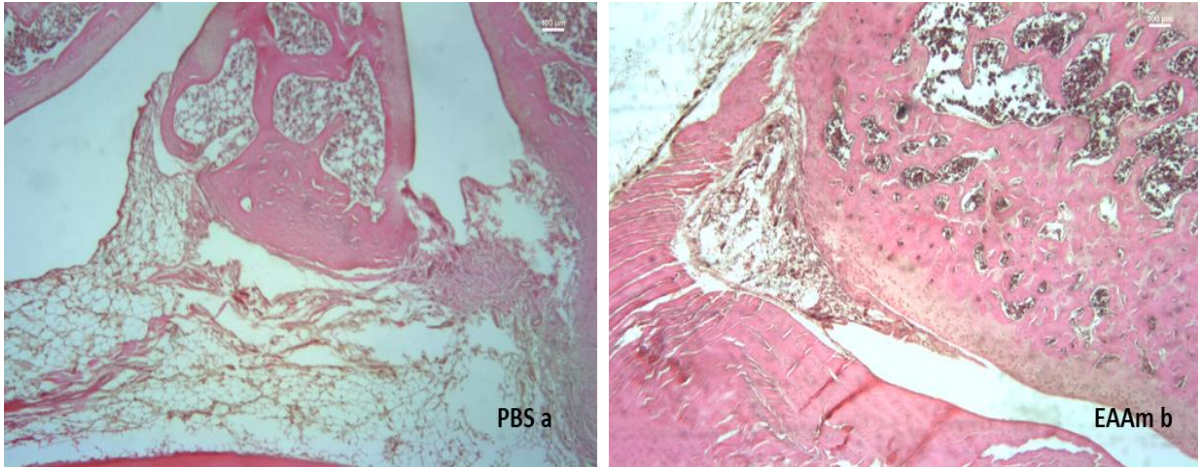


Figura 12 - Amostras histológicas das articulações tibiofemorais esquerdas. Animal induzido e tratado com PBS (PBS a) e animal induzido e tratado com o Extrato Aquoso da *Alocasia macrorrhizos* (EAAM b). Ambas imagens com aumento de 40X. No grupo EAAM houve menor expansão da membrana sinovial na cavidade articular, com tecidos matriz cartilaginosa melhor delimitada em comparação ao grupo induzido e tratado com PBS (a), no qual, a invasão da sinóvia e erosão da cartilagem foi mais pronunciada.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, foram avaliados os efeitos do extrato aquoso da *Alocasia macrorrhizos* em Artrite Induzida por Adjuvante.

O modelo AIA foi reprodutível neste estudo, todos os animais, fêmeas e machos apresentaram artrite.

Em conclusão, o extrato aquoso do tubérculo da *Alocasia macrorrhizos* demonstrou potencial ação anti-inflamatória, sendo evidenciado principalmente pela atenuação do edema, a partir da mensuração da espessura dos joelhos, através da redução da frequência de vocalização no grupo EAAM comparados aos demais grupos, pela redução do número de leucócitos do lavado sinovial, pela dosagem de citocinas comparado quanto aos grupos tratados e não tratados e nas amostras histológicas, no qual, o grupo tratado com a planta apresentou uma menor robustez do pannus, características estas que estão envolvidas tanto na inflamação, quanto na destruição tecidual.

Esta investigação pode ser utilizada como suporte científico a futuras pesquisas e desenvolvimentos de novos fármacos, considerando a potencialidade desta planta medicinal no tratamento da artrite reumatoide.

REFERÊNCIAS

ALAMANOS Y; VOULGARI PV; DROSOS AA. **Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review.** Semin Arthritis Rheum. 2006 Dec; 36(3): 182-8. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2006.08.006. Epub 2006 Oct 11. PMID: 17045630.

ALBERS JM; PAIMELA L.; KURKI P.; EBERHARDT KB.; EMERY P.; VAN 'T HOF MA.; SCHREUDER FH.; LEIRISALO-Repo M; VAN RIEL PL.; **Treatment strategy, disease activity, and outcome in four cohorts of patients with early rheumatoid arthritis.** Ann Rheum Dis 60: 453-8 2001. DOI: 10.1136 / ard.60.5.453. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1753652/> Acesso: 06/12/2020.

