

**NILSON NONOSE**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CURCUMINA NA FASE  
AGUDA DA ARTRITE INDUZIDA POR ZIMOSAN  
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Bragança Paulista

2011

**NILSON NONOSE**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CURCUMINA NA FASE  
AGUDA DA ARTRITE INDUZIDA POR ZIMOSAN.  
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

**Orientador**

**Prof. Livre Docente Carlos Augusto Real Martinez**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco (USF) para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Bragança Paulista

2011

WE 344 Nonose, Nilson  
N737a Avaliação dos efeitos da curcumina na fase aguda da  
artrite induzida por zimosan. Estudo experimental em  
ratos / Nilson Nonose. -- Bragança Paulista, 2011.  
85 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-  
Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da  
Universidade São Francisco.

Orientação de: Carlos Augusto Real Martinez.

1. Artrite. 2. Artrite experimental. 3. Zimosan.  
4. Curcumina. 5. Prednisona. 6. Inflamação. 7. Ratos.  
I. Martinez, Carlos Augusto Real. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de  
Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

***Aos meus pais:***

***Jorge – exemplo de pai a ser seguido***

***Eliza – mãe que sempre lutou pela realização dos nossos sonhos***

***Ao meu irmão:***

***Ronaldo – muito mais que um irmão, um amigo,  
um colega que me apoiou na conquista de mais um objetivo***

***À GIANNA:***

***Minha esposa, amiga e companheira. Toda gratidão pelas conquistas e as que  
estão por vir...***

## **AGRADECIMENTOS**

Ao **Professor Livre-Docente Carlos Augusto Real Martinez**, pela orientação segura, pelos ensinamentos transmitidos desde a minha formação acadêmica, pela amizade, competência, paciência e disponibilidade. Minha gratidão pela confiança e admiração por sua sabedoria.

À **Professora Dra. Izilda Aparecida Cardinalli** e ao **Professor Ms. José Aires Pereira**, pela análise histopatológica e técnicas histológicas realizadas durante o estudo.

À **Professora Márcia Milena Pivatto Serra**, pela análise estatística realizada neste estudo.

Ao **Sr. Fabiano Augusto Sallowics**, pela colaboração no manuseio dos animais de experimentação no **Biotério Central da Universidade São Francisco**.

Aos acadêmicos **Daniela Tiemi Sato e Marcos Gonçalves de Almeida**, pelo auxílio em todas as etapas experimentais envolvidas neste estudo e revisão da literatura.

Aos **Preceptores e Residentes do Serviço de Ortopedia e Traumatologia da Universidade São Francisco**, pelo apoio, paciência e amizade.

A **Vilma Aparecida Tescke de Freitas e Rita de Cássia Lima**, pelo carinho e atenção dispensados na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

A **Rosimeire Rastelli Barbosa e Soraia Beneducci Pinheiro**, pela atenção e ajuda na aquisição de textos da BIREME.

Aos funcionários do **Biotério Central da Universidade São Francisco**, pelo primoroso cuidado com os animais de experimentação.

Ao **Professor Dr. Paulo Machado**, por sua amizade de longa data e estímulo a esta conquista.

A **Denise Isabel Arten**, da Biblioteca da Universidade São Francisco, pela confecção da ficha catalográfica deste trabalho.

A **Universidade São Francisco**, pela bolsa de estudo que tornou possível a concretização deste sonho.

Aos professores e funcionários do **Programa de Pós-Graduação da Universidade São Francisco**, pela acolhida e possibilidade de concretizar este sonho.

À **Universidade São Francisco**, o motivo de tudo.

A **todos** que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho, meu MUITO OBRIGADO!

*O rio atinge o seu objetivo porque aprendeu a contornar obstáculos*

*Lao-Tsé*

## RESUMO

NONOSE N. Avaliação dos efeitos da curcumina na fase aguda da artrite induzida por zimosan. Estudo experimental em ratos. [Dissertação]. Bragança Paulista, São Paulo: Universidade São Francisco; 2011. 85 p.

A artrite é uma doença inflamatória do tecido conjuntivo, de etiologia desconhecida, caracterizada por grande acúmulo de células inflamatórias no líquido sinovial, e subsequente degradação da matriz cartilaginosa. Nos estágios mais avançados, evolui com acentuada hiperplasia sinovial, neovascularização, infiltrado linfomononuclear, fibrose e substituição da sinóvia por tecido hiperplásico. O zimosan é um polissacarídeo derivado do fungo *Saccharomyces cerevisiae* e é utilizado como indutor da artrite experimental. Estudos demonstraram que o infiltrado inflamatório articular nos portadores de artrite forma altos níveis de radicais livres de oxigênio, causadores de dano oxidativo articular. Essa possibilidade torna atraente a utilização de substâncias naturais, de baixo custo e biodisponibilidade, que possuam atividade antioxidante, para o tratamento da artrite. A curcumina, princípio ativo encontrado na *Curcuma longa*, possui diversas propriedades biológicas, sendo amplamente utilizada como anti-inflamatório natural pela sua reconhecida ação antioxidante. **Objetivo:** Avaliar, em modelo experimental de artrite induzida por zimosan, o efeito da administração oral de curcumina na fase aguda da doença. **Método:** Vinte e oito ratos machos da raça Wistar foram submetidos a infiltração intra-articular de zimosan nos joelhos e quatro a infiltração com soro fisiológico 0,9%. Os animais foram divididos em cinco grupos: nos primeiros dois grupos (controle positivo e negativo) receberam gavagem com óleo de milho; no segundo (experimento) vinte e quatro animais após indução da artrite foram gavados com extrato padrão de curcumina na dose de 100 mg/kg diluído em óleo de milho; prednisona na dose de 1 mg/kg/dia (dose anti-inflamatória), e prednisona 8 mg/kg/dia (dose imunossupressora). Todos os animais foram sacrificados 6, 12, 24 e 48 horas após a indução da artrite com zimosan ou infiltração de soro fisiológico. No sacrifício, as articulações infiltradas foram removidas para avaliação histológica de inflamação pela técnica da hematoxilina-eosina e foi realizada a contagem de neutrófilos por campo por morfometria computadorizada. A presença de inflamação foi graduada em cruzes segundo escore padronizado, sendo: - = normal; + = infiltrado neutrofílico pequeno; ++ = infiltrado neutrofílico leve; +++ = infiltrado neutrofílico moderado, ++++ = infiltrado inflamatório grave; +++++ = infiltrado inflamatório grave com destruição sinovial e, ++++++ = formação de abscesso intra-articular. Os resultados obtidos nos diferentes grupos foram comparados pelo teste Mann-Whitney, e a variância ao longo do tempo, pelo teste de Kruskal-Wallis adotando-se nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). **Resultado:** Verificou-se que a administração oral de curcumina na dose proposta reduz a atividade inflamatória nas primeiras seis horas



após a indução da artrite, quando comparada aos animais do grupo controle ( $p=0,01$ ) e aos submetidos à dose anti-inflamatória de prednisona ( $p=0,02$ ) e é semelhante a dos animais tratados com doses imunossupressoras ( $p=0,52$ ). Após 12, 24 e 48 horas a curcumina apresenta menor atividade anti-inflamatória quando comparada à prednisona

**Conclusão:** A administração oral de curcumina reduz a atividade inflamatória intra-articular nas primeiras seis horas após a artrite induzida experimentalmente por zimosan.

**Palavras-chaves:** Artrite, Artrite Experimental, Zimosan, Ratos, Curcumina, Prednisona, Inflamação.

## ABSTRACT

NONOSE N. Evaluation of the effects of curcumin in acute phases of zymosan-induced arthritis. Experimental study on rats [Dissertation]. Bragança Paulista, São Paulo: Universidade São Francisco; 2011. 85 p.

Arthritis is an inflammatory disease of the connective tissue, with unknown etiology, characterized by inflammatory cell accumulation in the synovial fluid, and subsequent degradation of cartilage matrix. In the later stages the disease presents marked synovial hyperplasia, neovascularization, lymphocytic infiltration, fibrosis of the synovium and replacement by hyperplastic tissue. Zymosan is a polysaccharide derived from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and is used to induce experimental arthritis. Studies have shown that the inflammatory infiltrate founded in patients with arthritis present high levels of oxygen free radicals that cause oxidative joint damage. This possibility makes attractive the use of natural substances, with low cost and bioavailability with antioxidant activity for the treatment of arthritis. Curcumin, the active ingredient found in *Curcuma longa*, has several biological properties and is widely used as natural anti-inflammatory recognized for its antioxidant action. **Objective:** To evaluate, in an experimental model of arthritis induced by zymosan, the effect of oral administration of curcumin in the acute phase of arthritis. **Method:** Twenty-eight male Wistar rats were subjected to intra-articular infiltration of zymosan of both knees and four with 0.9% saline. The animals were divided into five groups: in the first two groups (positive and negative control) the eight animals received by gavage with corn oil; the second, with twenty-four animals received standard dose of curcumin in 100 mg/kg diluted in corn oil; the third and fourth groups, with eight animals, received gavage with 1 mg/kg/day prednisone (dose anti-inflammatory), and eight with 8 mg/kg/day (dose immunosuppressive). All animals were sacrificed 6, 12, 24 and 48 hours after induction of arthritis with zymosan infiltration or saline. After sacrifice, the infiltrated joints were removed for histological evaluation of inflammation with hematoxylin-eosin and performed by the neutrophil count fields by computerized morphometry. The presence of inflammation was graded in the second crosses standardized score, as follows: - = normal; + = small neutrophilic infiltrate; ++ = mild; +++ = moderate; ++++ = severe; +++++ = severe inflammatory infiltrate with destruction and synovial; ++++++ = intra-articular abscess formation. The results obtained in different groups were compared by the Mann-Whitney and analysis of variance by Kruskal-Wallis test adopting a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ). **Results:** We found that oral administration of curcumin can reduces inflammatory activity in the first six hours after induction of arthritis compared to control animals ( $p = 0.01$ ) and to those subjected to anti-inflammatory dose of prednisone ( $p = 0.02$ ) and similar to that of animals treated with immunosuppressive doses ( $p = 0.52$ ). After 12, 24 and 48 hours curcumin has worst anti-inflammatory activity when compared to prednisone

**Conclusion:** Oral administration of curcumin reduces intraarticular inflammatory activity in the first six hours after experimentally zymosan-induced arthritis.

**Key words:** Arthritis, Arthritis Experimental, Zymosan, Rats, Curcumin, Prednisone, Inflammation.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
5-ASA	Ácido 5-aminosalicílico
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AINE	Anti-inflamatórios não esteroides
ATP	Trifosfato de adenosina
CAT	Catalase
Cm	Centímetros
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
COX-2	Ciclooxigenase-2
COX-3	Ciclooxigenase-3
DC	Dual core
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
DSS	Sulfato sódico de dextran
EP	Erro padrão
EDTA	Etilenodiaminotetracético
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
F	French
Fe <sup>++</sup>	Ferro
g	Gramma
GC	Grupo controle
GE	Grupo experimento
GPx	Glutathione
h	Hora

H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HBSS	Solução tampão de Hank's
HE	Hematoxilina-eosina
H	Horas
IL – 1 β	Interleucina 1 beta
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-23	Interleucina 23
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INF-γ	Interferon gama
iNOS	Isoforma induzida óxido nítrico sintase
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IκK	Inibidor da kappaquinase
Iκ-β-α	Inibidor do kappa-beta-alfa
LPS	Lipopolissacarídeos
M	Média
M	Molar
mA	Miliamper
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por kilo
Micras	μm
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MPO	Mieloperoxidase
Na <sup>+</sup>	Sódio

NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa-beta
NK	Newman-Keuls
nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O <sub>2</sub>	Oxigênio
°C	Centígrados
°C	Graus centígrados
OH -	Radical hidroxila
ONOO-	Peroxinitrito
P	Fosforilação
PBS	Tampão fosfato
Pred	Prednisona
PVPI	Povidona-iodo
RLO	Radicais livres de oxigênio
RNA	Ácido ribonucléico
SF	Soro fisiológico
SH	Grupos sulfidrilas
SOD	Superóxido dismutase
TLR2	Receptor toll-like
TM	Tail moment
TNBS	Trinitrobenzenosulfônico
TNF-α,	Fator de necrose tumoral alfa
UA	Unidades arbitrarias
U-β-actina	Unidades de beta-actina
V	Volt

w/v	weight/volume
Zy	Zimosan
µL	Microlitros
Mm	Micrômetros

## LISTA DE TABELAS E QUADRO

<b>Quadro 1</b> – Escala de graduação do escore inflamatório (em cruzes).....	27
<b>Tabela 1</b> – Escore de graduação inflamatória (em cruzes) após intervenção com óleo de milho, curcumina, prednisona (1 mg/kg) e prednisona (8 mg/kg) na artrite de joelho induzida por zimosan.....	38
<b>Tabela 2</b> – Variação do escore inflamatório entre os diferentes tempos do experimento após intervenção com óleo de milho, curcumina, prednisona (1 mg/kg) e prednisona (8 mg/kg) na artrite de joelho induzida por zimosan.....	43
<b>Tabela 3</b> – Média do número de neutrófilos contados por morfometria computadorizada após 6, 12, 24 e 48 horas.....	48



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Formação de radicais livres de oxigênio e nitrogênio.....	7
<b>Figura 2</b> – <i>Curcuma longa</i> : caule folhas, raiz e seu extrato.....	15
<b>Figura 3</b> – Mecanismo de ação do extrato de <i>Curcuma longa</i> .....	17
<b>Figura 4</b> – Anestesia com quetamina e xilazina intraperitoneal.....	21
<b>Figura 5</b> – Tricotomia e Antissepsia com PVPI tópico.....	22
<b>Figura 6</b> – Injeção intra-articular com zimosan (A). Aumento de volume articular pós-infiltração (B).....	22
<b>Figura 7</b> – Gavagem gástrica com curcumina.....	23
<b>Figura 8</b> – Incisão na pele sobre a articulação infiltrada.....	24
<b>Figura 9</b> – Abertura e exposição da região intra-articular para coleta da cartilagem.....	25
<b>Figura 10</b> – Acondicionamento do material removido em solução de formol.....	25
<b>Figura 11</b> – Equipamento utilizado para a análise de imagem assistida por computador.....	29
<b>Figura 12</b> – Corte histológico de tecido articular normal – H.E.100x.....	31
<b>Figura 13</b> – Corte histológico de tecido articular normal – H.E.200x.....	31
<b>Figura 14</b> – Corte histológico de tecido articular apresentando infiltrado inflamatório intenso predominantemente neutrofílico – controle 6 horas – H.E100x.....	32
<b>Figura 15</b> – Corte histológico de tecido articular apresentando infiltrado inflamatório exuberante purulento (neutrófilos degenerados) – controle 48 horas H.E.200x.....	32

<b>Figura 16</b> – Corte histológico de tecido articular com predomínio de linfócitos (células arredondadas), demonstrando infiltrado inflamatório leve.....	33
<b>Figura 17</b> – Corte histológico de tecido articular demonstrando infiltrado inflamatório moderado H.E.200x.....	33
<b>Figura 18</b> – Corte histológico de tecido articular demonstrando infiltrado inflamatório moderado - H.E.100x.....	34
<b>Figura 19</b> – Corte histológico de tecido articular demonstrando infiltrado inflamatório moderado - H.E.100x.....	34
<b>Figura 20</b> – Corte histológico de tecido articular demonstrando infiltrado inflamatório leve - H.E.100x.....	35
<b>Figura 21</b> – Corte histológico de tecido articular demonstrando infiltrado inflamatório moderado - H.E.100x.....	35
<b>Figura 22</b> – Contagem por morfometria computadorizada do número de neutrófilos por campo – H.E. – 1.000x.....	36
<b>Figura 23</b> – Contagem de neutrófilos – graduação leve – H.E. – 1.000x.....	37
<b>Figura 24</b> – Contagem de neutrófilos – graduação moderado – H.E. – 1.000x.....	37
<b>Gráfico 1</b> – Comparação entre o grupo controle e o grupo experimento após 6 horas da indução da artrite. Teste de Mann-Whitney.....	39
<b>Gráfico 2</b> – Comparação entre o grupo controle e o grupo experimento após 12 horas da indução da artrite. Teste de Mann-Whitney.....	40
<b>Gráfico 3</b> – Comparação entre o grupo controle e o grupo experimento após 24 horas da indução da artrite. Teste de Mann-Whitney.....	41
<b>Gráfico 4</b> – Comparação entre o grupo controle e o grupo experimento após 48 horas da indução da artrite. Teste de Mann-Whitney.....	42
<b>Gráfico 5</b> – Variação entre os diferentes tempos do grupo controle. Teste de Kruskal-Wallis.....	44
<b>Gráfico 6</b> – Variação entre os diferentes tempos do grupo experimento com curcumina. Teste de Kruskal-Wallis.....	45

<b>Gráfico 7</b> – Variação entre os diferentes tempos do grupo experimento (Prednisona 1 mg/kg). Teste de Kruskal-Wallis.....	46
<b>Gráfico 8</b> – Variação entre os diferentes tempos do grupo experimento (Prednisona 8 mg/kg). Teste de Kruskal-Wallis.....	47
<b>Gráfico 9</b> – Comparação entre o grupo controle (negativo e positivo) e o grupo experimento após 6 horas da indução da artrite .....	49
<b>Gráfico 10</b> – Comparação entre o grupo controle (negativo e positivo) e o grupo experimento após 12 horas da indução da artrite.....	50
<b>Gráfico 11</b> – Comparação entre o grupo controle (negativo e positivo) e o grupo experimento após 24 horas da indução da artrite.....	51
<b>Gráfico 12</b> – Comparação entre o grupo controle (negativo e positivo) e o grupo experimento após 48 horas da indução da artrite.....	52

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>1</b>
1.1 Artrite.....	1
1.2 Fisiopatologia da artrite.....	6
1.3 Artrite e estresse oxidativo.....	8
1.4 Modelos experimentais de artrite.....	13
1.5 <i>Curcuma longa</i> (curcumina).....	15
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 Animais de experimentação.....	20
3.2 Grupos experimentais.....	20
3.3 Etapa pré-operatória.....	20
3.4 Anestesia .....	21
3.5 Método .....	21
3.6 Coleta do material.....	24
3.7 Técnica histopatológica.....	26
3.8 Avaliação histopatológica.....	27
3.9 Morfometria computadorizada.....	28
3.10 Análise estatística.....	30
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>82</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>85</b>

# 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 – Artrite

A artrite é uma enfermidade degenerativa das articulações, de grande prevalência, sendo uma das maiores causas de incapacitação em todo o mundo (Lawrence *et al.*, 2008). Nos países ocidentais, é uma das três principais causas de afastamento da atividade laboral (Arden e Nevitt, 2006; Lawrence *et al.*, 2008). O processo inflamatório leva à destruição contínua e progressiva das cartilagens articulares, a alterações ósseas e à inflamação das membranas sinoviais. A dor intensa e contínua na articulação comprometida limita a deambulação, tornando o doente recluso e deprimido, afastando-o do convívio social (Arden e Nevitt, 2006; Mahajan *et al.*, 2005; Morais, 2008, Salter, 2001). Além de interferir na qualidade de vida, a artrite determina substancial impacto nos custos com o tratamento e assistência médica complementar (Dibonaventura *et al.*, 2011).

A artrite tem alta prevalência em todo o mundo, sendo considerada a forma mais comum de artropatia inflamatória de evolução crônica (Lawrence *et al.*, 2008). Surge em todas as regiões do mundo, apresentando maior prevalência no ocidente, principalmente nas faixas etárias mais avançadas (Lawrence *et al.*, 2008). Estima-se que acometa aproximadamente 1% da população mundial com mais de sessenta anos (Morais, 2008). Estudos epidemiológicos nos Estados Unidos mostraram que 27 milhões de pessoas apresentam sintomas articulares relacionados às diferentes formas de artrite (Dibonaventura *et al.*, 2011; Morais, 2008). Apesar de acometer ambos os sexos, a incidência entre as mulheres é três vezes maior quando comparada aos homens (Salter, 2001).

A artrite é considerada uma enfermidade degenerativa relacionada ao envelhecimento (Jakobsson e Hallberg, 2006; Salaffi *et al.*, 2005). Estudos radiológicos mostraram que pelo menos 85% das pessoas na sétima década de vida já apresentam sinais radiológicos que permitem o diagnóstico da doença (Larocca, 1999). Entretanto, a faixa etária mais comprometida situa-se entre a terceira e a quinta década de vida, embora a doença possa acometer indivíduos mais jovens. Estudo mensurando

marcadores inflamatórios séricos e fragmento de cartilagem articular removidos de indivíduos na segunda década de vida encontrou alterações histopatológicas e bioquímicas compatíveis com artrite (Lianza, 2001). Recentemente, o aumento da incidência da artrite em crianças e adolescentes vem sendo atribuído à obesidade infantil, cada vez mais prevalente nos países desenvolvidos (Kotlarz *et al.*, 2010; Strutzenberger *et al.*, 2011).

Didaticamente, artrite é subdividida em duas formas clínicas, primária e secundária, segundo a sua provável etiologia. A forma primária tem patogênese indefinida ou atribuída à herança genética (Morais, 2008). Acomete mulheres com maior frequência, começando de modo insidioso com evolução lenta, e apesar de cursar com períodos de remissão e exacerbação, tem caráter evolutivo progressivo (Salter, 2001). A forma secundária, na maioria das vezes, inicia-se em consequência de traumatismos, deformidades articulares ou locais ou doenças sistêmicas que progressivamente danifiquem a cartilagem articular (Salter, 2001). Podem surgir após lesões traumáticas (atividades que comprometam ligamentos, meniscos e a cartilagem articular), doenças infecciosas (artrite séptica), inflamatórias (artrite reumatoide, lúpus), metabólicas (gota, acronose) e defeitos genéticos ou congênitos (osteoartrite hemofílica, pé torto congênito). A forma secundária é mais comum entre os homens, podendo atingir indivíduos em qualquer faixa etária (Morais, 2008).

Potencialmente, a artrite pode acometer qualquer articulação. Contudo, em ordem decrescente, os joelhos são as articulações mais frequentemente comprometidas, seguindo-se o quadril, mãos, coluna vertebral, punhos e tornozelos (Arden e Nevitt, 2006; Moraes, 2008). Estima-se que 35% das pessoas com mais de 30 anos já apresentam sinais clínicos e radiológicos de artrite nos joelhos, e que após os 50 anos, 100% dos indivíduos assintomáticos examinados apresentem alterações histológicas nos joelhos relacionadas à doença, não obstante ainda não apresentarem sintomas. Oitenta e cinco por cento dos indivíduos com mais de 70 anos apresentam nas articulações dos joelhos alterações radiológicas que permitem o diagnóstico da doença (Larocca, 1999). Estudo histopatológico em articulações obtidas de cadáveres encontrou lesões da cartilagem articular, reações inflamatórias subcondrais e presença

de osteófitos articulares em 60% dos homens e 70% das mulheres entre a sétima e oitava décadas de vida, confirmando a relação entre a doença e o progredir da idade (Arden e Nevitt, 2006).

Apesar da etiologia da artrite ser ainda indefinida, alguns fatores de risco vêm sendo relacionados à sua patogênese. Assim, a idade, disfunções endócrinas, metabólicas, aspectos étnicos, genéticos e traumatismos mecânicos encontram-se relacionados ao surgimento da doença (Morais, 2008). A idade aumenta significativamente o risco, provavelmente pela exposição articular a traumatismos constantes por maior período de tempo. A obesidade, cada vez mais comum em nossos dias, a síndrome metabólica, instabilidade articular, fraqueza muscular e flacidez ligamentar, a menor capacidade de reparação articular pelo déficit protéico que acompanha a senilidade, a maior incidência de osteoporose, quanto maior a perspectiva de vida, principalmente nas mulheres menopausadas, também contribuem para o maior número de casos da doença entre mulheres idosas (Felson *et al.*, 2000; Lawrence *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 1999; 2000). Com relação aos fatores endócrinos, sabe-se que vários hormônios são produzidos pelo organismo e interferem na dinâmica de renovação das células da cartilagem articular, bem como das demais estruturas articulares, em particular dos ossos subcondrais. Como exemplo, o hormônio do crescimento é importante na regulação da maturação do condrócito, enquanto a insulina estimula a formação de proteoglicanos componentes da matriz extracelular da cartilagem articular. Os estrógenos têm importância na deposição de cálcio nos ossos. A redução da produção de estrógenos, como ocorre na menopausa, a menor produção de hormônio de crescimento característico da velhice e a maior possibilidade de doenças como diabetes mellitus e disfunções tireoidianas são situações que também aumentam o risco de desenvolvimento da artrite (Jansson e Holmdahl, 2001; Spector *et al.*, 1996; Wluka *et al.*, 2000). A menor prevalência da osteoartrite entre orientais, sobretudo chineses e japoneses, sugere que fatores genéticos também possam estar relacionados à etiopatogenia da doença (Dudda *et al.*, 2011; Harvey *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2004). O recente aumento da prática de esportes radicais, que aumentam a chance de traumatismos articulares graves, e as competições esportivas de alto nível,

que requerem impacto constante e repetitivo sobre as articulações, também vêm sendo responsabilizadas pela maior incidência da doença (Larocca, 1999; Marshall e Golightly, 2007). Moléstias ortopédicas congênicas ou adquiridas e cirurgias que alterem a dinâmica articular (meniscectomias ou artroscopias indicadas para regularização da superfície articular) podem favorecer o aparecimento da artrite

Os sintomas nos portadores de artrite relacionam-se ao desgaste articular, sinovite de repetição, degeneração de ligamentos, alterações na cápsula articular, osteoporose, presença de derrame articular e, provavelmente, à formação de depósitos de cristais (apatita) na membrana sinovial (Golding, 2001). A dor é o sintoma principal e dominante nos portadores de artrite de qualquer natureza. Apresenta intensidade variável segundo a fase evolutiva da doença, podendo ser cíclica ou constante, piorando com o movimento articular e melhorando com o repouso (Golding, 2001). Nas formas leves, a dor surge apenas após o esforço sobre a articulação comprometida, melhorando com o repouso e uso de analgésicos ou anti-inflamatórios não esteroidais (AINH). Com o progredir do quadro, a dor torna-se mais intensa, surgindo aos mínimos esforços, dificultando a deambulação e fazendo com que o doente necessite de maiores doses de anti-inflamatórios, em intervalos menores de tempo e, em muitos casos, associado ao uso de analgésicos. Nas formas graves, a dor surge mesmo em repouso, o que torna impossível qualquer tentativa de movimento articular, fazendo com que o doente necessite utilizar analgésicos potentes, muitas vezes opioides, associados a anti-inflamatórios hormonais por via oral ou por infiltração articular, imunossuppressores e, mais recentemente anticorpos monoclonais anti-TNF (Morais, 2008). Com a degeneração progressiva da cartilagem articular pelo processo inflamatório contínuo, ocorre rigidez articular de duração variável, limitação de movimentos e crepitação da articulação durante os movimentos de flexão e extensão (Larocca, 1999). Nos casos graves com longo tempo de evolução, a rigidez matinal impõe verdadeiro ritual para que o doente possa levantar-se da cama e deambular. Para conseguir mobilizar a articulação comprometida, a movimentação inicia-se com o doente ainda acamado, de forma lenta e gradual até que consiga amplitude de movimento suficiente para erguer-se e conseguir andar (Golding, 2001). À medida que o quadro progride, pode haver



necessidade de mobilização articular sob imersão em banheira com água quente. Nesse estágio, para deambular sem dor, o doente promove o bloqueio funcional da articulação afetada (artrodese funcional). A imobilidade articular contínua, com o passar dos anos aumenta a rigidez articular, leva à atrofia muscular, ocasionando instabilidade articular que, além de piorar a dor, transforma a anquilose funcional em definitiva, causando deformidade articular irreversível.

Nas crises de agudização, a dor articular piora quando existe derrame articular ou hemartrose ocasionados pela sinovite crônica, havendo necessidade, em alguns doentes, de punção aspirativa articular (Golding, 2001; Larocca, 1999). Quando ocorrem hemartroses, tornam-se repetitivos os depósitos de pigmentos oriundos da degradação da hemoglobina e imunocomplexos, que impregnam-se na membrana sinovial como cristais de hemossiderina, aumentando, ainda mais, o processo inflamatório local (Morais, 2008). À medida que a degeneração articular progride, pode haver fratura patológica de osteófitos para o interior da articulação, ocasionando bloqueio mecânico que muitas vezes surpreende o doente, tornando-o, subitamente, incapaz de movimentar a articulação. Nessa etapa, a insegurança para deambular sem auxílio ou apoio e a dor constante aos mínimos movimentos impõem a utilização de cadeira de rodas. Nesse estágio, a artroplastia é a única opção capaz de devolver a qualidade de vida aos enfermos.

Durante a evolução da doença, com o intuito de aliviar os limitantes sintomas dolorosos, a maioria dos pacientes utiliza anti-inflamatórios e analgésicos de modo contínuo. Pela maior facilidade de aquisição e pelos efeitos analgésicos concomitantes, os anti-inflamatórios hormonais e não-esteroidais são os medicamentos mais consumidos. O uso crônico dessas substâncias, muitas vezes sem orientação médica, com posologia elevada, por longos períodos de tempo, leva ao surgimento de graves efeitos adversos para os sistemas digestivo (lesões agudas da mucosa gástrica, gastrites erosivas hemorrágicas, úlceras pépticas, hepatite medicamentosa), renal (nefrite intersticial, glomerulonefrites, insuficiência renal crônica), cardiológico (infarto agudo do miocárdio, miocardiopatias) e hematológicos (discrasias sanguíneas, alteração na adesão de plaquetas, plaquetopenia) (Morais, 2008).

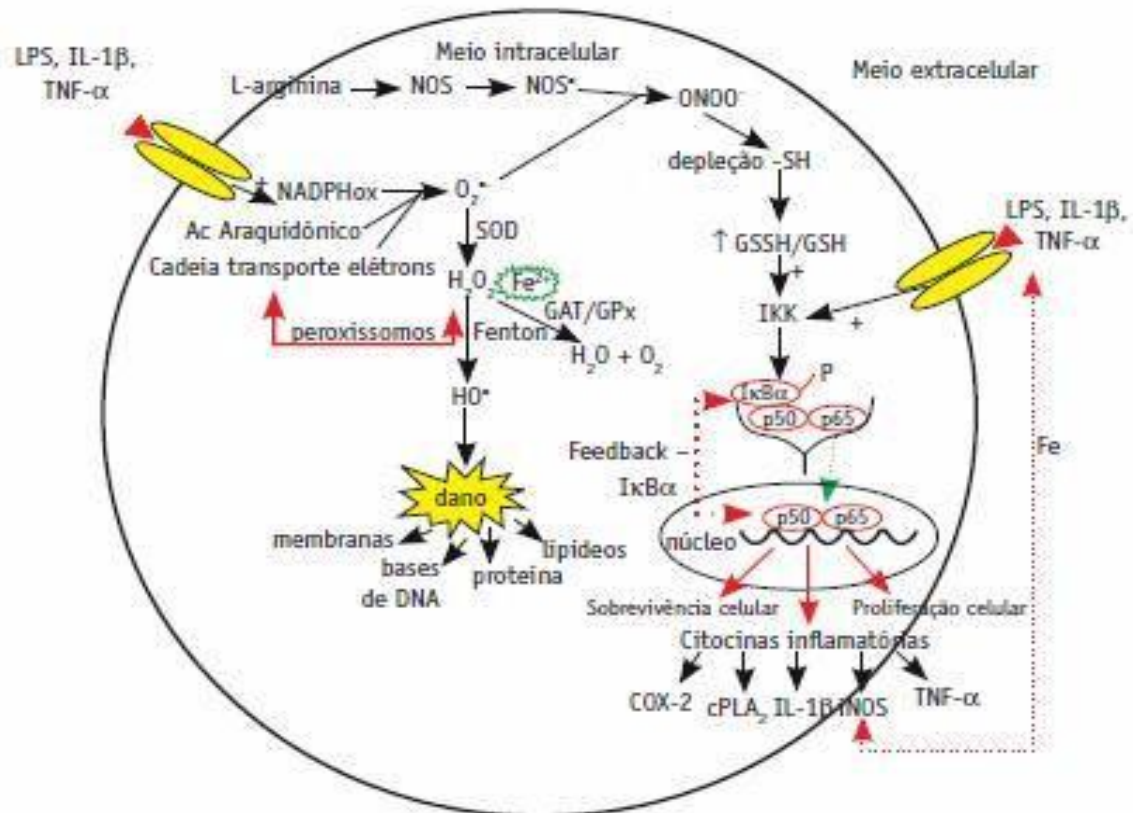
Com objetivo de reduzir o uso contínuo dessas substâncias e minimizar seus efeitos adversos, os enfermos são incentivados a consumir uma série de “produtos naturais”, cuja eficácia terapêutica e toxicidade são pouco conhecidas e carecem de confirmação científica. Com a força da mídia leiga, muitas vezes essas substâncias são tidas como milagrosas para o alívio dos sintomas da artrite, fazendo com que o consumo desses produtos venha aumentando em todo o mundo. Estudos experimentais com substâncias com potencial efeito para o tratamento da artrite devem ser incentivados com objetivo de verificar se, realmente, apresentam eficácia terapêutica. Caso contrário, o uso dessas substâncias pode retardar a instituição da terapêutica adequada, condenando o doente ao sofrido e inexorável curso da doença.

## **1.2 Fisiopatologia da artrite**

A causa primária da artrite ainda é desconhecida (Morais, 2008). Entretanto, acredita-se que a ativação da resposta imunológica por diferentes causas em indivíduos previamente suscetíveis seja o denominador comum. Estudos sugerem que agentes infecciosos, imunoglobulinas modificadas e substâncias tóxicas possam estar envolvidas na fase inicial de ativação da doença (Gregersen *et al.*, 1988). A reação inflamatória seria então uma resposta do tecido sinovial articular a algum tipo de agressão física, mecânica ou química e tem como principal preceito eliminar o agente agressor (Morais, 2008).

A artrite caracteriza-se pela inflamação crônica das articulações associada à proliferação das células da membrana sinovial e infiltração de células inflamatórias ativadas, que incluem linfócitos T, macrófagos e polimorfonucleares, que ocasionam destruição progressiva, inicialmente da cartilagem articular e, posteriormente, do osso subcondral (Filippin *et al.*, 2008; Hitchon e El-Gabalaw, 2004). A manutenção do processo inflamatório é mediada por inúmeras citocinas: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-18, IL-23 e IFN- $\gamma$ . Algumas delas, como o TNF- $\alpha$ , podem iniciar a cascata de ativação da via do NF- $\kappa$ B (Figura 1) (Filippin *et al.*, 2008; McInnes e Schett, 2007; Okamoto, 2005). A ativação da via do NF- $\kappa$ B catalisa a fosforilação do inibidor quinase-kappa, induzindo a transcrição de genes pró-inflamatórios, que, incrementando a

produção de citocinas, aumenta a migração das células inflamatórias da membrana sinovial para o interior da articulação, assim como ativa a ação de metaloproteínas que destroem a matriz extracelular das cartilagens articulares (Moynagh, 2005).



$O_2^{\bullet -}$  - radical ânion superóxido;  $H_2O_2$  - peróxido de hidrogênio;  $HO^{\bullet}$  - radical hidroxila; SOD - enzima endógena superóxido dismutase; CAT - enzima endógena catalase; GPx - enzima endógena glutationa; L - arginina - enzima precursora do óxido nítrico; NO - óxido nítrico; NOS - óxido nítrico sintase; ONOO $\cdot$  - peroxinitrito; -SH - grupamento sulfidrila; GSSH/GSH - relação glutationa oxidada/reduzida; IKK - inibidor kappa quinase; I $\kappa$ B $\alpha$  - inibidor kappa B; P - fosforilação; cPLA $_2$  - fosfolipase A $_2$  citosólica; COX $_2$  - ciclooxigenase 2; iNOS - óxido nítrico sintase induzível; LPS - lipopolissacarídeos; TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa; IL-1 $\beta$  - interleucina 1 beta.

**Figura 1** – Formação dos radicais livres de oxigênio e nitrogênio (canto superior esquerdo), alvos dessas espécies reativas (canto superior direito), relação das RLO com a ativação do NF- $\kappa$ B e transcrição de citocinas pró-inflamatórias (à direita). Modificada de Filippin *et al.*, 2008.

A ativação da via do NF- $\kappa$ B também induz a expressão de genes responsáveis pela produção de fatores de crescimento celular, como a ciclina D1 e c-Myc, e inibe a transcrição de genes responsáveis pela síntese de fatores indutores da apoptose celular, como BAX e Bcl-2. Com isso, existe hiperproliferação da membrana sinovial, fator determinante na progressão da doença (Okamoto *et al.*, 1997).

Estudos em modelos experimentais de artrite mostraram que os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para a articulação (Rocha, *et al.*, 1996). Os neutrófilos ativados fagocitam imunocomplexos formados nas fases iniciais, liberando RLO e eicosanoides que aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias (Rocha *et al.*, 1997). A resposta inflamatória determina aumento da irrigação sanguínea no local, transudação de substâncias vasoativas (histamina, serotonina), infiltração neutrofílica, liberação de citocinas inflamatórias, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e RLO e nitrogênio (Brain, 1994; Hibbs *et al.*, 1999). Esses eventos são responsáveis pelos principais sinais e sintomas do processo inflamatório articular, representados pelo calor, tumor (edema), rubor e dor que caracterizam a doença.

### **1.3 Artrite e estresse oxidativo**

O termo radical livre refere-se ao átomo ou molécula que contenham número ímpar de elétrons na sua última camada eletrônica (Halliwell e Gutteridge, 1990). A denominação RLO é adotada porque a maioria dos radicais livres é gerada a partir do metabolismo celular da molécula de oxigênio ( $O_2$ ). Os RLO são constantemente formados durante o metabolismo energético das células vivas; contudo, sua produção excessiva é nociva às células, danificando proteínas, membranas, organelas e bases nitrogenadas do ácido desoxirribonucléico (DNA) (Halliwell e Gutteridge, 1986; Halliwell e Gutteridge, 1997; Gutteridge e Halliwell, 2000). As células possuem defesas antioxidantes naturais, enzimáticas e não-enzimáticas, que atuam contra essa toxicidade mantendo o equilíbrio entre a produção e a neutralização (Sheridan *et al.*, 1996). Todavia, em certas condições, quer pela diminuição do sistema antioxidante do organismo, quer pelo aumento exagerado na produção de RLO, ocorre desequilíbrio, determinando o

aparecimento do fenômeno conhecido como estresse oxidativo (Cadenas e Davies, 2000).

RLO são produzidos normalmente durante o metabolismo aeróbico normal das células, tendo importância fundamental para as funções celulares normais, incluindo a proliferação celular, quimiotaxia e apoptose, além de regular as vias de sinalização nuclear NF- $\kappa$ B (Figura 1). Os RLO produzidos por macrófagos ativados determinam uma proteção contra a invasão bacteriana dos tecidos, além de apresentarem importância fisiológica no sistema imunológico (Barry Halliwell, 2007; Griffiths, 2005). O funcionamento dos linfócitos T é muito influenciado por alterações do equilíbrio das substâncias oxidantes e antioxidantes no interior das células.

Células fagocitárias, como macrófagos e neutrófilos, são ativadas sob condições de estresse oxidativo. A ativação de neutrófilos no processo inflamatório por RLO, como o superóxido, tem sido bastante estudada (Petrone *et al.*, 1980). Essa ativação é mediada pelo sistema NADPH, resultando em um notável aumento do consumo tecidual de oxigênio e consequente aumento da produção do ânion superóxido (Droge, 2002). A ativação do NADPH pode ser provocada por lipopolissacarídeos, lipoproteínas e citocinas, como o interferon gama, IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$ , habitualmente formadas durante a evolução da osteoartrite (Hitchon e El-Gabalawy, 2004). Dentre os RLO, o superóxido produzido em grande quantidade durante a ativação de células do sistema imune se destaca pela sua posterior transformação em peróxido de hidrogênio espontaneamente ou por ação catalítica da enzima superóxido dismutase. Na presença do íon Fe<sup>++</sup> ou outros metais de transição, o peróxido de hidrogênio é convertido, pela reação de Fenton, no radical hidroxila (OH $\cdot$ ) que, além de ser solúvel em água, é extremamente reativo e danoso para os tecidos articulares, sendo responsável pela toxicidade celular ocasionada pelos RLO (Barry Halliwell, 2007). A atividade dos RLO no processo de amplificação do estresse oxidativo tecidual apresenta papel importante em eventos inflamatórios, pela sua capacidade de ativar células do sistema imune, principalmente neutrófilos e macrófagos (Petrone *et al.*, 1980). Com isso, o estresse oxidativo piora o quadro inflamatório por aumentar a lesão tecidual (Halliwell e Gutteridge, 1997). Logo

após ser formado, o radical  $\text{OH}^\cdot$  reage rapidamente com moléculas de lipídios, proteínas e bases do DNA existentes nas células, danificando-as. Talvez, esse seja o mecanismo principal da lesão da cartilagem articular nos portadores de artrite.

É essencial para a célula manter sua homeostase, o equilíbrio entre produção e neutralização dos RLO pelos sistemas de defesa antioxidante. As substâncias com potencial oxidante são constantemente geradas como consequência direta do metabolismo energético celular. Para proteger-se, a célula possui sistemas de defesa antioxidante definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas àquelas do substrato oxidável, atrasa significativamente, ou até mesmo impede a oxidação daquele substrato (Caltabiano, 2010). A função dessas substâncias é manter os níveis de RLO em baixas concentrações, e para isso, podem atuar em duas frentes de defesa. Uma delas, preventiva, atua como detoxificadora do agente oxidante antes que ele cause lesão celular. Esta linha de defesa é constituída pelos sistemas enzimáticos da superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e  $\alpha$ -tocoferol. A outra tem a função de combater os RLO depois de formados, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathione-reductase e glutathione peroxidase. Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana celular, a maior parte dos sistemas antioxidantes encontra-se no meio intracelular (Caltabiano, 2010; Ferreira e Matsubara, 1997). Hoje, a melhor definição de estresse oxidativo é um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a um desarranjo de sinalização e do controle redox e/ou um dano molecular (Jones, 2006).

Os RLO também vêm sendo considerados um fator de risco para diversas doenças degenerativas, já estando bem estabelecida a relação existente entre estresse oxidativo e artrite (Avalos *et al.*, 2007; Okamoto, 2005). Uma das principais características do desenvolvimento e agravamento da artrite, são a persistência da inflamação sistêmica e o dano tecidual. Estudos recentes vêm mostrando que, na patogênese da doença, o dano à cartilagem articular encontra-se relacionado ao estresse oxidativo ocasionado pela formação exagerada de RLO, bem como pelo bloqueio ou redução das vias de sinalização dos sistemas antioxidantes (Henrotin *et al.*,

2003). Na artrite, apesar da etiologia ainda ser motivo de debates, já se sabe que pela combinação de fatores genéticos e ambientais, existe produção de altos níveis de RLO consequente a alterações da resposta inflamatória, ocasionando o dano na cartilagem articular (Ozkan *et al.*, 2007).

A formação exagerada e contínua de RLO pelas células inflamatórias oriundas da membrana sinovial faz com que os sistemas antioxidantes não consigam neutralizá-los, determinando estresse oxidativo articular (Abramson *et al.*, 2001; Del Carlo e Loeser, 2002; Yudoh *et al.*, 2005). Estudos mostraram que o estresse oxidativo induz a instabilidade genômica, dificuldade de replicação e disfunção dos condrócitos articulares acometidos pela artrite, sugerindo que o estresse oxidativo induza o dano à cartilagem articular, condição responsável pelo desenvolvimento da doença (Yudoh *et al.*, 2005). A produção aumentada de RLO tem outros efeitos sobre os condrócitos que incluem a inibição da transdução do sinal de modulação da adesão celular, modulação da produção e expressão de citocinas, supressão da síntese do colágeno e proteoglicanos da matriz extracelular, ativação de enzimas proteolíticas, tais como as metaloproteinases, indução da apoptose em condrócitos e inibição da sua proliferação, fatores relacionados à destruição progressiva da cartilagem articular (Deberg *et al.*, 2005; Grabowski *et al.*, 1997; Studer *et al.*, 2000).

A permanente infiltração de células de defesa encontra-se relacionada à maior produção de RLO (Fermor *et al.*, 2007). Substâncias antioxidantes são conhecidas por protegerem contra o dano tecidual provocado por RLO formados por macrófagos, monócitos e granulócitos ativados e suprimirem a atividade de citocinas, como o TNF- $\alpha$ , um dos mediadores mais importantes relacionados à doença. É possível que o emprego dessas substâncias possa ser eficaz no tratamento da artrite.

O tratamento clínico da artrite baseia-se em medidas relacionadas à melhora da dor e da incapacidade funcional e ao controle da reação inflamatória. As medicações devem agir em sinergismo com as medidas fisioterápicas, utilizadas para recuperação da força muscular com o objetivo de aumentar a estabilidade articular, melhorando a flexibilidade e a amplitude de movimento. A redução do peso com o objetivo de não provocar maior estresse articular também é uma ação eficaz no controle dos sintomas.