ALMARESTANI, L.; FITZCHARLES, M. A.; BENNETT, G. J; RIBEIRO-DA-SILVA, A. **Imaging studies in Freund's complete adjuvant model of regional polyarthritis, a model suitable for the study of pain mechanisms, in the rat.** Arthritis Rheum, Atlanta, v. 63, n. 6, p. 1573-1581, jun. 2011. 63(6): 1573-81. DOI: 10.1002/art.30303. PMID: 21337537.

ANAYA, J.M.; SHOEENFELD Y.; ROJAS-VILLARRAGA A.; LEVY RA.; CERVERA R.; **Autoimmunity – from bench to bedside.** 1st ed. Bogotá: ElRosario University Press; 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459447/> Acesso: 12/12/2020

ASQUITH, D.L.; MILLER, A.M., MCINNES, I.B. and LIEW, F.Y. (2009), **Animal models of rheumatoid arthritis.** Eur. J. Immunol., 39: 2040-2044. DOI:10.1002/eji.200939578

BATHON, J.; TEHLIRIAN C.; Rheumatoid Arthritis. In: Klippel, J.H., Stone, J.H., Crofford, L.J., White, P.H. (eds) **Primer on the Rheumatic Diseases.** Springer, New York, NY. 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-0-387-68566-3_6. Acesso: 14/01/2021.

BAUEROVÁ, K.; PONIŠT, S.; MIHALOVÁ, D.; DRÁFI, F.; KUNCÍROVÁ, V. **Utilization of adjuvant arthritis model for evaluation of new approaches in rheumatoid arthritis therapy focused on regulation of immune process and oxidative stress.** Interdisc. Toxicol., Bratislava, v. 4, n. 1, p. 33-39, mar. 2011. DOI: 10.2478/v10102-011-0007-9. PMID: 21577282; PMCID: PMC3090052.

BENDELE, A. M. **Animal models of rheumatoid arthritis.** J. Musculoskel. Neuron. Interact., Kifissia, v. 1, n. 4, p. 377-385, jan. 2001. PMID: 15758488.

BEVAART, L. **Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis.** Arthritis & Rheumatism, v. 62, n. 8, p. 2192-, 1 . DOI: 10.1002/art.27503. PMID: 20506322

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. **Modes of action of Freund's adjuvant in experimental models of autoimmune disease.** J. Leukoc. Biol., New York, v. 70, n. 6, p. 849-860, dec. 2001. PMID: 11739546.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 60 p. - (Série B. Textos Básicos de Saúde, 1a edição), 2009. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf. Acesso: 01/01/2021

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - **RDC nº 14, de 31 de março de 2010: Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. Brasília: 2010. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0014_14_03_2013.html Acesso 07/12/2020

BRASIL. Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação. **Plantas tóxicas mais comuns no Brasil. Dossiê Técnico. Medidas Preventivas e Curativas**. Fevereiro/2012. Disponível em: <http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTcwNg==>. Acesso: 04/06/2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Brasília: Ministério da Saúde. **Plantas medicinais e fitoterápicos no SUS**. 2017. Disponível em: <https://www.unasus.gov.br/noticia/uso-de-fitoterapicos-e-plantas-medicinais-cresce-no-sus#:~:text=De%20acordo%20com%20o%20Programa,%C3%BAlcera%20e%20sintomas%20do%20climat%C3%A9rio%2C>. Acesso: 01/01/2021.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da artrite reumatoide**. Ano 2020. Disponível em: <http://conitec.gov.br/ultimas-noticias-3/ministerio-da-saude-atualiza-pcdt-para-artrite-reumatoide> Acesso: 18/07/2020.

BRESSAN, E., DE QUEIROZ Cunha.; F., & TONUSSI C R.; (2006). **Contribution of TNF α , IL-1 β and CINC-1 for articular incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis**. Cytokine, 36(1-2), 83–89. DOI: 10.1016/j.cyto.2006.11.007.

BRUNING MCR.; MOSEGUI GBG.; VIANA CMM. **A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde**. Ciência & Saúde Coletiva, 17(10): 2675-2685. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/csc/v17n10/17.pdf> Acesso: 09/08/2020.

BUEDGENS, Fabíola Bagatini. **Avaliação econômica do tratamento da artrite reumatoide no componente especializado da assistência farmacêutica: utilização de recursos e qualidade de vida**. Tese. Florianópolis. 2017.