Entretanto, naqueles doentes que apresentam doença grave, o uso concomitante de medicamentos com atividade analgésica torna-se inevitável. Entre os medicamentos disponíveis para o tratamento da artrite, há os que apresentam efeito essencialmente analgésico, que, apesar de melhorarem a dor articular, não interferem no curso da doença. De modo diferente, as substâncias anti-inflamatórias hormonais e não-hormonais (AINH), apesar de reduzirem a resposta inflamatória melhorando o dano articular e, conseqüentemente, a dor, possuem menor efeito analgésico, além de cursarem com efeitos colaterais muitas vezes graves (Anti *et al.*, 2008). Anti-inflamatórios hormonais, utilizados por tempo prolongado, além de provocarem retenção hidroeletrólítica, edema na face, supressão da glândula suprarrenal e osteoporose, podem levar à formação de úlceras pépticas passíveis de hemorragia digestiva (Anti *et al.*, 2008). Os anti-inflamatórios não-esteroidais têm como principal efeito colateral as lesões no trato digestivo, principalmente no estômago e duodeno, levando à formação de lesões agudas da mucosa gástrica, gastrites hemorrágicas e úlceras pépticas. Essas substâncias também aumentam a possibilidade de perfuração das úlceras do tubo digestivo, tanto no estômago como no duodeno, jejuno, íleo e, até mesmo, no cólon. O uso contínuo dessas substâncias pode interferir na coagulação sanguínea, por reduzirem o número e a capacidade de adesão plaquetária, além de interferirem na ação dos fatores de coagulação. A discrasia sanguínea decorrente associada à presença de uma membrana sinovial congesta, inflamada e hipertrofiada aumenta a possibilidade de derrames articulares. Em longo prazo, os anti-inflamatórios não-hormonais são hepatotóxicos e nefrotóxicos e seu uso contínuo pode levar a quadros de insuficiência hepática e renal (Anti *et al.*, 2008). Para piorar a situação, em muitas oportunidades, o uso de analgésicos e anti-inflamatórios associados se faz necessário para o controle da dor. A associação de duas drogas, com efeitos colaterais semelhantes agem em sinergismo, potencializando ainda mais os riscos para os usuários.

A possibilidade de se encontrarem substâncias naturais com potencial efeito antioxidante que se apresentem eficazes como anti-inflamatórios ou analgésicos e demonstrem baixos índices de efeitos colaterais é uma aspiração antiga.



Constantemente, novas substâncias vêm sendo testadas, demonstrando atividade contra artrite tanto *in vitro* como *in vivo*. Uma das substâncias naturais que vem apresentando efeitos surpreendentes para o tratamento da osteoartrite é a curcumina, princípio ativo extraído da raiz da *Curcuma longa* (o *curry* indiano), que já era usada pela medicina Ayurveda (Jurenka, 2009).

#### **1.4 Modelos experimentais de artrite**

Vários modelos experimentais foram propostos, no intuito de induzir artrite em animais, tentando reproduzir achados da osteoartrite que acomete o homem. O modelo ideal de artrite deveria deflagrar achados clínicos, radiológicos e histopatológicos semelhantes aos observados no homem, ser de fácil execução, ter baixo custo, boa reprodutibilidade, poder ser reproduzido em animais de pequeno porte, ter confiabilidade quanto ao início, incidência e avaliação da gravidade das alterações inflamatórias, responder a agentes terapêuticos de forma semelhante ao observado no homem; ter parâmetros de alterações histológicas passíveis de serem mensuráveis (Da Silva e Da Rocha, 2006; Oliver e Brahn, 1996). Nenhum dos modelos experimentais atualmente disponíveis satisfaz plenamente todas essas condições, embora todos se aproximem do objetivo pretendido (Da Silva e Da Rocha, 2006).

A artrite induzida pelo complexo de Freund em ratos susceptíveis faz com que, entre 14 e 21 dias após a indução, os animais desenvolvam artrite generalizada e uma resposta sistêmica em quase todas as articulações (Da Silva e Da Rocha, 2006). O aspecto histológico lembra a sinovite reumatoide humana, encontrando-se hiperplasia sinovial, infiltrado linfomononuclear, neoformação vascular e, em fases posteriores, lise da cartilagem articular e reabsorção óssea. A invasão da cartilagem e do espaço subcondral assemelha a sinovite desse modelo ao *pannus* reumatoide. Uma desvantagem, entretanto, é a segregação em cepas de ratos e a dificuldade de precisar o início da artrite.

A artrite induzida pela sensibilização de animais de experimentação com injeções de colágeno tipo II foi, inicialmente, utilizada em camundongos, mas posteriormente, foi também empregada em ratos (Schaller *et al.*, 2001). Além de reproduzir os achados

histológicos da osteoartrite humana, esse modelo apresenta a vantagem de utilizar um animal que vem sendo empregado em técnicas de biologia molecular, permitindo modificações genéticas. A especificidade para o colágeno tipo II, admitindo-se ser essa proteína um autoantígeno importante no desencadeamento do processo inflamatório crônico é, ao mesmo tempo, uma limitação, uma vez que se tinha definido o colágeno como um auto-antígeno relevante na fisiopatologia da doença (Keystone *et al.*, 1977; Schaller *et al.*, 2001).

Outros modelos também têm sido empregados, como a artrite induzida por proteoglicanos, óleo mineral, antígenos, que ocorre pela infiltração intra-articular de um antígeno (p. ex. ovalbumina) ao qual o animal foi previamente sensibilizado, além dos modelos empregando agentes infecciosos (p. ex.: *Mycoplasma*, parede de estreptococos). Em comum, os modelos apresentam a similaridade histológica com a sinovite da artrite humana, mecanismos imunológicos na sua fisiopatologia, além de resposta terapêutica similar à observada na osteoartrite humana.

O zimosan é um polissacarídeo derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, cujo principal componente estrutural é a  $\beta$ -glucana, que apresenta propriedades imunoestimulatórias. Originalmente, a artrite induzida pelo zimosan foi descrita por Keystone *et al.* em 1977. A injeção intra-articular de zimosan promove sinovite erosiva grave. Na fase aguda, até três dias após a indução, ocorre aumento de permeabilidade vascular e migração celular. A seguir, desenvolve-se sinovite com infiltrado mononuclear e reação fibroblástica lembrando a sinovite crônica que caracteriza o *pannus* reumatoide. A injeção intra-articular de zimosan provoca aumento da permeabilidade vascular levando a edema local e ainda acentuado influxo celular com predomínio de polimorfonucleares. A substância vem sendo muito utilizada para indução da inflamação estéril experimental. A quantidade de células presentes no líquido sinovial é máxima na sexta hora após a indução.

Inicialmente, a inflamação associada ao zimosan foi atribuída à ativação do complemento e liberação de enzimas lisossomiais a partir de células inflamatórias migradas para o local. Estudo recente, utilizando camundongos *knockout* para o receptor *toll-like* (TLR2), demonstrou que houve redução significativa da sinovite,

quando comparados a animais normais (Frasnelli *et al.*, 2005). Esse resultado sugere que existe um importante componente de imunidade adquirida, já que houve formação de IgG específico para o zimosan, participando na fisiopatologia da doença nos modelos experimentais da artrite induzida pelo zimosan.

### 1.5- *Curcuma longa* (curcumina)

A *Curcuma longa* é uma planta herbácea, perene, pertencente à família *Zingiberaceae* (May *et al.*, 2005). A planta é originária do sudeste da Ásia, tendo sido introduzida no Brasil na década de 80 (Almeida, 2006). O extrato da *Curcuma longa*, conhecido como curcumina, é obtido da raiz da planta, tendo como produto final um pó amarelo-alaranjado, de sabor amargo e aroma picante, insolúvel em água em seu estado natural (Figura 2). É extensamente usado como corante para comida e é um dos ingredientes contido no pó de curry. São três os pigmentos presentes no extrato: curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina, nas concentrações de 60%, 22% e 18%, respectivamente (Almeida, 2006). O extrato da planta possui uma concentração 18 vezes maior dos compostos naturais quando comparado aos encontrados na raiz da planta nativa.



**Figura 2:** *Curcuma longa*: caule folhas, raiz e seu extrato

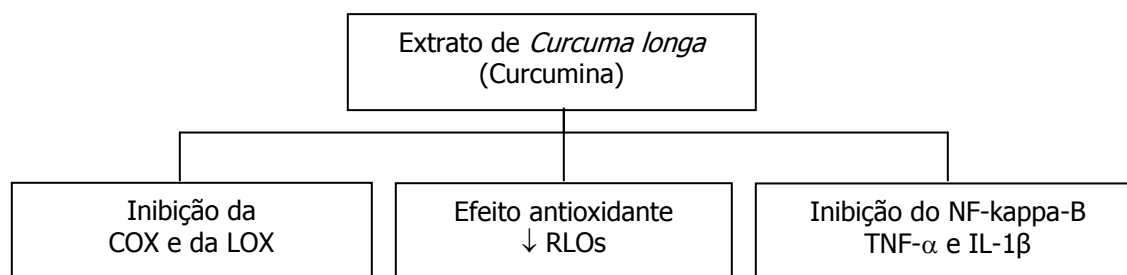
Diversas propriedades medicinais têm sido atribuídas ao extrato da *Curcuma longa*. Na Índia, a planta tem sido usada há séculos, como medicamento para o tratamento de dermatites, doenças dispépticas, doenças musculares e artrite (Almeida, 2006; Chandra e Gupta, 1972). Na China, a curcumina é utilizada como analgésico, antifisético, antiespasmódico, e vermífugo. Na Europa, a curcumina já foi utilizada no tratamento da dispepsia, uveíte anterior crônica e na erradicação da *Helicobacter pylori*. Nos Estados Unidos, a curcumina é liberada pelo FDA e vem sendo estudada com interesse crescente em pesquisas sobre o mal de Alzheimer, déficit de memória, artrite reumatoide, diabetes e, principalmente, câncer do fígado e colorretal. O diferuloilmetano, princípio ativo da curcumina, é um polifenol natural isolado do rizoma da planta *Curcuma longa*. Nos últimos anos, extensas pesquisas *in vitro* e *in vivo* vêm sugerindo que a substância possui efeito anticarcinogênico, antiviral, antioxidante e anti-inflamatório (Fu *et al.*, 2008; Mandal *et al.*, 2009; Samuhasaneeto *et al.*, 2009).

O incentivo à utilização da curcumina na osteoartrite é apoiado quase que exclusivamente por sua secular utilização como substância natural com propriedades anti-inflamatórias pela medicina Ayurvédica (Foltz-Gray, 2005; Jurenka, 2009). A sabedoria popular sugere que a curcumina, um dos três grandes curcuminoides fenólicos que constituem 3-5% da *Curcuma longa*, é o principal ingrediente ativo anti-inflamatório presente na planta (Aggarwal *et al.*, 2004). Um efeito benéfico da curcumina como antiartrítico foi demonstrado em um pequeno estudo clínico com portadores de artrite reumatoide e em três pequenos estudos descritivos de artrite induzida em animais (Deodhar *et al.*, 1980; Joe *et al.*, 1997; Mukhopadhyay *et al.*, 1982). Mais recentemente, outro estudo demonstrou que outros componentes não-curcuminoides existentes na planta também apresentam atividade anti-inflamatória, avaliada pela inibição *in vitro* da produção de prostaglandina, e que esses componentes podem atuar de forma sinérgica com a curcumina, potencializando os do extrato (bloqueando a inflamação) (Lantz *et al.*, 2005). Demonstrou-se ainda que a curcumina pode prevenir a inflamação articular, apresentando, portanto, efeitos profiláticos (Funk *et al.*, 2006b). Esse estudo, inclusive, sugere que o extrato de curcuma altamente purificado pode ser mais potente e menos tóxico do que o consumo na curcumina na

sua forma natural (Funk *et al.*, 2006b). Assim, devido à sua eficácia em regular vários alvos da cascata inflamatória, bem como sua segurança para uso humano, a curcumina tem recebido considerável interesse como um potencial agente terapêutico para a prevenção e/ou tratamento de várias doenças malignas, artrite, alergias, doença de Alzheimer e outras doenças inflamatórias.

Na base de dados Pubmed, quando se utilizam os descritores booleanos “*Curcuma longa*” ou “*Curcumin*” existem mais de 4.300 referências. Contudo, quando se acrescenta o descritor “*Arthritis*” verifica-se que existem apenas 67 estudos avaliando os efeitos do extrato de *Curcuma longa* no tratamento da artrite (Banji *et al.*, 2011; Khalifé e Zafarullah, 2011). Apenas sete avaliaram a eficácia da substância em modelos experimentais de artrite. Nenhum estudo avaliou a eficácia da curcumina na artrite induzida pelo zimosan nem testou a possibilidade de que a curcumina possa ser tão eficaz na redução da fase aguda da inflamação quando comparada, por exemplo, aos esteroides hormonais, substâncias mais eficazes para o tratamento da doença.

Dentre os vários potenciais usos do extrato de *Curcuma longa*, destaca-se a sua intensa atividade antioxidante (Chopra *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2007). Ao considerar-se que na artrite existe grande formação de RLO pela sinóvia, é possível que a substância possa ser útil no seu tratamento (Funk *et al.*, 2006b). O extrato da *Curcuma longa* inibe a atividade de diferentes quinases. A curcumina, através da modulação da ativação de vários fatores de transcrição, regula a expressão de enzimas inflamatórias, citocinas, moléculas de adesão celular e proteínas de controle do ciclo celular (Figura 3).



**Figura 3** – Mecanismo de ação do extrato de *Curcuma longa*

A curcumina é uma molécula com grande pleiotropismo, capaz de interagir com numerosas moléculas envolvidas na cascata inflamatória (Jurenka, 2009). Seus mecanismos de ação são diversos e parecem envolver a regulação de vários alvos moleculares, incluindo fatores de transcrição (como o NF- $\kappa$ B), fatores de crescimento (como o fator de crescimento endotelial vascular), citocinas inflamatórias (como o TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6), proteínas quinases e outras enzimas (tais como ciclooxigenase 2 e lipoxigenase 5). A curcumina reduz a inflamação por reduzir a formação de mediadores inflamatórios como a IL-1- $\beta$ , nos condrócitos articulares (Herontin *et al.*, 2010). A curcumina apresenta atividade antagonista contra as citocinas pró-inflamatórias (Buhrmann *et al.*, 2010). Apesar dessas atividades anti-inflamatórias e antioxidantes, poucos estudos avaliaram o uso da substância em modelos experimentais de artrite (Banerjee *et al.*, 2003; Banji *et al.*, 2011; Clutterbuck *et al.*, 2009; Funk *et al.*, 2006a; Funlk *et al.*, 2010; Joe *et al.*, 1997; Kuptniratsaikul *et al.*, 2009; Moon *et al.*, 2010; Mun *et al.*, 2009; Ramadan *et al.*, 2011; Taty Anna *et al.*, 2011). A maioria desses estudos experimentais demonstra que a curcumina reduz o escore inflamatório nos modelos de artrite onde a droga foi utilizada, pela sua ação antioxidante, a proliferação de linfócitos T, níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , transcrição do NF- $\kappa$ B, produção de PGE-2 e COX-2. Esses efeitos sugerem que a curcumina possa suprimir com eficiência a resposta inflamatória articular por inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios e regular a resposta celular e humoral (Moon *et al.*, 2010). Contudo, apesar de todos esses efeitos, o consumo por via oral ainda é um problema, já que ela é rapidamente metabolizada no fígado e na parede do intestino, o que provoca a baixa biodisponibilidade celular da substância (Khanna *et al.*, 2007).

Ao considerar a atividade antioxidante da curcumina e a relação entre artrite e estresse oxidativo, é possível que seus efeitos antioxidantes possam minimizar o dano oxidativo à cartilagem articular. Todavia, do melhor do nosso conhecimento, os efeitos anti-inflamatórios da curcumina ainda não foram testados em modelos experimentais de artrite induzida por zimosan.

## 2. OBJETIVOS

1. Confirmar se a infiltração intra-articular de zimosan no joelho de ratos é capaz de induzir artrite.
2. Verificar se a administração oral da curcumina (extrato oleoso da *Curcuma longa*) melhora a resposta inflamatória aguda após a infiltração intra-articular de zimosan no joelho de ratos, através de avaliação histopatológica e morfometria computadorizada.
3. Verificar se a administração oral de curcumina apresenta efeito comparável à administração oral de prednisona na resposta inflamatória aguda após a infiltração intra-articular de zimosan no joelho de ratos, mediante avaliação histopatológica e morfometria computadorizada.

### **3. MATERIAL E MÉTODO**

Este estudo foi iniciado após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Universidade São Francisco, Bragança Paulista – SP, recebendo o parecer de nº 003.06.11 do dia 22 de setembro de 2011. Foram obedecidas todas as orientações recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as recomendações da Lei Sérgio Arouca (Lei Federal 11.794).

#### **3.1 Animais de experimentação**

Foram utilizados trinta e dois ratos Wistar machos, provenientes do Biotério Central da Universidade São Francisco, pesando entre 200 e 300 g, com aproximadamente três meses de idade. Foram excluídos animais que apresentassem qualquer tipo de infecção cutânea, bem como aqueles que apresentassem dificuldade na marcha ou má-formação nos membros inferiores.

#### **3.2 Grupos experimentais**

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, denominados grupos controle positivo e negativo, e três grupos denominados experimento. No grupo controle positivo, composto de quatro animais, após indução da artrite, realizou-se gavagem apenas com óleo de milho a cada 6 horas. Os animais foram sacrificados após 6, 12, 24 e 48 horas. Quatro animais foram infiltrados apenas com solução salina 0,9% e sacrificados após 6, 12, 24 e 48 horas, servindo como controle negativo.

No grupo experimento, os animais, após indução da artrite, foram gavados, a cada 6 horas, com curcumina na dose de 100 mg/kg/dose (Smart Nutrition Ltd., USA) (n=8) prednisona nas doses de 1 mg/kg/dia (n=8) e 8 mg/kg/dia de prednisona (n=8). Os animais de cada grupo experimento foram sacrificados após 6, 12, 24 e 48 horas.

#### **3.3 Etapa pré-operatória**

Todos os animais foram mantidos nas mesmas condições ambientais e nutricionais por um período de 15 dias antes do início do experimento. Foram dispostos em gaiolas individuais, de plástico, enumeradas, forradas com maravalha previamente esterilizada, nas condições exigidas pelo Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental da Universidade São Francisco. As gaiolas foram mantidas em estantes



em local arejado, sob a vigilância da equipe técnica do departamento, em ciclos claro/escuro de 12 horas. Os animais receberam água potável e ração comercial *ad libitum*.

### 3.4 Anestesia

Inicialmente, os animais foram pesados para cálculo da dose de anestésico. Utilizamos, para tal, o cloridrato de quetamina e o cloridrato de xilazina 2% na dose de 0,1 ml/100 g, administrada por via intraperitoneal (Figura 4).



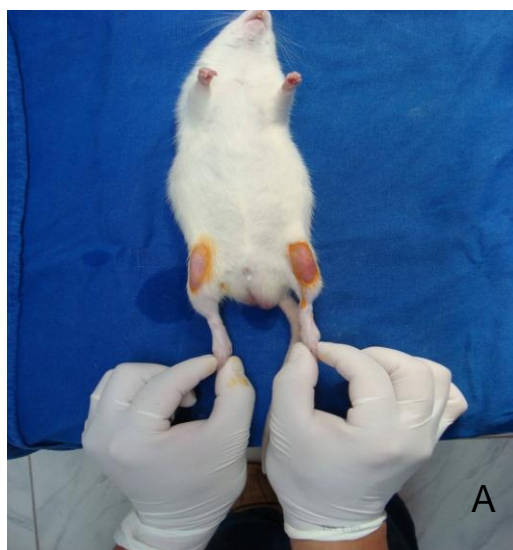
**Figura 4** - Anestesia com Quetamina+xilazina intraperitoneal

### 3.5 Método

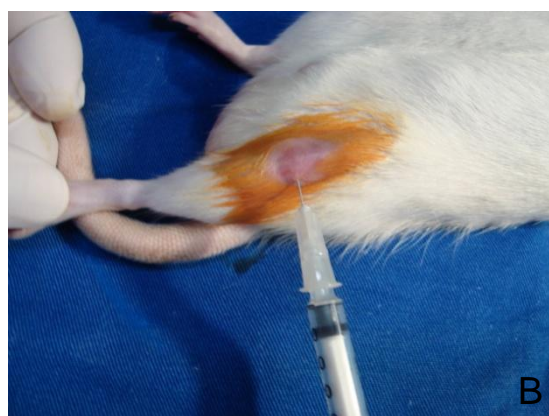
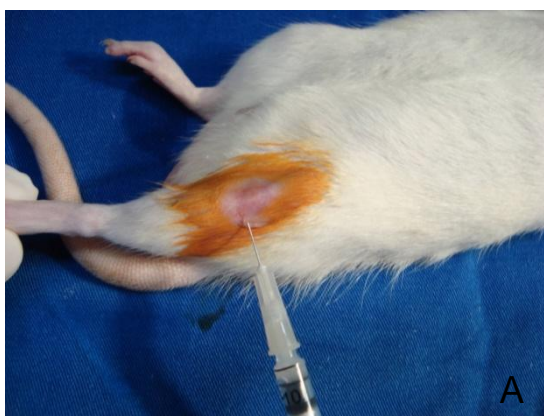
O estudo foi iniciado às 6 horas da manhã. Depois de anestesiados, os animais foram submetidos à tricotomia na região articular do joelho. Após a tricotomia, realizou-se a antissepsia no local da infiltração com PVPI (Figura 5).

Foram injetados 0,05 ml de zimosan de 100 mg (0,05 ml de zimosan – 1 mg/50 µl) em ambas as articulações do joelho de vinte e oito animais com seringas tipo insulina descartáveis. Durante a infiltração foi observado aumento de volume no local,

como mostra a figura 6. Nos outros quatro ratos, foram injetados 0,05 ml de SF. 0,9% (grupo controle negativo).



**Figura 5** - Tricotomia da face anterior dos joelhos e antissepsia com PVPI tópico (A e B)



**Figura 6** - Infiltração intra-articular de Zimosan (A). Aumento do volume articular pós- infiltração (B)

Após 40-60 minutos com os ratos em vigília, foi aplicada, por gavagem gástrica, a primeira dose das soluções de intervenção: óleo de milho (controle), curcumina (100 mg/kg) e prednisona nas duas concentrações propostas.



**Figura 7** - Gavagem gástrica com curcumina

Nos outros dois grupos experimentais, foi diluído prednisona 5 mg em 40 ml de S.F. 0,9% (dose de 1 mg/kg/dia) e 20 mg de prednisona em 20 ml de SF 0,9% (dose de 8 mg/kg/dia). Nesses grupos experimentais, foram dados, em média, 0,5 ml da medicação, por gavagem, conforme o peso do animal.

Após seis horas da infiltração, foram sacrificados 8 ratos, com decapitação e exsanguinação sob anestesia, sendo dois do grupo controle, dois do grupo com curcumina e dois ratos de cada grupo gavado com prednisona. Nesse mesmo horário os demais ratos foram gavados com a segunda dose das soluções de intervenção. Doze horas após a indução da artrite, foram sacrificados mais oito ratos e foi realizada

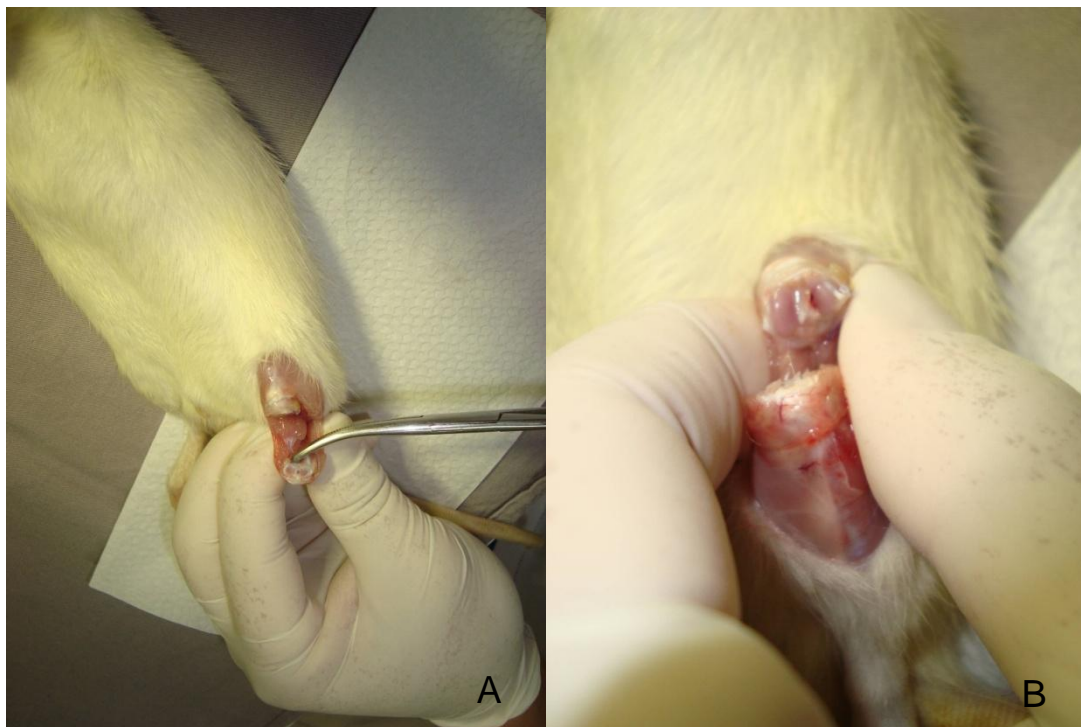
nova gavagem com as soluções de intervenção nos demais. Após seis horas, realizou-se nova gavagem nos animais e, após 24 horas da indução da artrite, foram sacrificados mais oito ratos e realizada gavagem para os restantes, a cada seis horas, por mais 24 horas. Após 48 horas da indução da artrite, os últimos oito ratos foram sacrificados.

### 3.6 Coleta do Material

Foi feita uma incisão longitudinal no nível das articulações (Figura 8) e a abertura por planos até as articulações serem expostas (Figura 9). Após a exposição, foram colhidas amostras de ambas as articulações do joelho (menisco, cartilagem articular, ligamentos) (Figura 10).



**Figura 8** - Incisão na pele sobre a articulação infiltrada e dissecção da cápsula articular (A e B)



**Figura 9** -- Abertura e exposição da região intra-articular (A) para coleta da cartilagem e membrana sinovial (B)



**Figura 10** - Acondicionamento do material removido em solução de formol a 10% tamponado.

Os materiais coletados durante o procedimento cirúrgico foram divididos em dois recipientes: um tubo contendo líquido fixador, constituído por formol a 10% tamponado, e ali permaneceu por um período de 48 horas.

### 3.7 Técnica histopatológica

O material foi identificado e colocado individualmente em cubas de metal específicas e foi processado na seguinte ordem:

- **Desidratação:** foram utilizados cinco banhos de álcool absoluto, e em cada banho o material permaneceu por um período de uma hora.

- **Diafanização:** foram utilizados três banhos de xilol, e o material permaneceu por uma hora em cada banho.

- **Impregnação:** para este procedimento utilizaram três banhos de parafina líquida a uma temperatura prévia de 60°C, em estufa, em cada banho o material teve um período de exposição de uma hora.

- **Inclusão:** o material previamente processado foi incluído em blocos de parafina líquida e aguardada a sua total solidificação.

- **Cortes histológicos:** este procedimento foi realizado em micrótomo rotativo para obtenção de cortes histopatológicos com uma espessura de 5 µm.

- **Desparafinização:** os cortes foram colocados sobre uma lâmina de vidro com extremidade fosca onde foi feita a identificação de cada material (animal); após a identificação das lâminas as mesmas foram colocadas no interior da estufa e ali permaneceram por um período de quatro horas para que ocorresse a adesão do material cortado sobre as lâminas.

- **Coloração:** para realizar a coloração das lâminas, utilizamos a técnica de coloração padrão, denominada de hematoxilina e eosina (HE) com dois banhos de xilol nos quais as lâminas permaneceram por um período de 10 minutos em cada. Em seguida, as lâminas passaram por três banhos de álcool absoluto e foram lavadas com água corrente por cinco minutos, após o que as lâminas foram expostas (mergulhadas) no corante Hematoxilina de Harris, por um período de um minuto; lavaram-se as mesmas com água corrente para remover o excesso do corante hematoxilina e logo em seguida

as lâminas foram expostas no corante eosina por um período de dois minutos e lavadas novamente para remover o excesso de corante eosina.

- **Montagem das lâminas:** As lâminas foram desidratadas através de cinco banhos de álcool absoluto somente passagem em cada banho, três banhos de xilol passagem e em seguida realizamos a montagem das lâminas utilizando-se resina (três gotas sobre os cortes corados) e lamínula de vidro.

### 3.8 Avaliação histopatológica

Para diagnóstico de inflamação, as lâminas foram analisadas com microscópio comum Nikon Eclipse DS-50, com magnificação final de 200x, por patologista experiente que desconhecia a origem do material. As microfotografias foram feitas com câmera de videocaptura (DS-Fi-50) acoplada ao microscópio e as imagens obtidas, posteriormente, digitalizadas em computador.

A avaliação histológica foi feita empregando-se interpretação subjetiva dos seguintes parâmetros: intensidade do exsudato inflamatório, comprometimento do exsudato inflamatório (perivascular, intersticial e sinovial), congestão vascular, edema, necrose e presença de pioartrite, conforme quadro 1.

**Quadro 1** – Escala de graduação do escore inflamatório (em cruzes)

<b>Grau de inflamação</b>	<b>Escore</b>	<b>Característica histopatológica</b>
<b>Ausente</b>	0	Parâmetro ausente
<b>Leve</b>	1-2	Parâmetro presente com intensidade leve
<b>Moderado</b>	3-4	Parâmetro presente com intensidade moderada
<b>Grave</b>	5-6	Parâmetro presente com intensidade grave

Fonte: Bezerra *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2001

### 3.9 Morfometria computadorizada

O uso de sistemas de análise de imagem assistida por computador, também conhecida como morfometria computadorizada ou análise estereológica, permite a mensuração das mais variadas estruturas (Priolli *et al.*, 2003).

O emprego de método de análise de imagem que permita avaliação objetiva traz maior fidedignidade e uniformidade em relação aos resultados obtidos. Variáveis passíveis de mensuração, tais como o conteúdo tecidual das proteínas coradas por imuno-histoquímica podem ser determinadas objetivamente, possibilitando comparações mais precisas entre tecidos normais e inflamados. A análise de imagem assistida por computador vem sendo utilizada com vários objetivos e apresenta como vantagens, em relação aos métodos convencionais, a avaliação quantitativa das estruturas microscópicas, de forma objetiva e rápida (Nonose, 2009; Nonose *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2010).

A leitura das lâminas foi feita em microscópio óptico comum<sup>1</sup> (Nikon H550S) com magnificação final de 1.000x. A contagem de neutrófilos íntegros foi analisada qualitativa e quantitativamente por patologista experiente, que desconhecia a origem do material e os objetivos do estudo. Foram apenas considerados neutrófilos que não apresentassem sinais de degeneração.

O número de neutrófilos por campo foi mensurado por análise de imagem assistida por computador, avaliando-se a imagem de dois campos aleatórios em cada lâmina histológica. A imagem selecionada no campo de visão do microscópio, após adequadamente focada, foi capturada por câmera de vídeo (Nikon® DS-Fi1)<sup>2</sup> previamente acoplada a microscópio óptico. A seguir, foi processada e analisada pelo programa NIS-Elements<sup>3</sup> instalado em um computador (Pentium 4 DC, 1 Gbyte Memória RAM, 2 HD de 200 Gbyte, placa de videocaptura ASUS) (Figura 11). O programa, após calibramento para o aumento selecionado (1.000x) permitia a

---

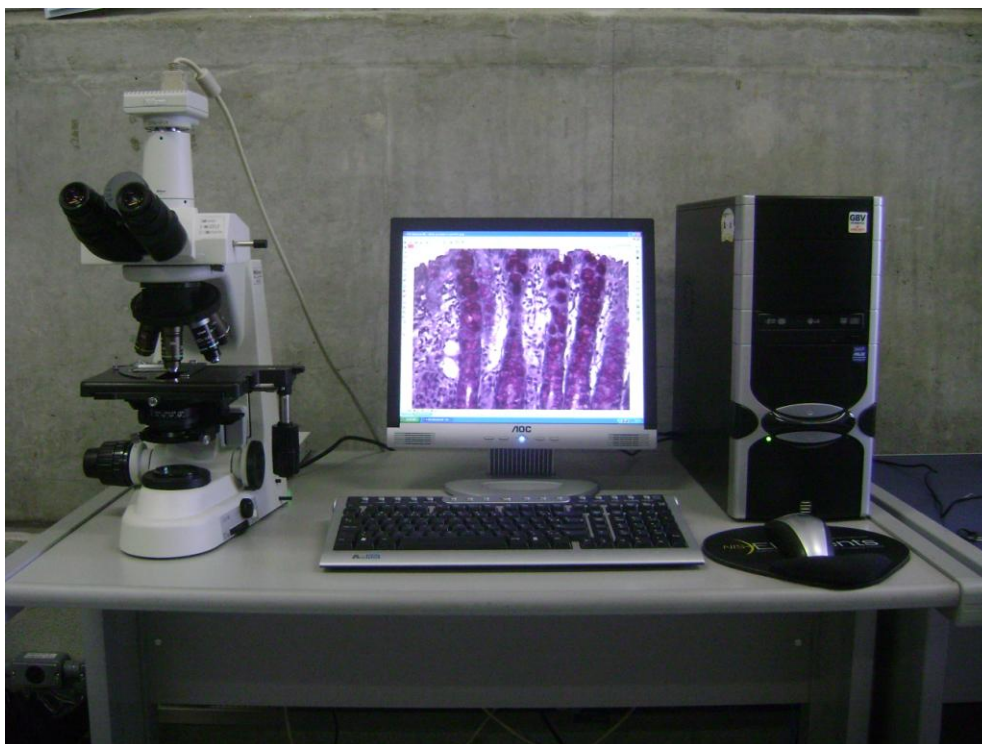
<sup>1</sup> Microscópio óptico comum mod. Nikon H550S

<sup>2</sup> Câmera de vídeo digital mod. Nikon DS-Fi1 5.0 mega pixels

<sup>3</sup> Software que permite captura, arquivamento e análise de imagens para os níveis mais avançados de pesquisa. Permite mais de seis dimensões para a análise.



sobreposição de uma cruz sobre cada neutrófilo selecionado. Terminada a contagem no primeiro campo escolhido, passava-se a leitura do segundo campo. Os valores encontrados para cada animal eram transferidos para uma planilha de dados que, após duas medidas, calculava a média com os respectivos desvios padrão. O valor final adotado para cada lâmina, nos quatro tempos de intervenção, estabelecidos e com as respectivas soluções de intervenção foi representado pela média dos valores encontrados na avaliação dos dois campos selecionados.



**Figura 11-** Equipamento utilizado para a análise de imagem assistida por computador.

A intensidade do infiltrado inflamatório foi graduada em leve, moderada ou intensa, de acordo com o tipo de células presentes (linfócitos, eosinófilos, neutrófilos) e com a sua intensidade (de - a ++++).

Para as variáveis: aspecto da superfície mucosa, congestão vascular, infiltrado inflamatório, foram atribuídos pontos de 0 (ausente) a 4 (intensidade máxima de cada variável isolada). Esses pontos foram somados para a aquisição de um novo parâmetro

estudado – graduação inflamatória –, cujos valores oscilaram de 0 (inflamação ausente) a 6 (inflamação máxima encontrada). Com os resultados dessa somatória determinou-se a graduação inflamatória, em cada segmento estudado. De acordo com os pontos obtidos na graduação inflamatória estratificou-se a graduação em ausente (0), leve (1 e 2), moderada (3 e 4) e grave (5 e 6), ao que se denominou de grau de inflamação.

### **3.10 Análise estatística**

Os resultados encontrados foram descritos pelo valor médio e respectivo erro padrão, adotando nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) para todos os testes. Os resultados significantes foram marcados com caracteres simples quando o p valor encontrado foi menor que 0,05, e com caracteres duplos, quando menor que 0,01.

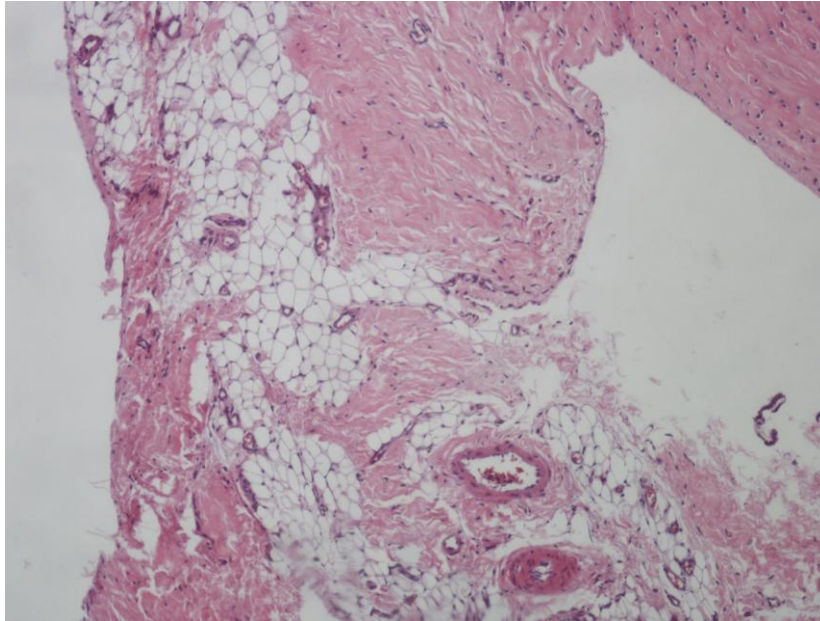
Adotamos o teste de Mann-Whitney para comparar os resultados encontrados.

A variância ao longo do tempo de experimento foi estudada pelo teste de Kruskal-Wallis.

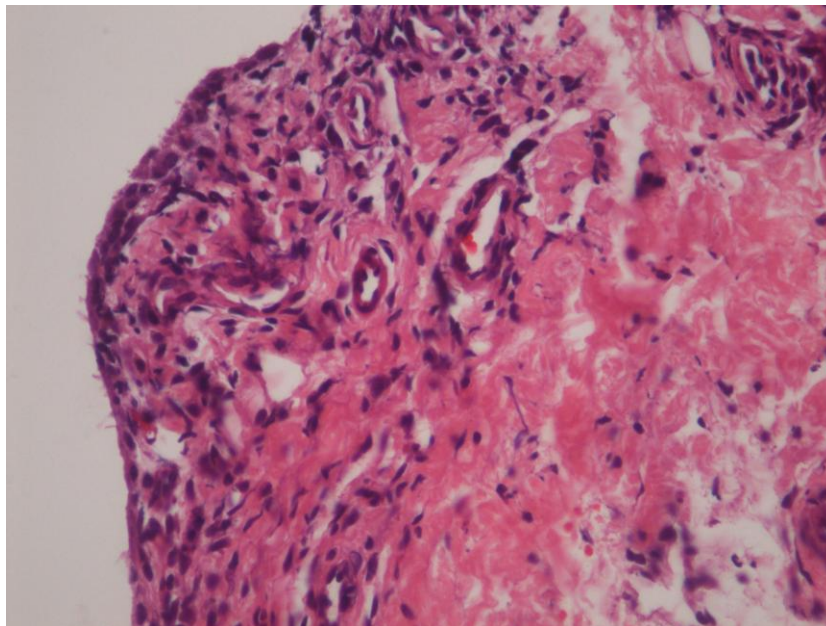
Todos os testes foram realizados com o programa estatístico SPSS® (SPSS Inc., Chicago, USA), versão 13.0 para Windows, e os gráficos elaborados com o programa Microsoft Office Excel, 2007 para Windows.

## 4. RESULTADOS

As figuras 12 e 13 mostram a cartilagem articular e a membrana sinovial removida de um joelho normal de rato (não submetido a infiltração com zimosan).

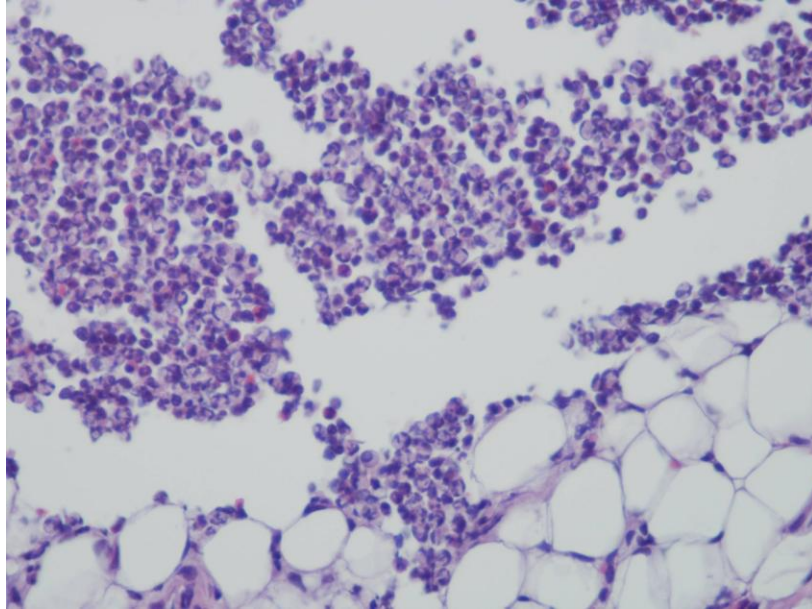


**Figura 12** - Corte histológico de tecido articular normal – H.E. 100x

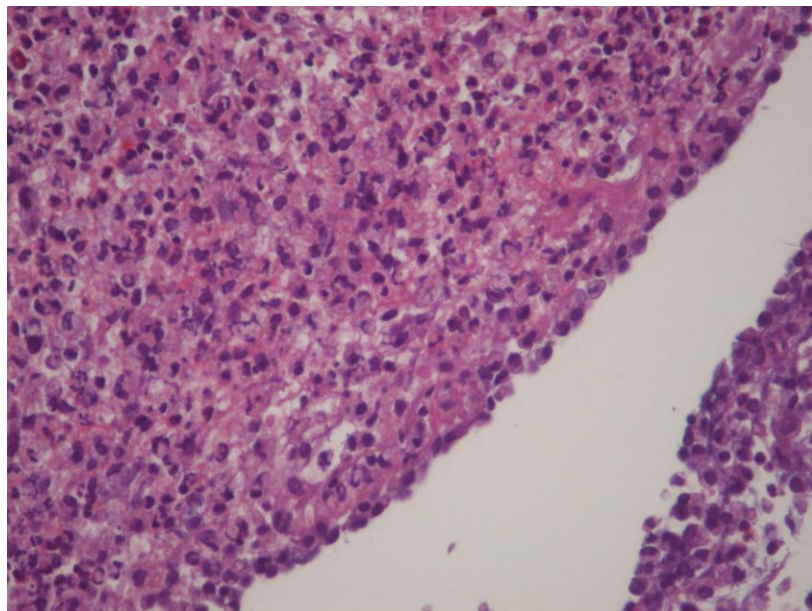


**Figura 13** - Corte histológico de tecido articular normal – H.E. 200x

As figuras 14 e 15 mostram a cartilagem articular e a membrana sinovial removida de um joelho submetido a infiltração com zimosan e gavado com óleo de milho após 6 e 48 horas da infiltração, respectivamente.

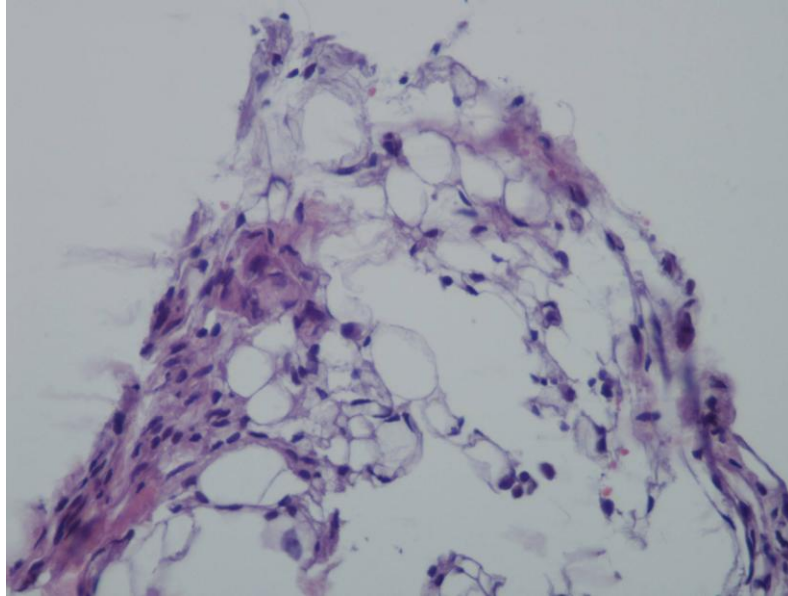


**Figura 14** - Corte histológico de tecido articular apresentando infiltrado inflamatório intenso predominantemente neutrofílico – controle seis horas – H.E. 100x

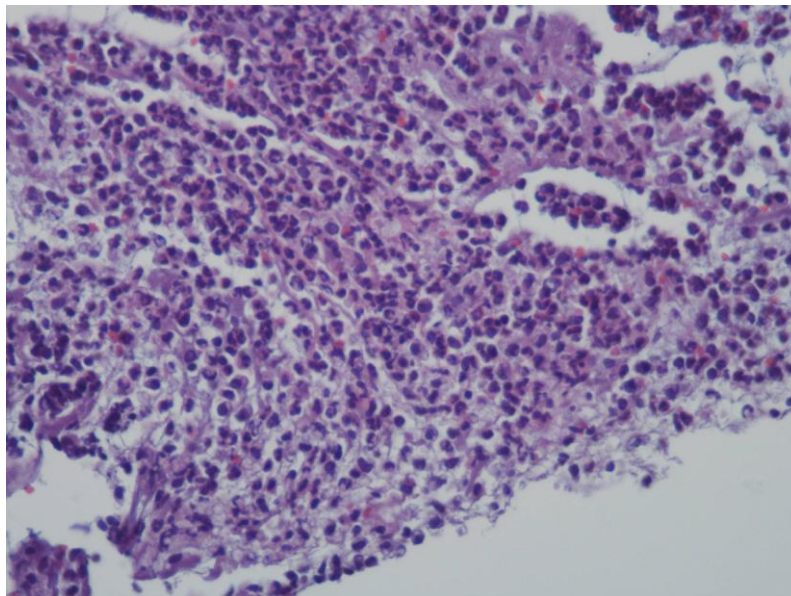


**Figura 15** - Corte histológico de tecido articular apresentando infiltrado inflamatório exuberante purulento (neutrófilos degenerados) – controle 48 horas – H.E. 200x

As figuras 16 e 17 mostram a cartilagem articular e a membrana sinovial removida de um joelho submetido a infiltração com zimosan e gavado curcumina (100 mg/kg) após seis e 48 horas da infiltração, respectivamente.