CAI X.; WONG Y. F. ZHOU, H.; LIU, Z. Q.; XIE, Y.; JIANG, Z. H.; BIAN, Z. X.; XU, H. X.; LIU, L. **Manipulation of the induction of adjuvant arthritis in Sprague-Dawley rats**. Inflammation Research. v. 55. p. 368- 377. 2006. PMID: 17122958 DOI: 10.1007/s00011-006-6026-x.

CAMPO GM, AVENOSO A.; NASTASI G.; MICALI A.; PRESTIPINO V.; VACCARO M.; D'Ascola A.; CALATRONI A.; CAMPO S. **Hyaluronan reduces inflammation in experimental arthritis by modulating TLR-2 and TLR-4 cartilage expression.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2011.

CHAIN, B.M.; PLAYFAIR.J.H.L. **Imunologia Básica: Guia Ilustrado de Conceitos Fundamentais.** Editora Manole, 9ª edição. 2013. 9788520450154. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788520450154/>. Acesso: 07/01/2021

CHONDREX, INC. ®. **A Protocol for Successfully Inducing Collagen-Induced Arthritis (CIA) in Mice.** Protocols. Disponível em: <https://www.chondrex.com/protocols>. Acesso: 10/08/2022.

CHOY EH, PANAYI GS. **Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis.** N Engl J Med. 2001. Mar 22; 344 (12): 907-16. DOI: 10.1056/NEJM200103223441207. PMID: 11259725.

CHOY E. **Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** Rheumatology. 2012; 51(3): DOI: 10.1093/rheumatology/kes113. PMID: 22718924.

CHUNXIA C.; ZHANG P.; PI H.; RUAN H.; HU Z.; WU J. **Extracts of Arisaema rhizomatum C.E.C. Fischer attenuate inflammatory response on collagen-induced arthritis in BALB/c mice, Journal of Ethnopharmacology.** Volume 133, Issue 2, 2011, Pages 573-582, ISSN 0378-8741, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.035>

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. p. 552-562. 2006. PMID: 16455114 DOI: 10.1016/j.physbeh. 2005.12.005.

CORDEIRO IH; LIMA NM.; EC., CARLI GP; ANDRADE TJS., CASTRO SBR., OLIVEIRA MAL.; ALVES CCS., CARLI AP. **Metabolic profiling by LC-DAD-MS, FTIR, NMR and CE-UV of polyphenols with potential against skin pigmentation disorder.** 2021. Natural Product Research, DOI: 10.1080/14786419.2021.2005051.

COSTENBADER KH, FESKANICH D.; MANDL LA.; KARLSON EW. **Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women.** Am J Med. 2006 Jun;119(6):503.e1-9. DOI: 10.1016/j.amjmed. 2005.09.053. PMID: 16750964.

DE AZEVEDO AB, FERRAZ MB.; CICONELLI RM.; **Indirect cost of rheumatoid arthritis in Brazil.** Value Health, v. 11, n.5, p. 869-877, 208. May 16. PMID: 18489511.

DEANE KD.; NORRIS JM.; & HOLERS VM.. **Artrite reumatoide pré-clínica: identificação, avaliação e futuras direções para investigação. Clínicas de doenças reumáticas da América do Norte,** 36 (2), 213–241. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2010.02.001>. Acesso: 05/08/2021.

ELAKKIYA V.; KANNAN K.; AMITAVA B.; SELVAKUMAR R. **Advances in Ayurvedic medicinal plants and nanocarriers for arthritis treatment and management: A review**, Journal of Herbal Medicine, Volume 24, 2020, 100412, ISSN 2210-8033, <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2020.100412>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221080332030083X>. Acesso: 25/10/2020

EULAR, **Critério de classificação da reumatoide de artrite - Liga Européia Contra o Reumatismo**. 2010. Rev. Bras. Reumatol. São Paulo, v. 50, n. 5, p. 481-483, outubro de 2010. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000500001>>. Epub 12 Nov 2010. ISSN 1809-4570. Acesso: 20 de julho de 2020. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000500001>

FANG S LC.; ZHANG Q.; WANG L.; LIN P.; ZHANG J.; WANG X. **Potencial anticâncer do extrato aquoso de *Alocasia macrorrhizos* contra câncer hepático in vitro e in vivo**. 2012 Jun 14; 141 (3): 947-56. DOI: 10.1016 / j.jep. 2012.03.037. Epub 2012 28 de março. Mar 28. PMID: 22472110.