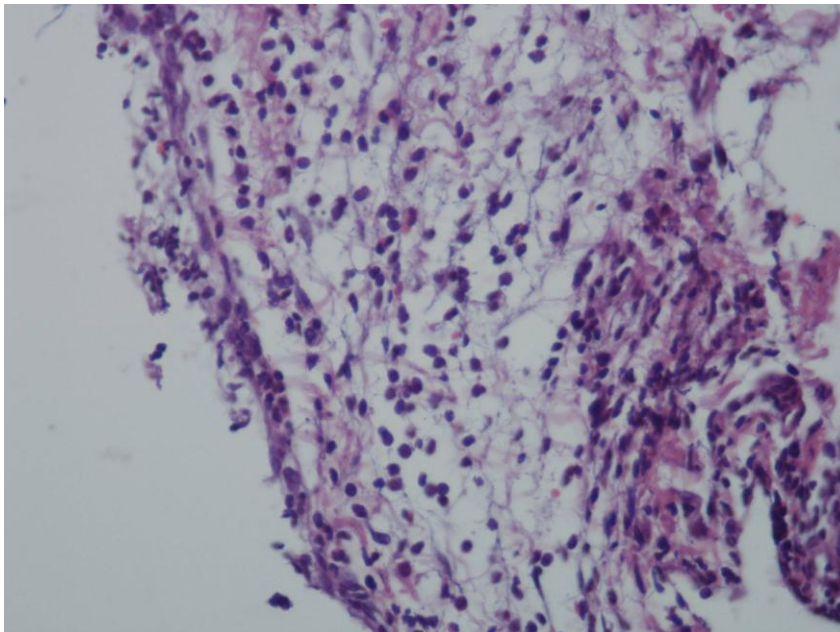


**Figura 16** - Corte histológico de tecido articular com predomínio de linfócitos (celulas arredondadas), demonstrando infiltrado inflamatório leve – H.E. 100x

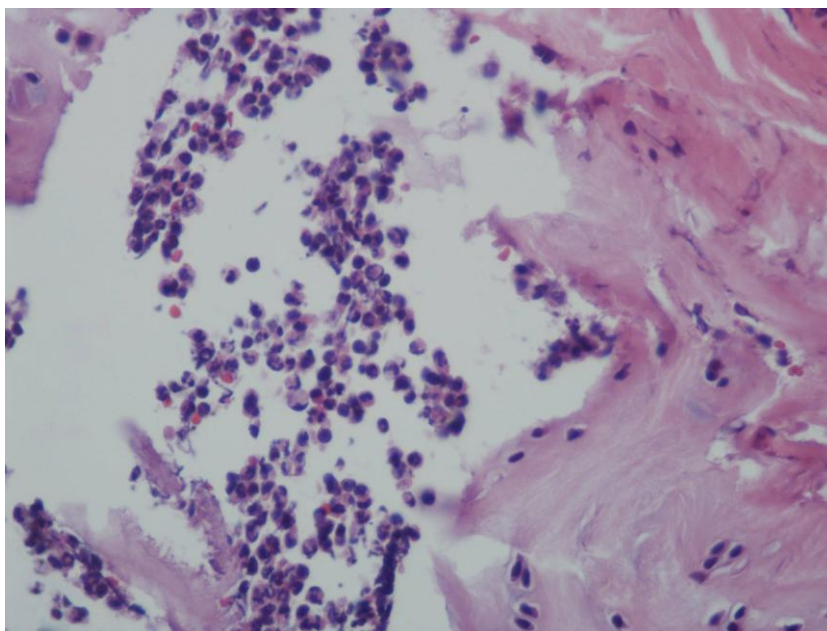


**Figura 17** – Corte histológico de tecido articular demonstrando infiltrado inflamatório intenso – H.E. 200x

As figuras 18 e 19 mostram a cartilagem articular e a membrana sinovial removida de um joelho submetido a infiltração com zimosan e gavado com prednisona 1 mg/kg após 6 e 48 horas da infiltração, respectivamente.

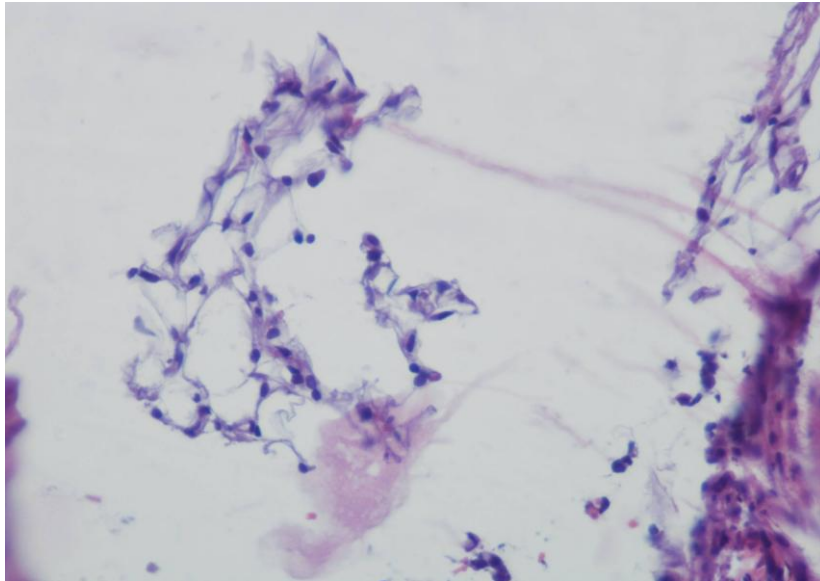


**Figura 18** - Corte histológico de tecido articular demonstrando infiltrado inflamatório moderado – H.E. 100x

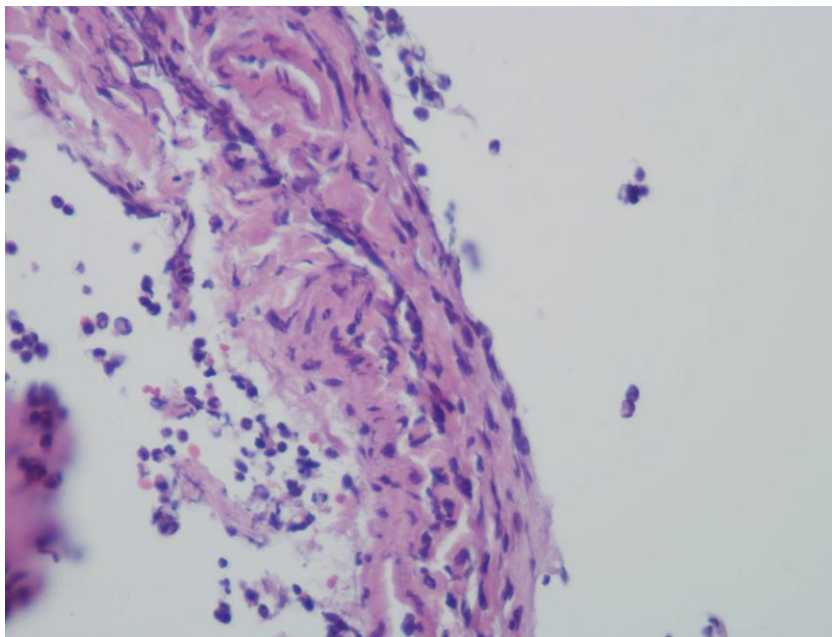


**Figura 19** – Corte histológico de tecido articular demonstrando infiltrado inflamatório moderado – H.E. 100x

As figuras 20 e 21 mostram a cartilagem articular e a membrana sinovial removida de um joelho submetido à infiltração com zimosan e gavado com 8 mg/kg prednisona após 6 e 48 horas da infiltração, respectivamente.

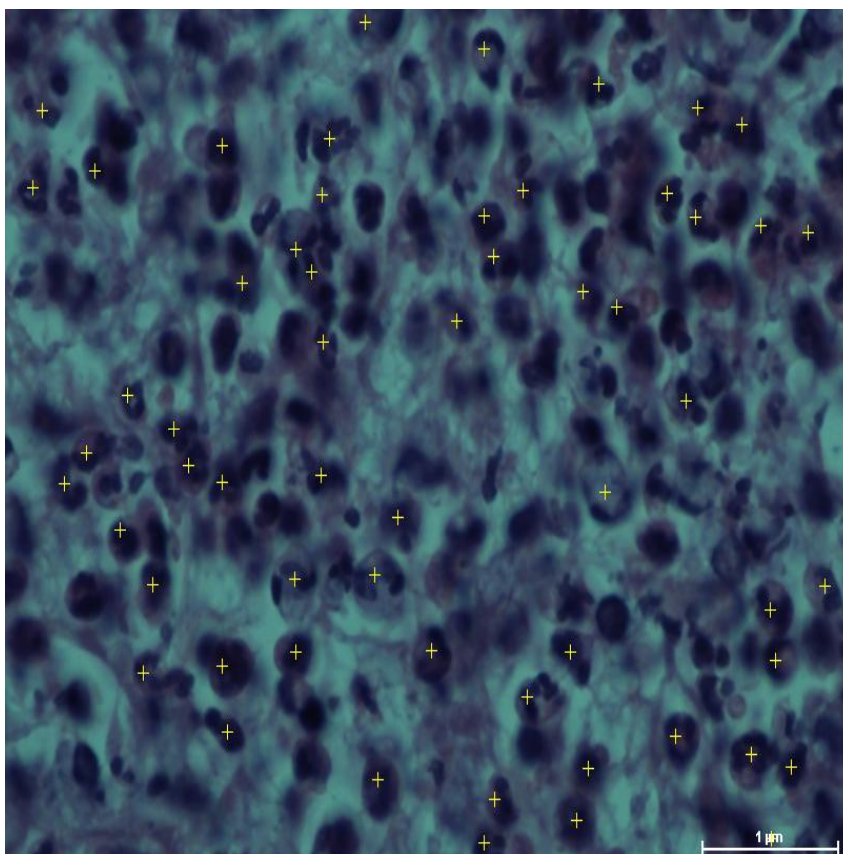


**Figura 20** – Corte histológico de tecido articular demonstrando infiltrado inflamatório leve – H.E. 100x



**Figura 21** – Corte histológico de tecido articular demonstrando infiltrado inflamatório moderado – H.E. 100x

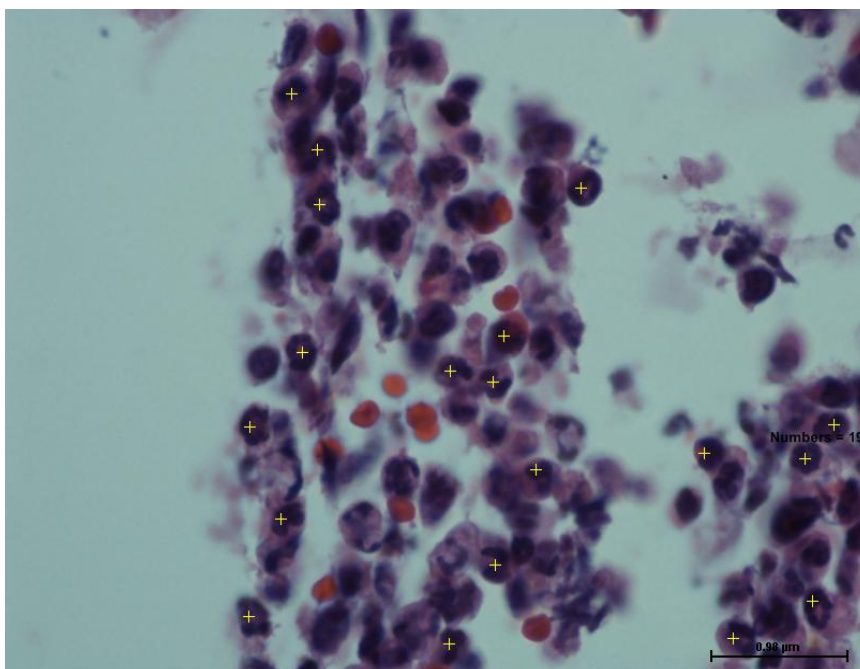
A figura 22 mostra as contagens dos neutrófilos por campo na realização da morfometria computadorizada. O programa identifica neutrófilos íntegros marcando cada célula com uma cruz (+). Após leitura de dois campos histológicos com aumento de 1.000x, o programa automaticamente calculava a média de neutrófilos por campos com o respectivo erro padrão.



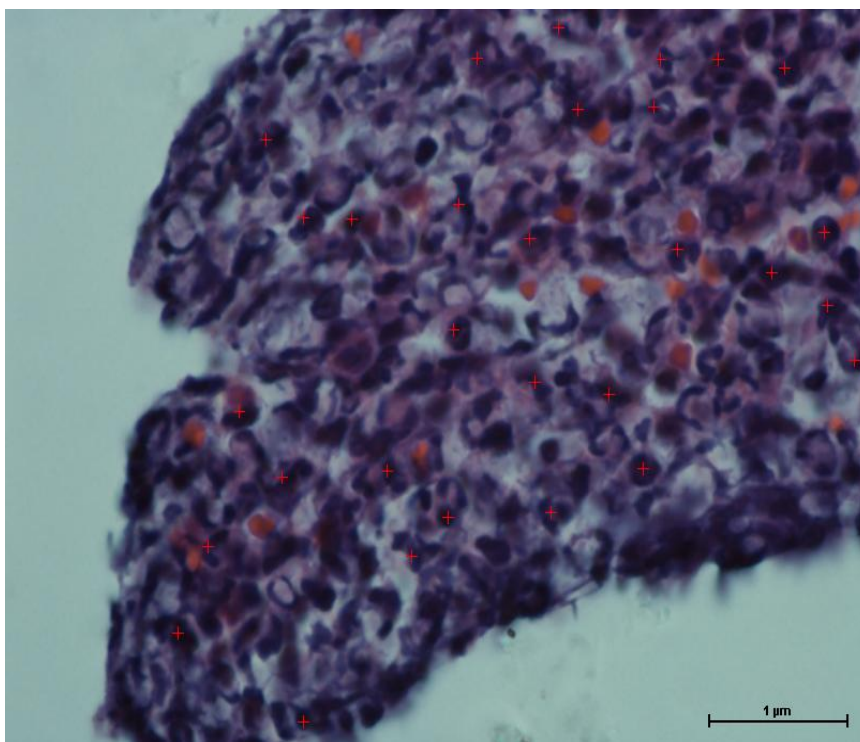
**Figura 22** – Contagem por morfometria computadorizada do número de neutrófilos por campo – H.E. – 1.000x



As figuras 23 e 24 mostram a contagem de neutrófilos por morfometria computadorizada com graduação leve e moderada.



**Figura 23** – Contagem de neutrófilos – graduação leve – H.E. – 1.000x.



**Figura 24** – Contagem de neutrófilos – graduação moderada – H.E. – 1.000x.

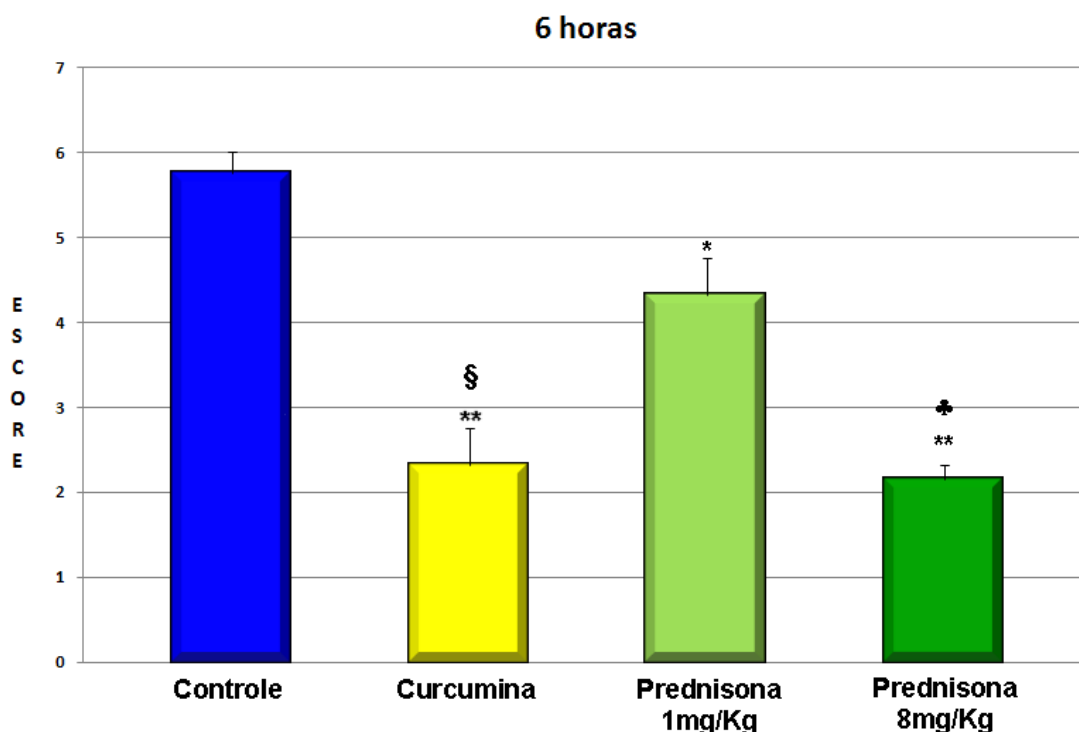
A Tabela 1 mostra, em média, com o respectivo erro padrão, os escores em cruzes após 6, 12, 24 e 48 horas de gavagem com óleo de milho, curcumina, prednisona (1 mg/kg/dia) e prednisona (8 mg/kg/dia).

**Tabela 1.** Escore de graduação inflamatória (em cruzes) após intervenção com óleo de milho, curcumina, prednisona (1 mg/kg) e prednisona (8 mg/kg) na artrite de joelho induzida por zimosan.

	<b>Média ± Erro Padrão</b>			
	<b>Óleo de milho</b>	<b>Curcumina</b>	<b>Prednisona 1mg/kg</b>	<b>Prednisona 8mg/kg</b>
<b>6 horas</b>	5,75±0,25	2,33±0,42	4,33±0,42	2,16±0,16
<b>12 horas</b>	5,75±0,25	5,25±0,25	4,00±1,20	4,75±0,47
<b>24 horas</b>	5,75±0,25	5,75±0,25	5,50±0,28	5,50±0,28
<b>48 horas</b>	5,75±0,25	5,75±0,25	3,50±1,40	3,50±1,40

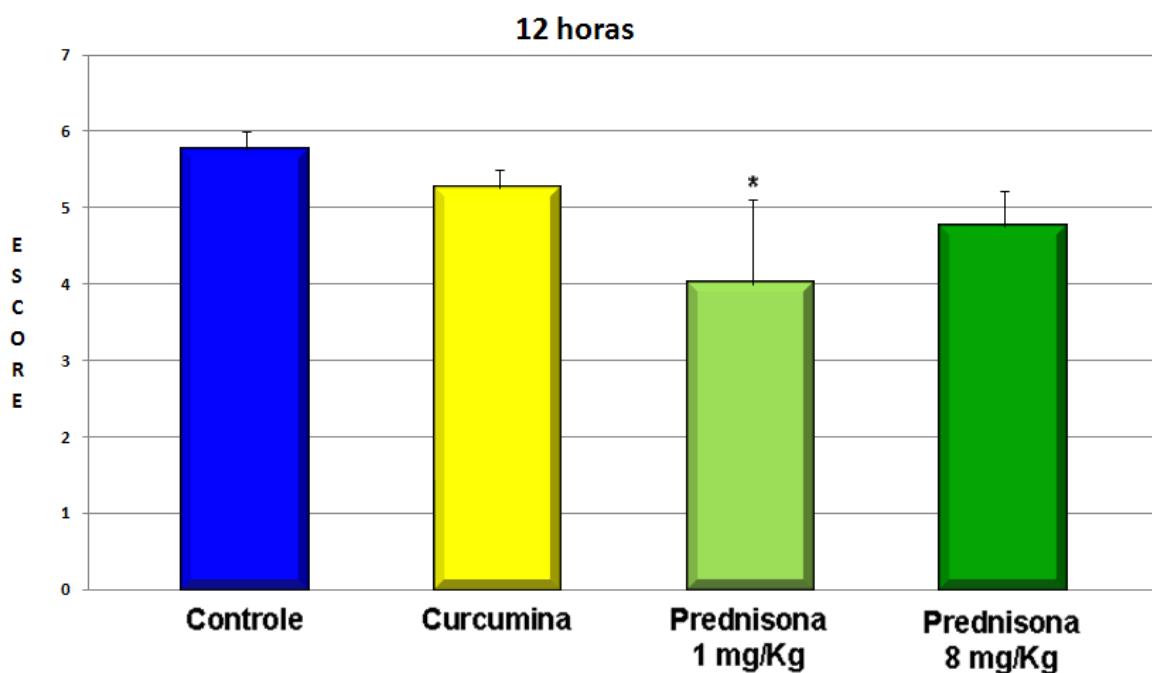
mg/kg = miligramas/quilograma;

O Gráfico 1 mostra a comparação entre os grupos controle e experimento (animais submetidos à intervenção com curcumina, prednisona na dose de 1 mg/kg/dia e prednisona 8 mg/kg/dia) após seis horas da indução da artrite pelo zimosan. Verifica-se que o grupo submetido à intervenção com curcumina apresentava escore inflamatório significativamente menor quando comparado aos animais do grupo controle ( $p < 0,01$ ) e aos submetidos à intervenção com prednisona na dose de 1 mg/kg/dia ( $p < 0,05$ ) e prednisona na dose de 8 mg/kg/dia ( $p < 0,01$ ).



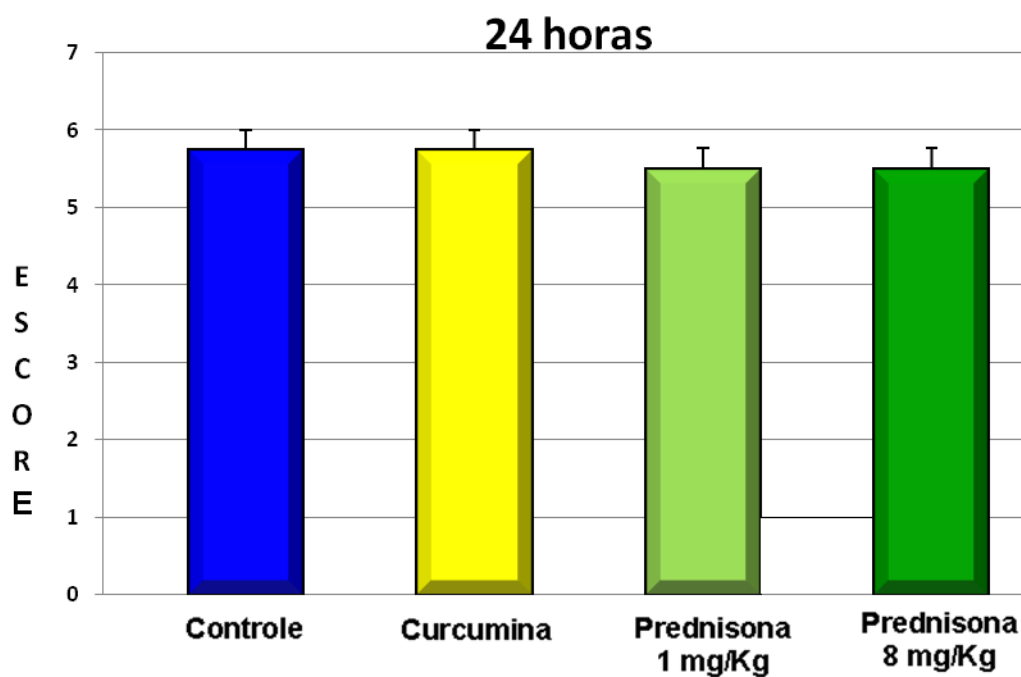
**Gráfico 1** – Comparação entre o grupo controle e o grupo experimento após 6 horas da indução da artrite. Teste de Mann-Whitney \* $p < 0,05$  (controle x prednisona 1mg/kg); \*\* $p < 0,01$  (controle x curcumina e controle x prednisona 8 mg/kg); §  $p < 0,05$  (curcumina x prednisona 1 mg/kg); ♣  $p < 0,01$  (prednisona 1 mg/kg x prednisona 8 mg/kg).

O Gráfico 2 mostra a comparação entre os grupos controle e experimento (animais submetidos à intervenção com curcumina, prednisona na dose de 1 mg/kg/dia e prednisona 8 mg/kg/dia) após 12 horas da indução da artrite pelo zimosan. Verifica-se que houve uma pequena diferença estatística ao comparar os grupos controle e experimento (prednisona 1 mg/kg).



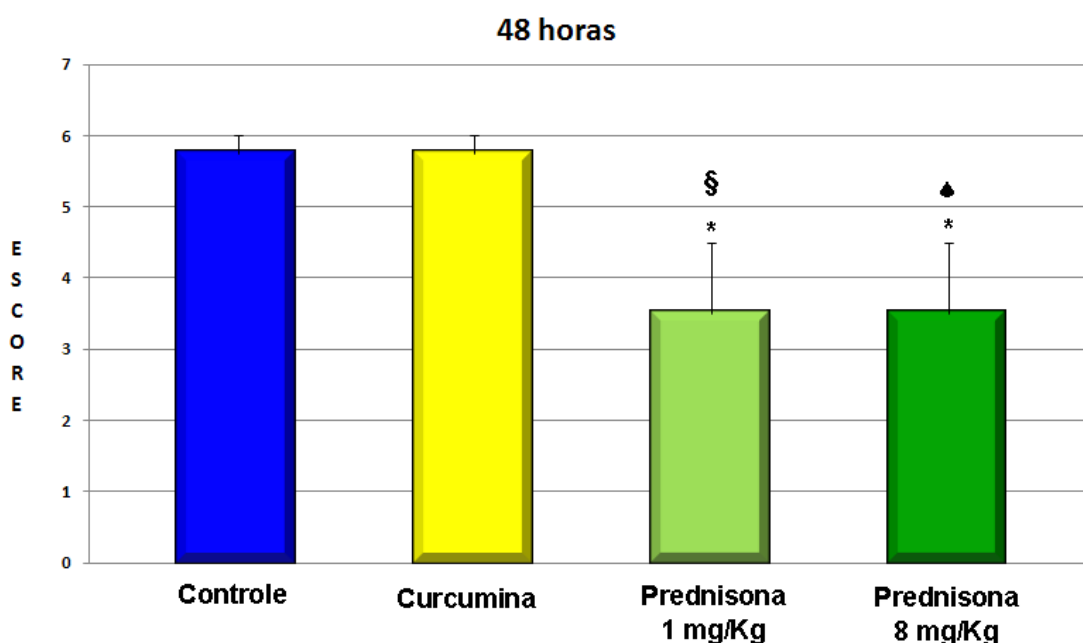
**Gráfico 2** – Comparação entre o grupo controle e o grupo experimento após 12 horas da indução da artrite. \* $p < 0,05$  (controle x prednisona 1 mg/kg). Teste de Mann-Whitney

O Gráfico 3 mostra a comparação entre os grupos controle e experimento (animais submetidos à intervenção com curcumina, prednisona na dose de 1 mg/kg/dia e prednisona 8 mg/kg/dia) após 24 horas da indução da artrite pelo zimosan. Verifica-se que não houve diferença estatística ao compararem-se os grupos controle e experimento.



**Gráfico 3** – Comparação entre o grupo controle e o grupo experimento após 24 horas da indução da artrite. Teste de Mann-Whitney.

O Gráfico 4 mostra a comparação entre os grupos controle e experimento (animais submetidos à intervenção com curcumina, prednisona na dose de 1 mg/kg/dia e prednisona 8 mg/kg/dia) após 48 horas da indução da artrite pelo zimosan. Verifica-se que houve diferença significativa entre o grupo controle e os grupos com prednisona 1 mg/kg e prednisona 8 mg/kg, além da diferença comparando a curcumina e prednisona 1 mg/kg e curcumina e prednisona 8 mg/kg.



**Gráfico 4** – Comparação entre o grupo controle e o grupo experimento após 48 horas da indução da artrite. \* $p < 0,05$  (controle x prednisona 1 mg/kg e controle x prednisona 8 mg/kg); §  $p < 0,05$  (curcumina x prednisona 1 mg/kg); ♣  $p < 0,05$  (curcumina x prednisona 8 mg/kg). Teste de Mann-Whitney

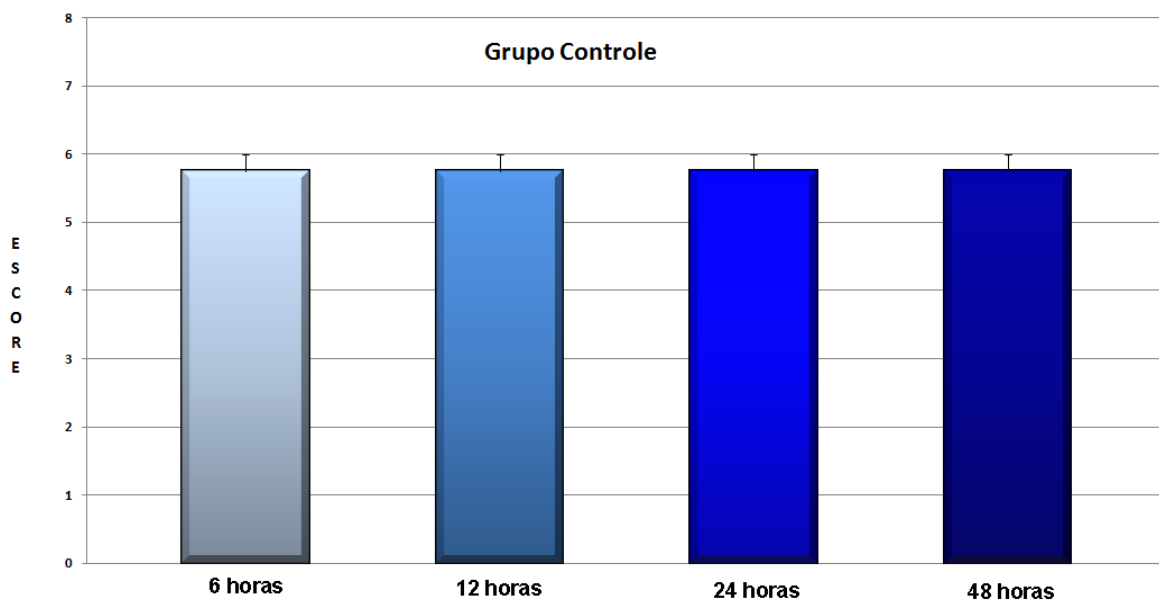
A Tabela 2, mostra a variação do escore inflamatório entre os diferentes tempos do experimento nos animais gavados com óleo de milho, curcumina, prednisona (1 mg/kg/dia) e prednisona (8 mg/kg/dia) nos diferentes tempos de duração do experimento.

**Tabela 2.** Variação do escore inflamatório entre os diferentes tempos do experimento após intervenção com óleo de milho, curcumina, prednisona (1 mg/kg) e prednisona (8 mg/kg) na artrite de joelho induzida por zimosan.

<b>Média ± Erro Padrão</b>				
	<b>6 horas</b>	<b>12 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
<b>Óleo de milho</b>	5,75±0,25	5,75±0,25	5,75±0,25	5,75±0,25
<b>Curcumina</b>	2,33±0,42	5,25±0,25	5,75±0,25	5,75±0,25
<b>Prednisona 1 mg/kg</b>	4,33±0,42	4,00±1,20	5,50±0,28	3,50±1,40
<b>Prednisona 8 mg/kg</b>	2,16±0,16	4,75±0,47	5,50±0,28	3,50±1,40

mg/kg = miligramas/quilograma

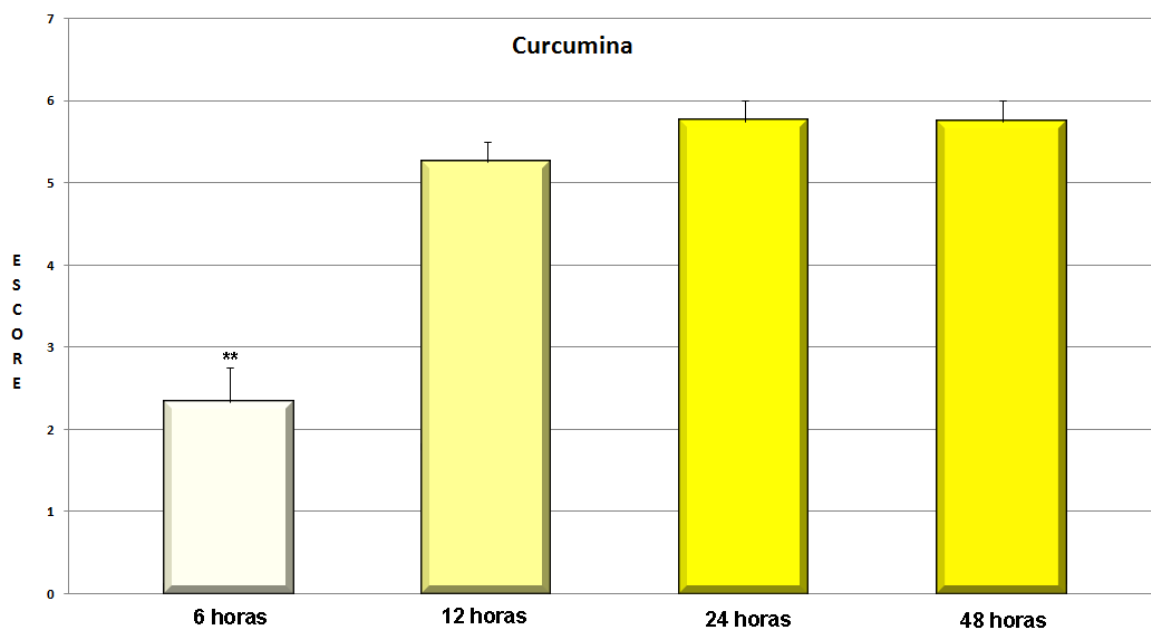
O Gráfico 5 mostra a variação entre os diferentes tempos do experimento nos animais submetidos à gavagem com óleo de milho. Verifica-se que não houve diferença estatística ao compararem-se os diferentes tempos de duração do experimento.



**Gráfico 5** – Variação entre os diferentes tempos do grupo controle. Teste de Kruskal-Wallis

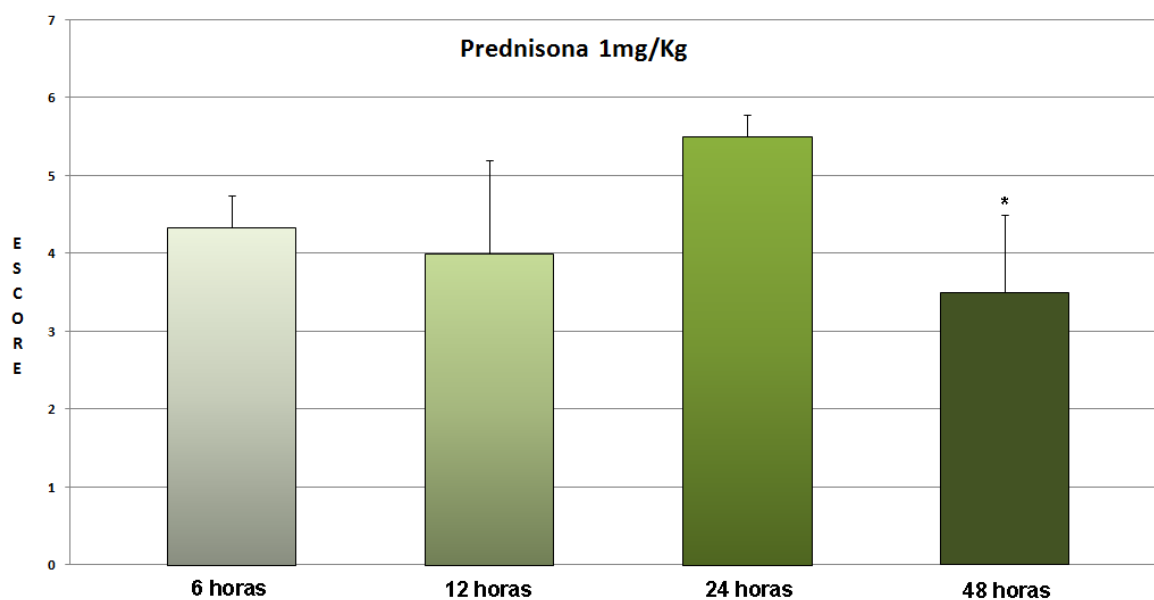


O Gráfico 6 mostra a variação entre os diferentes tempos do experimento nos animais submetidos à gavagem com curcumina. Verifica-se que após seis horas de intervenção com curcumina o escore inflamatório foi significativamente menor quando comparado aos demais intervalos de tempo considerados ( $p < 0,01$ ).



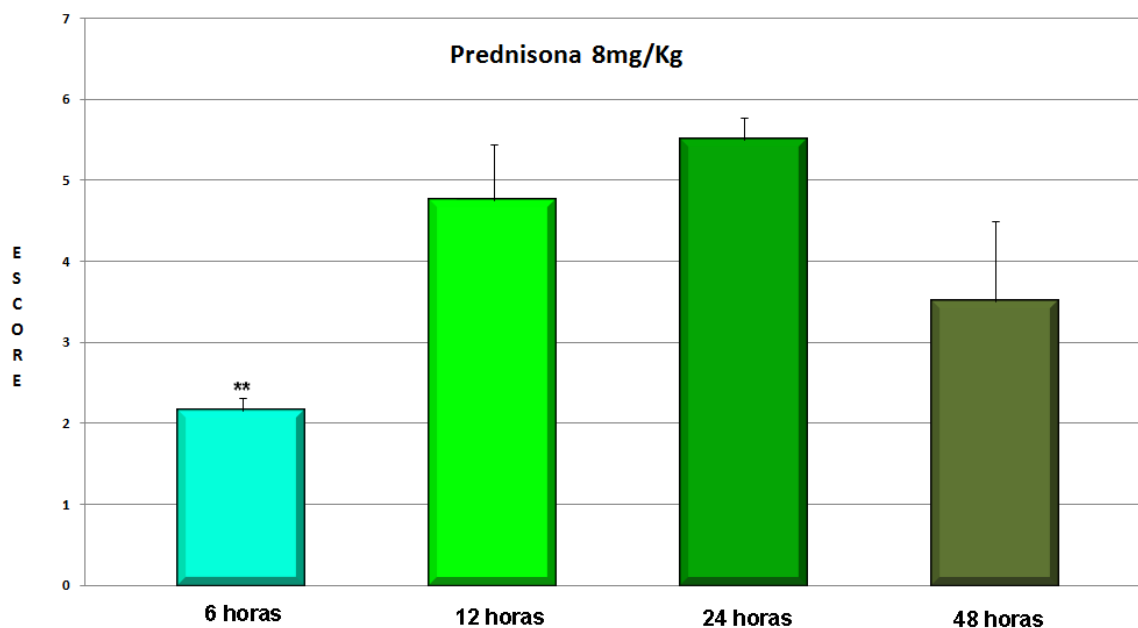
**Gráfico 6** – Variação entre os diferentes tempos do grupo experimento com curcumina. Teste de Kruskal-Wallis \*\*  $p < 0,01$  (significativamente menor às 6 horas).

O Gráfico 7 mostra a variação entre os diferentes tempos do experimento nos animais submetidos à gavagem com prednisona na dose de 1 mg/kg/dia. Verifica-se que o escore inflamatório foi significativamente menor apenas após 48 horas de intervenção ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 7** – Variação entre os diferentes tempos do grupo experimento (Prednisona 1 mg/kg). Teste de Kruskal-Wallis \* $p < 0,05$  (menor após 48 horas).

O Gráfico 8 mostra a variação entre os diferentes tempos do experimento nos animais submetidos à gavagem com prednisona na dose de 8 mg/kg/dia. Verifica-se, à semelhança do que ocorreu com a curcumina, que o escore inflamatório foi significativamente menor apenas após 6 horas de intervenção ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 8** – Variação entre os diferentes tempos do grupo experimento (prednisona 8 mg/kg).

Teste de Kruskal-Wallis  $**p < 0,01$  (significativamente menor às 6 horas).

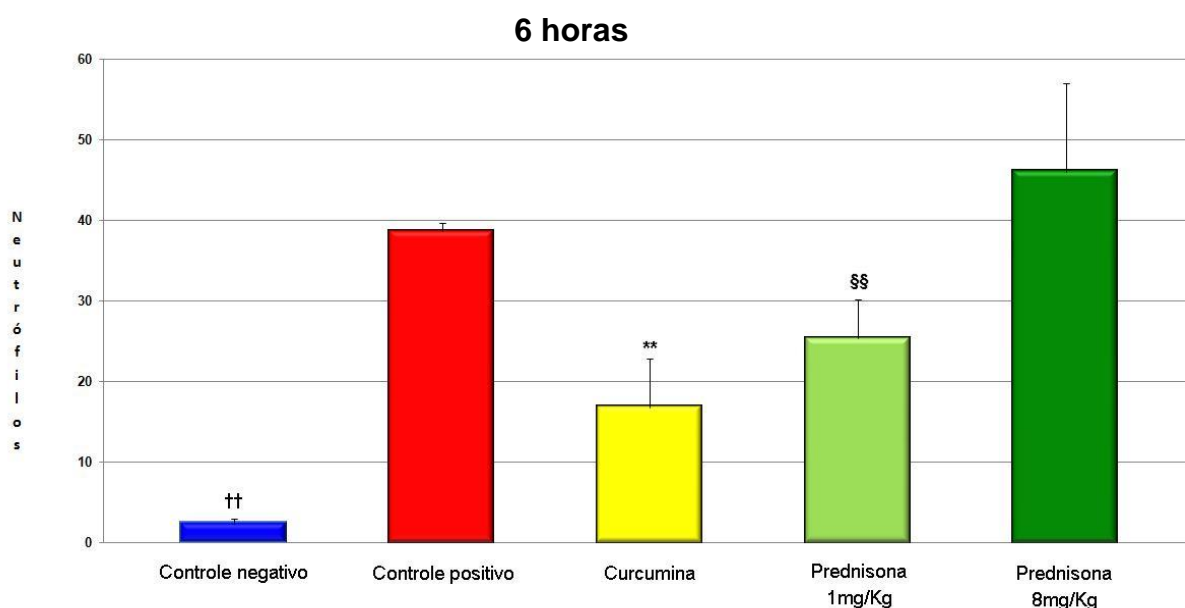
A Tabela 3 mostra a média, com o respectivo erro padrão do número de neutrófilos contados por morfometria computadorizada após 6, 12, 24 e 48 horas nos animais submetidos a intervenção com curcumina e prednisona e nos animais dos grupos controles positivo e negativo

**Tabela 3.** Média do número de neutrófilos contados por morfometria computadorizada após 6, 12, 24 e 48 horas.

<b>Média ± Erro Padrão</b>				
	<b>6 horas</b>	<b>12 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
<b>Controle negativo</b>	2,3±0,6	4,2±0,5	4,3±0,6	4,3±0,6
<b>Controle positivo</b>	38,6±1,0	40,6±1,8	45,0±2,0	59,5±1,0
<b>Curcumina</b>	16,8±6,0	37,2±2,2	47,5±3,5	62,8±3,6
<b>Prednisona 1 mg/kg</b>	25,4±4,8	40,5±4,1	30,0±3,7	61,25±4,2
<b>Prednisona 8 mg/kg</b>	46,0±11,0	45,5±5,9	36,2±3,5	55,75±1,18

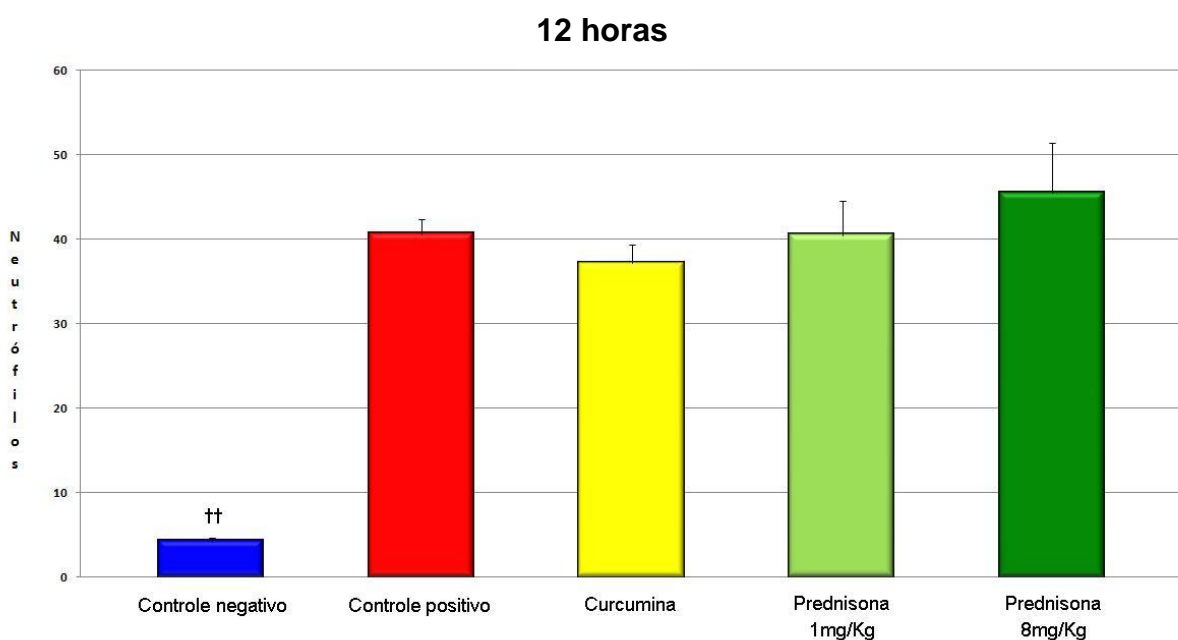
mg/kg = miligramas/quilograma

O Gráfico 9 mostra a contagem dos neutrófilos por campo nos grupos controle (positivo e negativo) e nos grupos experimentos após seis horas da indução de artrite pelo zimosan. Verifica-se que, no grupo controle negativo, a contagem de neutrófilos por campo é baixa. Quando comparado o controle negativo e positivo, observa-se contagem de neutrófilos significativamente menor ( $p < 0,01$ ). Quando compara-se a curcumina e a prednisona (1 mg/kg) com o controle positivo, observam-se números de neutrófilos significativamente menores ( $p < 0,01$ ).