FERRACCIOLI GLL.; ALIVERNINI S.; GREMESE E.; TOLUSSO B.; DE BENEDETTI F. **Interleukin-1 β and interleukin-6 in arthritis animal models: roles in the early phase of transition from acute to chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis**. Mol Med. 2010; 16: 552-7.

FIRESTEIN, G. S., & KELLEY, W. N. **Kelley's textbook of rheumatology**. (2013). Philadelphia, PA, Elsevier/Saunders.

GOELDNER, I.; SKARE TL.; REASON ITM.; UTIYAMA SRR. **Artrite reumatoide: uma visão atual**. J Bras Patol Med Lab, v. 47, n. 5, p. 495-503. Outubro 2011. Artigo de Revisão. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/jbpm/v47n5/v47n5a02.pdf>. Acesso: 23/07/2021.

GOMES R.P. **Atividade física no tratamento de artrite induzida por adjuvante de freund: efeitos na nocicepção, edema e migração celular**. Dissertação Mestrado. Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. 2008.

GOMES R. P.; BRESSAN E. SILVA TM.; GEVAERD MS.; TONUSSI CR.; DOMENECH SC. **Standardization of an experimental model suitable for studies on the effect of exercise on Arthritis**. 2013; 11(1):76-82. DOI: 10.1590/s1679-45082013000100014. PMID: 23579748; PMCID: PMC4872972.

GREENE R. J.; & HARRIS ND. (2008). **Pathology and Therapeutics for Pharmacists: A basis for clinical pharmacy practice** (3rd ed., pp. 761–785). Pharmaceutical Press.

GULKO, P. **Contribution of genetic studies in rodent models of autoimmune arthritis to understanding and treatment of rheumatoid arthritis**. Genes Immun 8, 523–531 (2007). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364419>. Acesso: 18/05/2020.

HAN JS.; NEUGEBAUER V. **Antagonistas mGluR1 e mGluR5 na amígdala inibem diferentes componentes de vocalizações audíveis e ultrassônicas em um modelo de dor artrítica**. Dor. 2005; 113 :211-222. DOI: 10.1016/j.pain. 2004.10.022.

HAZLEWOOD GS.; BARNABE CCM.; TOMLINSON GA.; MARSHALL D.; BOMBARDIER C. **The comparative efficacy and toxicity of initial disease-modifying anti-rheumatic drug choices for patients with moderate-severe early rheumatoid arthritis: A bayesian network meta-analysis.** *Rheumatol J.* 2011;5:107-14. DOI: 10.2174/1874312901105010107. Epub 2011 Dec 30. PMID: 22279509; PMCID: PMC3263474.

HUANG W, Li C, Wang Y, Yi X, He X. **Anti-inflammatory lignanamides and monoindoles from *Alocasia macrorrhiza*.** *Fitoterapia.* 2017 Mar; 117:126-132. DOI: 10.1016/j.fitote.2017.01.014. Epub 2017 Feb 1. PMID: 28161134.

JUNG SM.; KIM KW.; YANG CW.; PARK SH.; & JU JH. (2014). **Cytokine-mediated bone destruction in rheumatoid arthritis.** *Journal of Immunology Research,* 2014, 1–15. DOI: 10.1155/2014/263625. Epub 2014 Sep 10. PMID: 25295284; PMCID: PMC4176903.

JUNIOR FSF.; ROCHA FAC. **Artrite induzida por Zymosan em ratos – mecanismos envolvidos na hipernociceção e na lise da cartilagem articular.** Artigo de Revisão. Órgão Oficial da Sociedade Portuguesa e Reumatologia - ACTA REUM PORT. 2006; 31:143-9

JUNIOR OC.; LIMA NM.; SILVA MGA.; AGUIAR VB.; CARLI GP.; SCHERRER EC.; CASTRO SBR.; ALVES CCS.; OLIVEIRA MAL.; CARLI AP. **In vitro and in vivo evaluation of anti-inflammatory activity and free radical scavenging potential of leaves extract from *Anadenanthera colubrina*.** *Nat Prod Res.* 2020 Feb 17:1-5. DOI: 10.1080/14786419.2020.1727472. Epub a head of print. PMID: 32064928.

KELLY S; DUNHAM JP; DONALDSON LF. **Sensory nerves have altered function contralateral to a monoarthritis and may contribute to the symmetrical spread of inflammation.** *Eur J Neurosci.* 2007 Aug; 26 (4):935-42. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05737.x. PMID: 17714187; PMCID: PMC2121144.

KHURANA R.; BERNEY SM. **Aspectos clínicos da artrite reumatoide.** *Pathophysiology.* Volume 12, Issue 3, ISSN 0928-4680. Outubro de 2005, páginas 153-165. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2005.07.009>.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092846800500074X>.

KORHONEN R LA.; KANKAANRANTA H.; MOILANEN E. **Nitric oxide production and signaling in inflammation.** *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005 Aug;4(4):471-9. DOI: 10.2174/1568010054526359. PMID: 16101524.

KVALVIK AG JMA.; SYMMONS DP. **Mortality in a cohort of Norwegian patients with rheumatoid arthritis followed from 1977 to 1992.** *Scand J Rheumatol.* 2000; 29 (1):29-37. DOI: 10.1080/030097400750001770. PMID: 10722255.

KVIEN Tore K. **Epidemiology and burden of illness of rheumatoid arthristis.** *Pharmacoeconomics,* v.22, n.2, p, 1-12, 2004. 22(2 Suppl 1):1-12. DOI: 10.2165/00019053-200422001-00002. PMID: 15157000.

LAURINDO IMM.; XIMENES AC.; LIMA FAC.; PINHEIRO GRC.; BATISTELLA LR.; BERTOLO MB.; ALENCAR P.; XAVIER RM.; GIORGI RDN.; CICONELLI RM.; RADOMINSKI SC. **Artrite reumatoide: diagnóstico e tratamento.** Rev. Bras. Reumatol. [Internet]. 2004. 44(6): 435-442. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042004000600007&lng=pt. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042004000600007>. Acesso: 29/06/2020

LIAO KP, ALFREDSSON L.; & KARLSON EW. (2009). **Influências ambientais no risco de artrite reumatoide. Opinião atual em reumatologia**, 21 (3), 279-283. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32832a2e16>. Acesso: 14/02/2022.

LORENZI H.; FILHO L E M. **As Plantas Tropicais de R. Burrle Marx - The Tropical Plants of R. Burrle Marx.** São Paulo: Instituto Plantarium de Estudos da flora, 2001. 488p.

MAK Tak W.; SAUNDERS Mary E. MD **The Imune Response. Basic and Clinical Principles.** 1ª edição. Sabre Foudation. Capítulo 29. p. 971. 2005. Elsevier. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=2AaJqN11QIYC&dq=autoimmune+disease++CHAPT+ER+29++Henry+Kunkel&hl=pt-BR&source=gbs_navlinks_s Acesso: 01/01/2021

MARSTON B.; PALANICHAMY A.; ANOLIK J. H. **B cells in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis.** Curr. Opin. Rheumatol., Philadelphia, v. 22, n. 3, p. 307-315, may 2010.

MEIRINHOS T.; RAMOS FO.; MIRANDA LC.; & FONSECA JEC. (2016). **Sociedade Portuguesa de Reumatologia: Manual de Interno** (1st ed., pp. 1–133).

MENDES, Natália Monção da Costa. **Estudo da atividade farmacológica anti-inflamatória do extrato aquoso de campomanesia xanthocarpa em modelo experimental in vivo.** 2018. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Uberlândia, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/24693>. Acesso: 01/01/2021

MENEZES, RR. **Monoartrite induzida por adjuvante completo de Freund em ratos Holtzman e avaliação dos efeitos induzidos pelo tratamento crônico com tiamina ou riboflavina.** Dissertação. Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. 2013. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/EMCO-9KKPMZ>. Acesso: 14/01/2021

MERINI LR.; FURTADO SC.; GUIMARÃES MR.; GALVÃO JR.; BARCELLOS JFM. **Citocinas pró-inflamatórias em artrite induzida por adjuvante: uma revisão da ação imunomoduladora de substâncias bioativas.** Scientia Amazonia, v. 1, n. 3, p. 27–39, 2012.