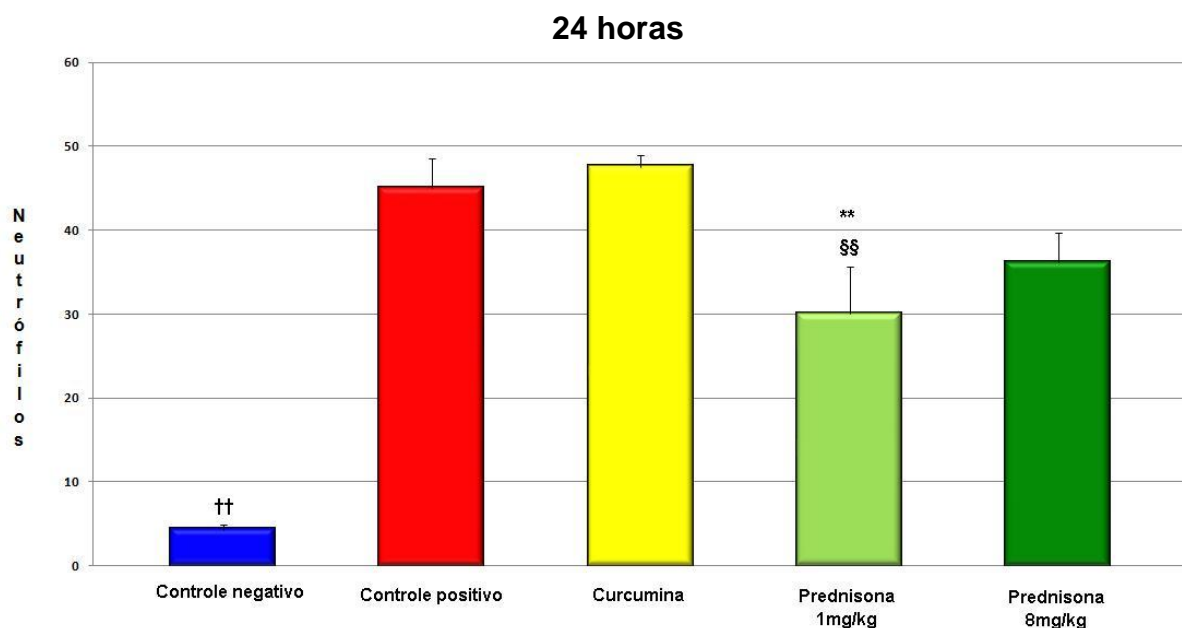
**Gráfico 9** – Comparação entre o grupo controle (negativo e positivo) e o grupo experimento após 6 horas da indução da artrite. ††  $p < 0,01$  (controle positivo x controle negativo); \*\* $p < 0,01$  (controle positivo e curcumina); §§  $p < 0,01$  (controle positivo e prednisona 1 mg/kg)

O Gráfico 10 mostra a contagem dos neutrófilos por campo nos grupos controle positivo e negativo) e nos grupos experimento após 12 horas da indução de artrite pelo zimosan. Verifica-se que, no grupo controle negativo, a contagem de neutrófilos por campo é baixa. Quando comparados o controle negativo e positivo, observa-se contagem de neutrófilos significativamente menor ( $p < 0,01$ ). Nos demais grupos, não houve diferença significativa na contagem dos neutrófilos por campo.



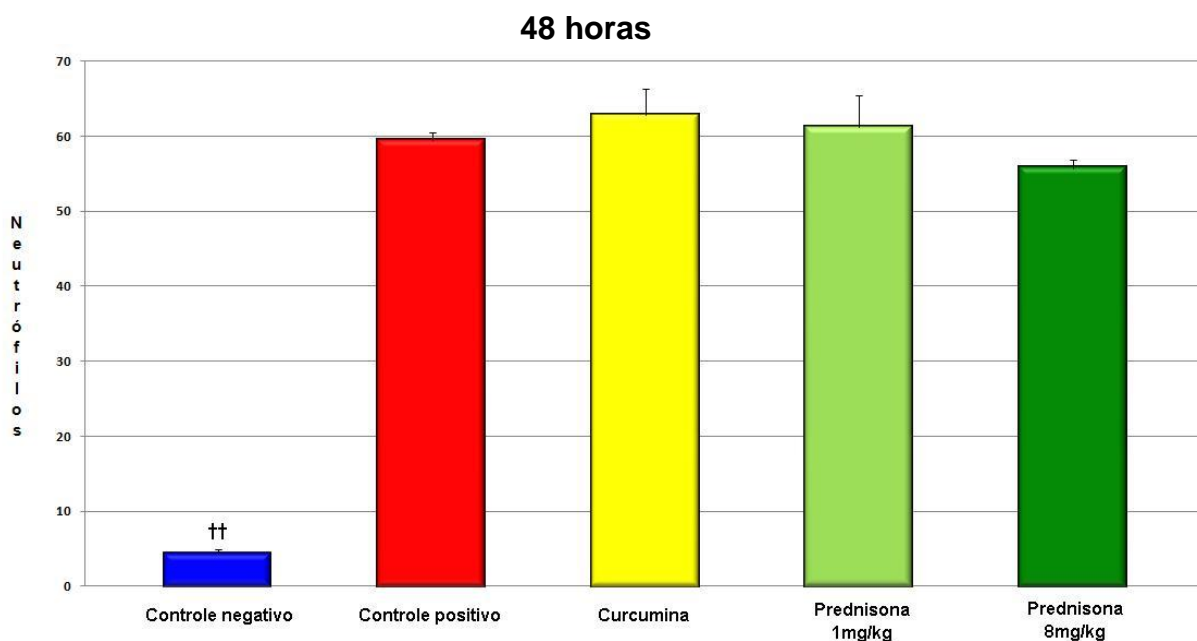
**Gráfico 10** – Comparação entre o grupo controle (negativo e positivo) e o grupo experimento após 12 horas da indução da artrite. ††  $p < 0,01$  (controle positivo x controle negativo)

O Gráfico 11 mostra a contagem dos neutrófilos por campo nos grupos controle (positivo e negativo) e nos grupos experimento após 24 horas da indução de artrite pelo zimosan. Verifica-se que, no grupo controle negativo, a contagem de neutrófilos por campo, é baixa. Quando comparados o controle negativo e positivo, observa-se contagem de neutrófilos significativamente menor ( $p < 0,01$ ). Quando compara-se a prednisona (1 mg/kg) com o controle positivo e a curcumina, observam-se números de neutrófilos significativamente menores ( $p < 0,01$ ).



**Gráfico 11** – Comparação entre o grupo controle (negativo e positivo) e o grupo experimento após 24 horas da indução da artrite. ††  $p < 0,01$  (controle positivo x controle negativo); \*\* $p < 0,01$  (controle positivo e prednisona 1 mg/kg); §§  $p < 0,01$  (curcumina e prednisona 1 mg/kg)

O Gráfico 12 mostra a contagem dos neutrófilos por campo nos grupos controle (positivo e negativo) e nos grupos experimento após 48 horas da indução de artrite pelo zimosan. Verifica-se que, no grupo controle negativo, a contagem de neutrófilos por campo, é baixa. Quando comparados o controle negativo e positivo, observa-se contagem de neutrófilos significativamente menor ( $p < 0,01$ ). Nos demais grupos, não houve diferença significativa na contagem de neutrófilos por campo.



**Gráfico 12** – Comparação entre o grupo controle (negativo e positivo) e o grupo experimento após 48 horas da indução da artrite. ††  $p < 0,01$  (controle positivo x controle negativo)



## 5. DISCUSSÃO

A artrite, e em especial a artrite reumatoide, é uma doença inflamatória articular que ocorre predominantemente na mulher (70%) (Golding, 2001). Embora nos últimos anos tenha-se avançado muito na compreensão da patogênese da doença, muitos dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos ainda não estão totalmente esclarecidos (Da Silva e Da Rocha, 2006). O fato da artrite não surgir espontaneamente em animais de laboratório dificulta a elucidação dos mecanismos imunológicos que desencadeiam e mantêm o processo inflamatório na membrana sinovial e nas cartilagens articulares de seres humanos (Brahan, 1991; Ramos, 2000).

Os diferentes modelos experimentais de artrite desenvolvidos têm fornecido informações úteis para explicar os mecanismos pelos quais a lesão intra-articular se desenvolve e, em particular, para avaliar a ação de substâncias capazes de reduzir o processo inflamatório (Paiva, 2010). Nesses modelos, torna-se possível avaliar vários parâmetros da resposta inflamatória articular, tais como: resposta flogística inicial, impotência funcional da articulação afetada, alterações macroscópicas e microscópicas, estudo bioquímico do líquido sinovial, assim como da própria membrana sinovial, avaliação do grau de destruição da cartilagem articular e do osso subcondral (Ramos, 2000). Para serem considerados ideais, os modelos de artrite, devem, dentro do possível, oferecer informações específicas com relação aos aspectos histopatológicos, bioquímicos, biomoleculares e autoimunes (Morais, 2008).

O modelo experimental de artrite deve induzir alterações clínicas, histológicas, bioquímicas e radiológicas semelhantes à artrite humana e, se possível, não desencadear manifestações sistêmicas. O modelo ideal deve ter custo acessível e ser reproduzível em animais de pequeno porte que sejam facilmente manuseados e disponíveis. Deve, ainda, induzir o aparecimento de inflamação articular em curto prazo para permitir rápidos protocolos experimentais e possibilitar a avaliação de substâncias para o tratamento da doença (Oliver e Brahan, 1996; Ramos *et al.*, 2001). Apesar das críticas em relação ao uso de roedores, particularmente ratos e camundongos, como modelos de artrite, estes animais de experimentação ainda são os mais utilizados por permitirem a reprodução das alterações etiopatogênicas, macroscópicas e

microscópicas da artrite humana, além de possibilitarem testar inúmeros agentes indutores da doença, bem como substâncias com potencial efeito terapêutico (Brahan, 1991). Por todos estes arrazoados motivos, optamos por utilizar o rato como animal de experimentação neste estudo.

Revisando a literatura, verifica-se que muitos modelos experimentais foram descritos no intuito de induzir artrite em animais e tentar reproduzir os achados da artrite humana. Todavia, nenhum deles satisfaz plenamente todas essas condições, embora todos se aproximem razoavelmente do objetivo pretendido. Dentre os principais modelos experimentais de artrite, a inflamação articular induzida por adjuvante é o mais utilizado, sendo descrito originalmente em 1954 (Stoerk *et al.*, 1954). Consiste na injeção intradérmica de adjuvante complexo de Freund em roedores de linhagem susceptível ao desenvolvimento da doença. O adjuvante complexo de Freund é composto por uma emulsão oleosa em água contendo micobactérias inativadas pela ação do calor, sendo efetivo em potencializar resposta imune, humoral e celular contra imunógenos coadministrados. Esse nome foi adotado em homenagem a Jules Freund (1890-1960), imunologista americana nascida na Hungria e estudiosa do papel de antígenos bacterianos na indução de resposta inflamatória experimental. Entretanto, a principal limitação desse modelo experimental reside no fato de que a artrite só se desenvolve em algumas linhagens susceptíveis de ratos, não induzindo a doença em ratos Wistar, como os disponibilizados para o presente estudo. Do mesmo modo, o modelo não apresenta predileção pelo gênero, não cursa com períodos de remissão e exacerbação, à semelhança do que ocorre no homem (Ramos, 2000). Outra restrição a esse modelo é a impossibilidade da determinação exata do início do processo inflamatório, o que dificulta a avaliação da resposta a substâncias utilizadas para o tratamento da fase aguda da doença, como proposto no presente estudo (Chang *et al.*, 1980). A opção por não adotarmos a artrite induzida por adjuvante deveu-se à impossibilidade de caracterizar o efeito terapêutico e profilático da curcumina na fase aguda da doença.

Outro modelo experimental muito utilizado é a indução da artrite pela exposição do animal a diferentes tipos de antígenos. Esse modelo, também conhecido como

artrite alérgica experimental, foi inicialmente descrito no início da década de sessenta e baseia-se na sensibilização prévia do animal de experimentação a um antígeno, e posterior indução da artrite por infiltração intra-articular da substância antigênica (Dumonde e Glyn, 1962; Fox e Glyn, 1977). Uma série de antígenos foi utilizada para indução da artrite, sendo os mais frequentes a ovalbumina, soroalbumina bovina, albumina humana e haptenos conjugados a proteínas (Cooke *et al.*, 1972; Cooke e Jasin, 1972; Cosden *et al.*, 1971; Kruijsen *et al.*, 1983; Ménard e Demers, 1977). No modelo experimental de artrite induzida por antígenos, o coelho é o animal de experimentação mais utilizado, pois desenvolve alterações inflamatórias articulares mais semelhantes ao homem quando comparado aos ratos. Todavia, a utilização de coelhos torna o experimento oneroso e de difícil manutenção. Ele é um animal onde aspectos imunológicos são menos conhecidos quando comparados a ratos, além de ser mais vulnerável a infecção. Por essas razões evitamos esse modelo experimental.

No final da década de setenta, foi proposta a indução da artrite pela sensibilização de animais de experimentação, particularmente camundongos, com injeção intradérmica de colágeno tipo II, emulsificado em adjuvante incompleto de Freund (Trentham *et al.*, 1978). A proteína funciona como auto-antígeno, permitindo uma reação antígeno-anticorpo contra o colágeno constituinte da cartilagem articular. Estudos posteriores confirmaram que a sensibilização de ratos com colágeno era capaz de desencadear artrite semelhante à observada no homem, que surge a partir do 16º dia da sensibilização e, após algumas semanas, evolui para anquilose articular (Helfgott *et al.*, 1985). Contudo, uma das maiores limitações do modelo de artrite induzida por sensibilização ao colágeno é que apenas algumas linhagens de camundongos susceptíveis ao antígeno maior de histocompatibilidade (MHC) desenvolvem a doença limitando o modelo a disponibilidade dessa linhagem de animais. Além disso, estudo sugere que o colágeno não é uma proteína envolvida na etiopatogenia da doença (Da Silva e Da Rocha, 2006). Como não dispúnhamos de animais suscetíveis ao MHC, também descartamos esse modelo experimental.

A artrite induzida pela sensibilização a imunocomplexos é outro modelo utilizado. No modelo, ratos sem linhagem definida são submetidos à infiltração intra-articular de

um anticorpo (anti-soro-albumina bovina), seguida da injeção sistêmica de soro-albumina bovina. Como a aplicação do antígeno é sistêmica, a administração de uma quantidade maior do antígeno leva a precipitação de imunocomplexos intra-articulares identificados por imunofluorescência na membrana sinovial dos animais (Rocha *et al.*, 1996; Hallas *et al.*, 1997). Uma das principais limitações desse modelo experimental é a impossibilidade de estudar as fases tardias da doença por não haver o desenvolvimento de inflamação mediada por linfomononucleares (Rocha *et al.*, 1997). Em nosso estudo, apesar de pretendermos avaliar apenas a fase aguda da artrite experimental, como não dispúnhamos de microscopia de imunofluorescência optamos por não adotá-lo.

É possível induzir artrite pela infiltração intra-articular de carragenina, interferon, interleucinas e agentes biológicos infecciosos. Todas essas substâncias são capazes de desenvolver alterações inflamatórias articulares com aspectos semelhantes à artrite humana. Estudos em ratos, onde as articulações foram infiltradas com 0,02 ml de carragenina a 1% encontrou alterações histológicas compatíveis com artrite e passíveis de serem avaliadas por morfometria computadorizada (Hansra *et al.*, 2000). Verificaram que existia redução da espessura da cartilagem articular do osso subcondral e trabecular, volume e espessura das células da membrana sinovial.

Outros utilizaram o interferon humano dos subtipos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  para induzir a artrite (Rosenbach *et al.*, 1987). Verificaram que a aplicação de interferon  $\beta$  não foi capaz de induzir o desenvolvimento da artrite nos animais, mas constou aumento do volume articular, da espessura da membrana sinovial, efusão e infiltrado inflamatório na membrana sinovial. Quando utilizaram a hidrocortisona associada ao interferon, houve redução da resposta antiinflamatória sinovial, concluindo que o interferon tem um papel importante na patogênese da artrite humana. A maior limitação desse modelo experimental de artrite é o custo do interferon.

A infiltração intra-articular de IL-1 em joelhos de ratos também ocasiona edema articular, sinovite, degeneração articular e aumento da proliferação de fibroblastos (Hrubey *et al.*, 1991). Esse estudo confirmou que o uso de dexametasona e AINHS, são drogas eficazes para reduzir o edema periarticular, porém nem todos os AINHS testados melhoraram as lesões histológicas. O resultado sugere que vários aspectos das

modificações articulares desencadeadas pelo modelo de artrite induzida por IL-1 possam ser mediados por prostaglandinas. A utilização de anticorpos anti IL-1 foi capaz de diminuir o processo inflamatório sinovial nesses animais.

A cultura de células sinoviais conjuntamente com cepas de *Chlamydia trachomatis*, posteriormente transferidas para a articulação do joelho de ratos, também é capaz de induzir o desenvolvimento de artrite aguda caracterizada por intensa sinovite primária neutrofílica, rápida degeneração articular e disseminação sistêmica do agente no fígado e baço, além da presença de bactérias viáveis no interior da articulação (Inman e Chiu, 1998). Na fase tardia da inflamação ocorre infiltração de mononucleares, displasia cartilaginosa com áreas de reparo e ausência de cepas viáveis. O modelo é capaz de induzir sinovite intensa pelo uso da bactéria intra-articular e demonstra que a inflamação crônica persistente independe da presença do agente bacteriana sugerindo que a membrana sinovial possa se tornar um reservatório de antígenos que perpetuam o processo inflamatório.

Cabe lembrar que, com o avanço das técnicas de engenharia genética, a manipulação de genes criando animais silenciados (transgênicos), além de induzir o desenvolvimento da doença, possibilita a avaliação do papel representado individualmente por cada um desses gene na etiopatogenia de doença. Como exemplo dessa estratégia, estudo recente demonstrou que uma mutação pontual em um único gene, chamado ZAP70, pode desencadear artrite crônica autoimune espontânea em uma cepa de camundongos (Sakagushi *et al.*, 2003). Outro exemplo utiliza ratos com imunodeficiência combinada severa, capazes de tolerar enxertos humanos transplantados (Vladutiu, 1993). O alto custo dessa linhagem de animais e dificuldades na aquisição e importação impossibilitou sua utilização no presente estudo.

O modelo de artrite induzida pela infiltração intra-articular de zimosan vem sendo mais utilizado em estudos experimentais, principalmente no Brasil (Silva e Da Rocha, 2006; Paiva, 2010). Originalmente, o modelo experimental de artrite induzida por zimosan foi descrito por Keystone (1977). Na metade da década de 90 confirmou-se que a administração de zimosan na articulação de ratos desencadeava quadro de artrite subaguda semelhante à artrite humana (Gegout *et al.*, 1994). A infiltração intra-

articular de zimosan em joelhos de ratos, camundongos e coelhos produzia sinovite subaguda grave erosiva persistente, com proliferação da sinóvia e degradação da cartilagem articular, mimetizando a maioria dos achados da fase aguda da artrite humana (Keystone *et al.*, 1977; Gadó e Gligler, 1991; Paiva, 2010). O zimosan é um polissacarídeo derivado da parede do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, uma substância indutora de fenômenos flogísticos sistêmicos, largamente empregada em estudos farmacológicos que apresenta a  $\beta$ -glucana como seu principal componente estrutural (Gadó e Gligler, 1991; Keystone *et al.*, 1977; Paiva, 2010). O princípio ativo apresenta reconhecida atividade imunoestimulatória, sendo utilizada para avaliar o efeito dos leucócitos no processo inflamatório. O zimosan é reconhecido por macrófagos e após interagir com receptores “toll like-2” (TLR2) presente na superfície das células, ativa a via do NF- $\kappa$ B e aumenta a produção de citocinas inflamatórias (Paiva, 2010).

O emprego do zimosan em experimentos visando reprodução de artrite ainda é pouco descrito na literatura (Ramos, 2000; Ramos *et al.*, 2001; Cardoso, 2007; Morais, 2008; Paiva, 2010). Esse modelo de artrite experimental tem sido pouco detalhado, principalmente no que diz respeito à cronologia de seus aspectos histológicos. Resultados de diferentes estudos demonstram que fase aguda da artrite induzida por zimosan, com duração de até três dias após a indução, ocorre aumento de permeabilidade vascular, edema e migração de células inflamatórias para o interior da articulação (Ramos, 2000; Ramos *et al.*, 2001; Cardoso, 2007; Morais, 2008; Paiva, 2010). Considerando que o parâmetro de análise histopatológica das alterações induzidas experimentalmente, é um dos mais fiéis, pois traduz as diversas alterações celulares ocorridas ao longo do tempo, tanto na fase aguda quanto na crônica, fornecendo informações passíveis de serem documentadas para comparações e arquivadas em lâminas e em blocos parafinados, optamos por utilizar o modelo neste estudo. A facilidade de obtenção do zimosan e seu custo acessível também foram fatores que influenciaram na escolha.

Quando analisamos a articulação do joelho de ratos não submetidos à infiltração com zimosan (controle negativo), independente do tempo de sacrifício, em nenhum

animal encontraram-se achados histológicos sugestivos de artrite, até o fim do período de tempo considerado para o experimento (48 horas). A membrana sinovial também não apresentava alterações inflamatórias à microscopia, semelhante ao anteriormente descrito (Souza, 2000). A membrana sinovial dos animais do grupo controle era formada por células cuboides, organizadas em uma única camada, justapostas sobre coxim formado por adipócitos, pouco tecido intersticial e raros capilares sanguíneos.