MOTA LMH, CRUZ BA, BRENOL CV, PEREIRA IA, FRONZA LSR, BERTOLO MB, FREITAS MVC, SILVA NA, JÚNIOR PL, GIORGI RD, LIMA RAC, PINHEIRO GRC. **Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide.** Rev. Bras. Reumatol., São Paulo , v. 52, n. 2, p. 152-174, Apr. 2012 . Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042012000200002&lng=en&nrm=iso. Acesso: 20/07/2020.

MOTA LMH.; CRUZ BA.; BRENOL CV.; PEREIRA IA.; FRONZA LSR.; BERTOLO MB.; FREITAS MVC.; SILVA NA.; JÚNIOR PL.; GIORGI RD.; LIMA RAC.; PINHEIRO GRC. **Diretrizes para o diagnóstico da artrite reumatoide.** Rev. Bras. Reumatol., São Paulo , v. 53, n. 2, p. 141-157, Apr. 2013 . Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042013000200003&lng=en&nrm=iso . Acesso: 20/07/2020.

MULLA WA.; W KS.; THORAT V.; CHOPADE A.; KUCHEKAR B. **Antioxidant, Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Ethanolic Extract of Leaves of *Alocasia indica* (Schott).** *J Young Pharm.* 2010;2(2):137-143. DOI:10.4103/0975-1483.63152.

NEUGEBAUER V.; HAN JS.; Adwanikar H.; FU Y.; JI G. **Técnicas para avaliar a dor nas articulações do joelho na artrite.** *Mol Dor* . 2007;3:8. Publicado em 28 de março de 2007. DOI:10.1186/1744-8069-3-8.

OLIVER S. J.; & BRAHN E. (1996). **Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective.** *The Journal of rheumatology. Supplement, 44*, 56–60. PMID: 8833054.

OLIVEIRA SM.; GOMIDES APM.; MOTA LMH.; LIMA CMBL.; ROCHA FAC. **Intestinal parasites infection: protective effect in rheumatoid arthritis.** Rev. Bras. Reumatol., São Paulo , v. 57, n. 5, p. 461-465, out. 2017 .
<https://doi.org/10.1016/j.rbre.2016.06.004>. Disponível em
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042017000500461&lng=pt&nrm=iso. Acesso: 16/07/2020.

OLIVEIRA PG.; GRESPAN R.; PINTO LG.; MEURER L.; BRENOL JCT.; ROESLER R.; SCHWARTSMANN G.; CUNHA FQ.; XAVIER RM. **Protective effect of RC-3095, na antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor, in experimental arthritis.** *Arthritis and Rheumatism.* 2011; 63(10): 2956-65. DOI: 10.1002/art.30486. PMID: 21953084.

OLIVEIRA P.G.; BRENOL C.V.; EDELWEISS M.I.; MEURER L.; BRENOL J.C.T.; XAVIER R.M.. **Subcutaneous inflammation (panniculitis) in tibio-tarsal joint of rats inoculated with complete Freund's adjuvant.** *Clin Exp Med* (2007) 7: 184–187 DOI: 10.1007/s10238-007-0148-6

ONISHI A.; CANSI A.; AMADO CAB.; ASSEF AMC. **Artrite induzida por adjuvante completo de freund: influência do envelhecimento no desenvolvimento do processo inflamatório.** 2018. Disponível em: <http://www.eaic.uem.br/eaic2018/anais/artigos/2658.pdf>. Acesso: 14/04/2022

PASSOS LFS. **Artrite reumatoide: novas opções terapêuticas.** Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS). ISBN: 978-85-7967-108-1. Brasília. DF. 2016. Vol 1. No. 15. Disponível:
https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=download&alias=1543-artrite-reumatoide-novas-opcoes-terapeuticas-3&category_slug=serie-uso-racional-medicamentos-284&Itemid=965. Acesso: 05/05/2020

- POPE RM; SHAHRARA S. **Possible roles of IL-12-family cytokines in rheumatoid arthritis.** *Nat Rev Rheumatol.* 2013 Apr;9(4):252-6. DOI: 10.1038/nrrheum.2012.170. Epub 2012 Oct 23. PMID: 23090510.
- RAHMAN S.; HAQUE E.; Das AK.. (2011). **Analgesic and anti-inflammatory activities of Alocasia indica (Roxb.) Schott.** *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine.* 11. 143-146. 10.1007/s13596-011-0027-1. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/236214940_Analgesic_and_anti-inflammatory_activities_of_Alocasia_indica_Roxb_Schott. Acesso: 18/11/2021.
- RAVELLI A.; MARTINI A. **Juvenile idiopathic arthritis.** *Lancet.* 2007 Mar 3;369(9563):767-778. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60363-8. PMID: 17336654.
- RAYCHAUDHURI.; SANDOR C.; STAHL EA.; FREUDENBERG J.; LEE HS.; JIA X.; ALFREDSSON L.; PADYUKOV L.; KLARESKOG L.; WORTHINGTON J.; SIMINOVITCH KA.; BAE SC.; PLENGE RM.; GREGERSEN PK.; BAKKER PIW. **Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis.** *Nat Genet.*2012;44(3):291-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ng.1076> . Acesso: 24/04/2021.
- REIS EF.; CASTRO SB.; ALVES CC.; OLIVEIRA EE.; CORRÊA TA.; ALMEIDA MV.; FERREIRA AP. **Lipophilic amino alcohols reduces carrageenan-induced paw edema and anti-OVA DTH in BALB/c mice.** *Int Immunopharmacol.* 2013 Nov;17(3):727-32. DOI: 10.1016/j.intimp.2013.08.017. Epub 2013 Sep 11. PMID: 24035232.
- SATO, E.I. *Reumatologia. Guia de Medicina ambulatorial e Hospitalar.* UNIFESP / Escola Paulista de Medicina, Editora Manole, 2004.
- SCHAIBLE HG.; VON BANCHET GS.; BOETTGER MK.; BRAUER R.; GAJDA M.; RICHTER F.; HENSELLEK S.; BRENN D.; NATURA G. **The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain.** *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1193: 60-9. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05301.x. PMID: 20398009.
- SCOTT DL.; WOLFE F.; HUIZINGA TW. **Rheumatoid arthritis.** *Lancet.* 2010;376(9746):1094-1108. DOI: 10.1016 / S0140-6736 (10) 60826-4
- SILVA M.A.R.C.P.; BERSANI-AMADO C.A.; ISHII-IWAMOTO,E.L.; BRACHT,L.; CAPARROZ-ASSEF S.M. **Protective Effects of Indomethacin and Cyclophosphamide but Not of Infliximab on Liver Metabolic Changes Caused by Adjuvant-Induced Arthritis.** *Inflammation* 34 (6):519-30. 2011. DOI: 10.1007/s10753-010-9259-3. PMID: 20878352.
- SMOLEN J., STEINER G. **Therapeutic Strategies for reumatoid arthritis.** *Nat Rev Drug Discov* 2, 473–488 (2003). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd1109>. Acesso: 17/06/2021.

SNEKHALATHA U.; ANBURAJAN M.; VENKATRAMAN B.; MENAKA M. **Evaluation of complete Freund's adjuvant-induced arthritis in a Wistar rat model: comparison of thermography and histopathology.** *Z. Rheumatol.*, Darmstadt, p. 1-7, dec. 2012. DOI: 10.1007/s00393-012-1083-8. PMID: 23208192.

SONG H-P.; LI X., YU R.; ZENG G.; YUAN Z.Y.; WANG W.E.I. **Phenotypic characterization of type II collagen-induced arthritids in Wistar rats.** *Exp. Ther. Med.*, v.10, n. 4, p. 1483 - 1488, 2015. DOI: 10.3892/etm.2015.2667. Epub 2015 Jul 31. PMID: 26622511; PMCID: PMC4578065.

SWINGLE KF; JAQUES LW., KVAM DC. **Differences in the Severity of Adjuvant Arthritis in Four Strains of Rats.** *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 1969; 132(2): 608-612. DOI: 10.3181/00379727-132-34270.

TARRANT TK, PATEL DD. **Chemokines and leukocyte trafficking in rheumatoid arthritis.** *Pathophysiology.* 2006 Feb 21;13(1):1-14. doi: 10.1016/j.pathophys.2005.11.001. Epub 2005 Dec 27. PMID: 16380240.

THOMÉ R. **Modulação da artrite experimental induzida pela associação de colágeno tipo II e ovalbumina.** Instituto de Biologia. Dissertação. Campinas, SP. 2011.

VAN DE SANDE MG, BAETEN DL. **Immunopathology of synovitis: from histology to molecular pathways.** *Rheumatology (Oxford).* 2016 Apr;55(4):599-606. doi: 10.1093/rheumatology/kev330. Epub 2015 Sep 10. PMID: 26359330

VAN DEN BERG W.B. **Anti-cytokine therapy in chronic destructive arthritis.** *Arthritis Res.*, 3(1):18-26, 2001. DOI: 10.1186/ar136. Epub 2000 Nov 10. PMID: 11178124; PMCID: PMC128880.

VENKATESHA SH.; RAJIAH R.; BERMAN BM.; MOUDGIL KD. **Immunomodulation of Autoimmune Arthritis by Herbal CAM.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2011; 2011(986797):1-13. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2011/986797> Acesso: 09/09/2010

WAUBEN M., WAGENAAR-HILERS, JPA., WAN EBEN W. **Adjuvant Arthritis. Autoimmune diseases models: a guide book.** Chapter.13. p.211-216. 1994.

WIENS A; CORRER CJ; PONTAROLO R. **Aspectos clínicos e terapêuticos da artrite reumatoide.** *Visão Acadêmica*, [S.l.], v. 10, n. 1, june 2009. ISSN 1518-8361. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/academica/article/view/21397>>. Acesso em: 20 July 2020. doi:<http://dx.doi.org/10.5380/acd.v10i1.21397>.

WILLIAMS RO. **Collagen-induced arthritis as a model for rheumatoid arthritis.** *Methods Mol Med.* 2004;98:207-16. DOI: 10.1385/1-59259-771-8:207. PMID: 15064442

WOOD, A. J. J.; O'DELL, J. R. **Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis.** *New England Journal of Medicine*, v. 350, n. 25, p. 2591- 2004. DOI: 10.1056/NEJMra040226. PMID: 15201416.

XAVIER LL.; VIACAVA PR.; TEIXEIRA VON.; MUNHOZ MR.; LORA OS.; OLIVEIRA PGde.; FILIPPIN LI.; XAVIER RM. **Desenvolvimento de artrite induzida por colágeno em camundongos DBA/1J entre os gêneros.** <http://hdl.handle.net/10183/104145>. 2012. Artigo de periódico. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/104145>. Acesso em: 14/06/2021.

YANG C. L.; OR T. C.; HO M. H.; & LAU A. S. **Scientific basis of botanical medicine as alternative remedies for rheumatoid arthritis.** *Clinical reviews in allergy & immunology*, 44(3), 284–300. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12016-012-8329-8>. Acesso: 15/06/2021.

YANG J-L.; DAO T.T.; HIEN T.T.; ZHAO; Y-M.; SHI, Y-P. **Further sesquiterpenoids from the rhizomes of *Homalomena occulta* and their anti-inflammatory activity,** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2019), DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.03.031>

YUN CY.; SUNG TK.; CHANG HK.; YEOUNGSU L.; JAMES JG.; JIN MC. **Two variables that can be used as pain indices in experimental animal models of arthritis,** *Journal of Neuroscience Methods*, Volume 115, Issue 1, 2002, Pages 107-113, ISSN 0165-0270, [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(02\)00011-0](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(02)00011-0). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165027002000110>. Acesso: 14/06/2021.

ZHANG L; LI J; YU SC; JIN Y; LV XW; ZOU YH; LI Y. **Therapeutic effects and mechanisms of total flavonoids of *Turpinia Arguta* Seen on adjuvant arthritis in rats.** *J Ethnopharmacol.* 2008. Feb 28;116(1):167-72. doi: 10.1016/j.jep.2007.11.027. Epub 2007 Nov 26. PMID: 18180120.

ZHANG Y.; REN G.; GUO M.; YE X.; ZHAN J.; XU L.; QI J.; KAN F.; LIU M, LI D. **Synergistic effects of interleukin.- 1 B and interleukin- 17A antibodies on collagen-induced arthritis mouse model.** *Internat. Immunopharmacol.*, v.15, p. 199-205, 2013. DOI: 10.1016/j.intimp.2012.12.010. Epub 2012 Dec 29. PMID: 23280345.