De modo oposto, nas articulações infiltradas com zimosan que não sofreram intervenção (controle positivo), havia infiltrado inflamatório composto, principalmente, por neutrófilos, já evidenciado após seis horas da indução. Recente estudo constatou que o infiltrado inflamatório composto principalmente de polimorfonucleares já era possível ser identificado, três horas após a indução (Paiva, 2010). O mesmo autor constatou que, após a infiltração articular com zimosan, a presença de edema nos tecidos periarticulares começava depois de uma hora da intervenção, crescia exponencialmente após seis horas e atingia seu ponto máximo após 24 horas, mantendo-se elevado até 48 horas (Paiva, 2010). Souza (2000), analisando a celularidade do líquido sinovial em ratos submetidos à artrite induzida por zimosan, em conformidade com nossos resultados, verificou que 6 e 24 horas após a indução ocorriam os dois maiores picos de celularidade no líquido sinovial. Após 24 horas, identificou exuberante infiltrado neutrofilico sobre a membrana sinovial, que se apresentava espessada, com edema congestão vascular e algumas áreas com focos de hemorragia recente. A autora encontrou maior quantidade de células inflamatórias, principalmente poliformonucleares após seis horas da indução, com um segundo pico após 24 horas. Esses achados também foram evidenciados em nosso estudo. Durante todo o período encontramos alterações histológicas que permitiam o diagnóstico de artrite, com escore de graduação inflamatória maior que cinco, mantendo-se elevado ao longo de todo o experimento, não sofrendo variações. Após 48 horas notamos que havia presença e depósitos de material fibrinoide ao longo da membrana sinovial e alguns fibroblastos, sugerindo que teria início uma fase de reparação local. Estudo avaliando a membrana sinovial após 96 horas da indução com zimosan constatou que havia depósito de material fibrinoide sobre a sinovial, atividade degenerativa dos

sinoviócitos, confirmada pelo maior número de mitoses entre essas células e pseudoestratificação dos núcleos dessas células (Souza, 2000). Esses resultados confirmam achados anteriores que demonstrou que a infiltração de zimosan intra-articular induz o desenvolvimento de artrite grave após seis horas de administração, mostrando que o modelo é útil para estudar a fase aguda da artrite.

O tratamento das diferentes formas de artrite, basicamente, tem como principal objetivo a redução do processo inflamatório que se instala nas articulações (Anti *et al.*, 2008). Existem várias drogas que atendem a esse objetivo e dentre elas substâncias que interrompam a série de etapas da cascata inflamatória merecem lugar de destaque. Há décadas o uso de substâncias com ação anti-inflamatória vem sendo a principal opção terapêutica. Os anti-inflamatórios, didaticamente, podem ser divididos em dois grandes grupos. De um lado, os anti-inflamatórios hormonais, representados principalmente pelos corticosteroides e do outro, os anti-inflamatórios não-esteroidais, substâncias com ação anti-inflamatória por bloquearem as cicloxigenases impedindo a síntese de eicosanoides pela via metabólica da cascata do ácido araquidônico (Anti *et al.*, 2008).

Os anti-inflamatórios não-hormonais compreendem um grupo variado de fármacos, que têm em comum a capacidade de combater a inflamação e reduzir a dor. Caracterizam-se por inibir a atividade de subtipos da ciclo oxigenases, impedindo assim a síntese de moléculas derivadas dos ácidos graxos (ômega-3 e ômega-6), sintetizados pela via metabólica do ácido araquidônico. Nesse grupo de drogas, as principais famílias derivam dos salicilatos, ácido indolacético, ariloacéticos, ácidos enólicos, derivados arilpropionícos, fenematos e, mais recentemente, substâncias com atividade seletiva para inibição da cicloxigenase-2, representados pelos derivados coxibes. Estudos experimentais compararam os efeitos benéficos dessas substâncias em modelos experimentais de artrite, demonstrando redução da atividade inflamatória intra-articular (Sofia *et al.*, 1975). Estudo experimental avaliando os efeitos do diclofenaco de sódio em doses de 25 mg/kg, 50 mg/kg e 75 mg/kg verificou que a redução do infiltrado neutrofílico era dose-dependente (Paiva, 2010). Apesar de serem substâncias eficazes e universalmente utilizadas nas formas leves de artrite e moderadas, essa classe de



medicamentos apresenta, como restrições, grande incidência de reações colaterais, principalmente representadas pelos distúrbios digestivos (lesões agudas da mucosa gástrica, úlcera péptica e hemorragias digestivas), reações anafiláticas graves, insuficiência renal, alteração da adesividade plaquetária, diáteses hemorrágicas e infarto do miocárdio (Baker e Ferguson, 2005).

Os corticosteroides representam, junto com os imunossuppressores e os recentes inibidores biológicos do TNF- $\alpha$  (infiximabe, adalimumabe), as principais drogas utilizadas para o tratamento das formas graves de artrite. Os glicocorticoides são hormônios produzidos e secretados pela região cortical das glândulas suprenais e, estão envolvidos em diversas funções fisiológicas e na adaptação a situações de estresse (Anti *et al.*, 2008). O cortisol ou hidrocortisona é o principal glicocorticoide circulante produzido pelo homem. Sua síntese é regulada pelo hormônio hipofisário adrenocorticotrófico (ACTH), liberado em resposta ao estímulo do neuropeptídeo denominado fator liberador de corticotrofina, produzido no hipotálamo. Tanto o cortisol quanto os seus análogos sintéticos são bem absorvidos pelo trato gastrointestinal, sendo seu uso intra-articular realizado com frequência por reumatologistas e ortopedistas quando outras ações sistêmicas desses fármacos não são desejadas.

Quando administrados com intuito de obter ação anti-inflamatória e/ou imunossupressora, em última análise, pretende-se incrementar seus mecanismos de ação fisiológicos. O hormônio, cruzando a membrana citoplasmática da célula-alvo por difusão passiva, liga-se no citoplasma a receptores protéicos específicos, que são proteínas citoplasmáticas com estrutura contendo domínios comuns a outros membros da superfamília de receptores nucleares (Wright *et al.*, 1993). Atuam como fatores de transcrição, alterando a expressão dos genes alvo em resposta a um sinal hormonal específico (De Kloet *et al.*, 1993). O complexo formado com o receptor sofre transformação, tornando-se capaz de penetrar no núcleo da célula, onde se liga a regiões promotoras de genes, induzindo a síntese, não somente de proteínas anti-inflamatórias, mas, também, de proteínas que atuam no metabolismo sistêmico. Os glicocorticoides também atuam como receptores de glicocorticoides que interagem com fatores de transcrição, como o fator nuclear NF-kB, promovendo efeito inibitório de suas

funções. Por essa via, a síntese de citocinas pró-inflamatórias e prostaglandinas são reduzidas (Song, *et al.*, 2005).

A prednisona é um glicocorticoide sintético, normalmente administrado por via oral, que, dependendo da dose utilizada, pode ter efeitos anti-inflamatórios ou, até mesmo imunossupressores. A droga é metabolizada pelo fígado e transformada em prednisolona, substância esteroide com ação indutora ou repressora de genes relacionados ao processo inflamatório. Aproximadamente três horas após a sua administração oral, atinge picos plasmáticos elevados, com meia vida biológica de 12 a 36 horas. Estima-se que uma dose de 5 mg de prednisona equivale a 25 mg de cortisona natural. Consideram-se doses antiinflamatórias de prednisona quando não se ultrapassa 0,5 mg/kg/dia e imunossupressoras, doses maiores que 2,0 mg/kg/dia. Da mesma forma como ocorre com os anti-inflamatórios não esteroidais, o uso de glicocorticoides também é associado a reações colaterais digestivas (úlceras pépticas associadas à hemorragia digestiva etc.), cardíacas (ICC), edema, osteoporose, imunossupressão, Síndrome de Cushing.

No presente estudo optamos por utilizar a prednisona, tanto em doses anti-inflamatórias como imunossupressores, para comparar com o potencial terapêutico da curcumina no modelo experimental de artrite, pelo fato da prednisona ser considerada, substância eficaz no tratamento da doença e, pelo fato de que ainda em nossos dias, é a opção medicamentosa mais utilizada para o tratamento da artrite clínica e experimental nas formas mais graves. Do melhor do nosso conhecimento, até a presente data, o uso da prednisona em modelo experimental de artrite induzida por zimosan ainda não tinha sido avaliado. Apenas um estudo comparou a prednisolona com a indometacina no processo inflamatório tecidual ocasionado pela infiltração da substância em tecido de camundongos, mostrando que ambas as drogas são capazes de reduzir o infiltrado neutrofílico avaliado pelos níveis de mieloperoxidase (Oluyomi *et al.*, 1995). Estudo experimental avaliando a ação da dexametasona em modelo experimental de artrite induzida por zimosan verificou que a administração de 4 mg/kg por via intraperitoneal, uma hora antes da indução da artrite, inibiu de forma significativa a incapacidade funcional do membro infiltrado, avaliado pelo tempo de resposta ao

estímulo da pata, com melhora de quase 80% em relação ao grupo controle. Da mesma forma o corticoide reduziu a formação de edema em 52% e o influxo de células inflamatórias entre 71% e 79% (Morais, 2008).

Neste estudo, utilizamos a administração oral de prednisona em duas concentrações, uma anti-inflamatória e outra imunossupressora. Verificamos que ambas as doses, após seis horas da indução da artrite, reduziam o escore inflamatório em relação ao grupo controle. A redução do escore inflamatório da prednisona utilizada em dose imunossupressora era maior quando comparada a dosagem anti-inflamatória. Após 12 horas de indução da artrite, apesar do escore inflamatório ser menor que o encontrado nos animais do grupo controle positivo, em ambas as concentrações utilizadas esses valores não foram significantes. É possível que a significância não tenha sido atingida em virtude do número de animais estudados em cada uma das doses utilizadas, pelos níveis de erro padrão encontrados. Esses mesmos resultados foram encontrados após 24 horas. Todavia, após 48 horas, ambas as concentrações foram capazes de reduzir o escore inflamatório, diminuindo o infiltrado neutrofílico em relação ao controle. Esses resultados sugerem que, apesar da artrite induzida por zimosan apresentar grande reatividade inflamatória, a prednisona age de forma precoce, diminuindo a sinovite e, em longo prazo, independente da concentração utilizada.

Com o objetivo de se encontrar substâncias naturais que apresentem atividade anti-inflamatória no tratamento da artrite, e que apresentem poucos efeitos colaterais, a eficácia de uma série de substâncias naturais vem sendo cada vez mais testadas em modelos experimentais de artrite (Aggarwal *et al.*, 2004; Aggarwal *et al.*, 2007; Banerjee *et al.*, 2003; Banji *et al.*, 2011; Funk *et al.*, 2006a; Funk *et al.*, 2010; Jancinová *et al.*, 2010; Joe *et al.*, 1997; Moon *et al.*, 2010; Mun *et al.*, 2009; Narendhirakannan e Limmy, 2012; Paiva, 2010; Patro *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2011; Taty Anna *et al.*, 2011).

Cardoso (2007) avaliou o efeito anti-inflamatório, antioxidante e as alterações histopatológicas na membrana e cartilagem sinovial, de frações da fucoïdãna (*Fucus vesiculosos*) em modelo experimental de artrite induzida por zimosan. Sacrificou os animais seis horas após indução da artrite e aplicação das substâncias testadas.

Constatou que as frações F1 e F2 obtidas da substância natural e administradas de forma terapêutica inibiram significativamente todos os parâmetros estudados, sugerindo potencial terapêutico da substância na artrite.

Paiva (2010) estudou os efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e os aspectos histopatológicos de uma fração polissacarídica da alga *Lobophora variegata* (Lamouroux) na artrite de joelho induzida por zimosan. O autor comparou o polissacarídeo natural com doses crescentes de diclofenaco. Constatou que a fração F1 da substância, uma heterofucana, apresenta atividade antioxidante, inibidora da produção de RLO, como o superóxido e hidroxila. A fração F1 da *Lobophora variegata*, reduziu a artrite induzida por zimosan com efeito significativo na redução de parâmetros inflamatórios, como edema migração de células inflamatórias, níveis de óxido nítrico articular e concentração de TNF- $\alpha$  sérico. Verificou, assim como identificamos no grupo de animais submetidos à intervenção com curcumina, que os efeitos anti-inflamatórios são mais intensos nas primeiras seis horas após a indução da artrite. Constatou ainda, que a F1 da substância apresenta efeitos anti-inflamatórios semelhantes aos do diclofenaco de sódio na fase aguda da artrite.

Dentre essas substâncias, a curcumina, derivado da raiz da planta *Curcuma longa*, rica em diferuloilmetano, vem se demonstrando um dos princípios ativos naturais mais promissores (Aggarwal *et al.*, 2007, Taty Anna *et al.*, 2011). Seu uso para o tratamento de diversas doenças inflamatórias, incluindo a artrite, já vem sendo descrito há milhares de anos pela medicina Ayurvédica e medicina chinesa tradicional (Funk *et al.*, 2006b). O princípio ativo da planta foi identificado a mais de dois séculos (Shishodia *et al.*, 2005). A curcumina apresenta um potente efeito imunomodulador da resposta inflamatória, podendo regular a ativação de linfócitos T, linfócitos B, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Estudos recentes demonstraram que a curcumina pode também diminuir a expressão tecidual de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, e inativar o fator de transcrição NF-kB e, em baixas doses, estimular a produção de anticorpos. Esses efeitos parecem confirmar o potencial da curcumina para o tratamento das doenças inflamatórias.

Vários modelos experimentais em animais investigaram os efeitos anti-inflamatórios da curcumina. Os estudos iniciais avaliaram seus efeitos no edema induzido por carragininina no coxim adiposo da pata de ratos induzido, constatando que doses entre 50 e 200 mg/kg foram capazes de reduzir o edema tecidual. Modelos experimentais em camundongos mostraram que a curcumina reduz 50% o edema local numa dose de 48 mg/kg de peso, efeito semelhante a doses similares de cortisona e fenilbutazona, e que, em ratos, doses entre 20-80 mg/kg reduzem o edema e o infiltrado inflamatório. A administração de curcumina também inibe a artrite induzida por formaldeído em ratos na dose de 40 mg/kg, e nessa posologia apresenta desprezíveis índices de formação de úlceras pépticas, quando comparada com a fenilbutazona, se demonstrar qualquer toxicidade aguda com doses de até 2g/kg de peso (Srimal e Dhawan, 1973). Estudo duplo-cego, randomizado e controlado, comparou a administração de curcumina com fenilbutazona. Após administração de 1.200 mg/dia de curcumina, os autores constataram melhora no derrame articular, na rigidez matinal e aumento do tempo de deambulação em portadores de artrite reumatoide grave.

Todavia, poucos estudos avaliaram os efeitos da curcumina nas alterações inflamatórias agudas da cartilagem articular em modelo experimental de artrite (Banerjee *et al.*, 2003; ; Banji *et al.*, 2011; Funk *et al.*, 2006a; Jancinová *et al.*, 2009; Joe *et al.*, 1997; Moon *et al.*, 2010; Mun *et al.*, 2009). Apesar da curcumina vir sendo utilizada há séculos pela medicina indiana como substância antiinflamatória, a avaliação do seu efeito terapêutico na artrite experimental foi pouco estudada (Joe *et al.*, 1997). Em nenhuma oportunidade avaliaram os efeitos da curcumina em modelo de artrite experimental induzida por zimosan ou compararam-se os efeitos da substância com a prednisona, o que torna este estudo pioneiro.

Alguns estudos avaliaram os efeitos da curcumina isolada ou associada a outras medicações com efeitos anti-inflamatórios. Taty Anna *et al* (2011), avaliando doses crescentes de curcumina (30, 60 e 110 mg/ml/kg) associada a glicocorticoide (betametasona na dose de 0,5 mg/ml/kg) aplicadas diariamente por via oral por quatro semanas, em modelo experimental de artrite induzida por colágeno, mostraram que havia melhora significativa do escore inflamatório, escore radiológico e da velocidade de

hemossedimentação nos animais tratados com a dose mais elevada. Entretanto, a crítica principal ao estudo é que não é possível avaliar se o efeito se deve à curcumina isolada ou, mais provavelmente, ao sinergismo entre as duas substâncias.

Ramadan *et al.*(2011) compararam os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes das raízes de curcumina e gengibre, ambas na dose de 200 mg/kg, em modelo experimental de artrite induzida por adjuvante. Constataram que ambos os rizomas eram capazes de reduzir a incidência e a gravidade da artrite por diminuírem e aumentarem citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, respectivamente, e ativarem sistemas de defesa antioxidantes. Quando compararam o extrato da curcumina com o do gengibre e a indometacina, verificaram que a curcumina apresentava efeito anti-artrítico superior às outras substâncias, principalmente quando administrada desde o dia de indução da artrite. Concluem que os resultados encontrados provam que a atividade anti-inflamatória e antioxidante da curcumina é maior que a do gengibre e da indometacina. Seu baixo custo e ausência de efeitos adversos tornam a substância potencialmente eficaz no tratamento da artrite.

Estudos de fase 1 demonstraram que mesmo doses elevadas de curcumina (12 g/dia), apesar de seguras, cursam com pequena disponibilidade sérica (Anand *et al.*, 2007). Como o extrato da *Curcuma longa* não é hidrossolúvel, optamos por dissolvê-la em óleo de milho. Outros autores optaram por dissolver o extrato da planta em óleo de oliva (Taty Anna *et al.*, 2011). Apesar da dissolução se mostrar adequada, é possível que o veículo utilizado tenha também interferido na absorção. Estudo anterior demonstrou que a utilização pura, via oral, do pó do extrato de curcumina comercializado contendo 94% dos três principais curcuminoides é mais potente em prevenir a artrite que a utilização do óleo essencial da substância (Funk *et al.*, 2006a). É possível que a administração da curcumina por via parenteral pudesse apresentar maior disponibilidade, contudo, esse tipo de administração diminui a vantagem do uso da substância em relação às demais opções medicamentosas para o tratamento da artrite. O uso de nanopartículas de curcumina ou da substância envolvida em complexo de fosfolipídios, ou a síntese de substâncias análogas (p. ex. EF-24) parecem ter

resolvido os problemas relacionados à baixa biodisponibilidade por favorecerem a absorção e retardarem o tempo de metabolização (Funk *et al.* 2006a).

Os resultados encontrados neste estudo mostram que a curcumina apresenta atividade anti-inflamatória precoce, pois reduz o processo inflamatório articular nas primeiras seis horas após a indução da artrite, mostrando eficácia terapêutica até mesmo semelhante a doses imunossupressoras de prednisona e superior a doses anti-inflamatórias do glicocorticoide mostrado em nosso trabalho através de avaliação histopatológica e pela morfometria computadorizada. Todavia, após 12 e 24 horas, os efeitos anti-inflamatórios da curcumina tornam-se semelhantes aos da prednisona em ambas as doses, não modificando o escore inflamatório. Esses achados podem estar relacionados aos baixos níveis plasmáticos e teciduais da curcumina em virtude da pequena absorção pelo trato digestivo, rápido metabolismo e eliminação sistêmica (Anand *et al.*, 2007). É possível que a utilização da droga por via parenteral, dissolvida em veículos lipídicos passíveis de administração endovenosa, possa melhorar a atividade da substância nesse período. Após 48 horas da indução da artrite com zimosan, a curcumina tem efeitos anti-inflamatórios significativamente inferiores aos da prednisona.

Não obstante os resultados encontrados neste estudo sugerirem que a curcumina possa ser uma estratégia medicamentosa útil para o tratamento da fase aguda da artrite, novas pesquisas devem ser realizadas com o intuito de melhorar a eficácia da substância. Pesquisas comparando concentrações crescentes da droga, por diferentes vias de administração e, principalmente, melhorando sua biodisponibilidade, ainda são necessárias para viabilizar o uso da curcumina.

## **6. CONCLUSÃO**

- 1.** A infiltração intra-articular de zimosan é capaz desenvolver artrite grave nos joelhos de ratos após seis horas da aplicação, mostrando-se um modelo experimental válido para o estudo da artrite;
- 2.** A intervenção por via oral com curcumina em veículo oleoso é capaz de reduzir a intensidade da artrite em joelhos de ratos infiltrados com zimosan apenas nas primeiras seis horas, tanto na avaliação histopatológica quanto na morfometria computadorizada;
- 3.** A intervenção por via oral com curcumina em veículo oleoso é capaz de reduzir a intensidade da artrite em joelhos de ratos infiltrados com zimosan de forma semelhante a doses imunossupressoras de prednisona nas primeiras seis horas;
- 4.** A intervenção com curcumina não modifica a intensidade da artrite em joelhos de ratos infiltrados com zimosan após 12, 24 e 48 horas da indução;
- 5.** Doses anti-inflamatórias e imunossupressoras de prednisona reduzem a intensidade da artrite em joelhos de ratos infiltrados com zimosan após 48 horas de indução.



## 7. REFERÊNCIAS

- Abramson, S. B.; Attur, M.; Amin, A.R.; Clancy, R. Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. **Curr Rheumatol Rep**, 3(6):535-41, 2001.
- Agarwal, S.; Deschner, J.; Long P.; Verma, A.; Hofman, C.; Evans, C. H.; Piesco N. Role of NF-kappa B transcription factors in antiinflammatory and proinflammatory actions of mechanical signals. **Arthritis Rheum**, 2004.
- Aggarwal, B. B.; Kumar, A.; Aggarwal, M. S.; Shishodia, S. Curcumin derived from turmeric (*curcuma longa*): a spice for all seasons. In: Bagchi D, Preus HG, ed. **Phytopharmaceuticals in câncer chemoprevention**, Boca Raton (FL): CRC Press; p. 349–87, 2004.
- Aggarwal, B. B., Sundaram, C, Malani, N, Ichikawa, H. Curcumin: the Indian solid gold. **Adv Exp Med Biol**, 595:1-75, 2007.
- Almeida, L. P. **Caracterização de pigmentos da *Curcuma longa* L. Avaliação da atividade antimicrobiana, morfogênese *in vitro* na produção de curcuminóides e óleos essenciais**. Tese (Doutorado. Em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia) Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006.
- Anand, P.; Kunnumakkara, A. B.; Newman, R. A.; Aggarwal B.B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Mol Pharm**, 4(6):807-18, 2007.
- Anti, S. M. A.; Giorgi, R. D. N.; Chahade, W. H.; Anti-inflamatórios hormonais: glicocorticóides. **Eistein**, 6 (Supl.1):S159-65, 2008.
- Arora, R. B.; Kapoor, V.; Basu, N.; Jain, A. P. Anti-inflammatory studies on *Curcuma longa* (turmeric). **Indian J Med Res**, 59(8):1289-95, 1971.
- Arden, N.; Nevitt, M. C. Osteoarthritis: Epidemiology. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, 20(1):3-25, 2006.
- Avalos, I.; Chung, C. P.; Oeser, A.; Milne, G. L.; Morrow ,J. D.; Gebretsadik, T.; Shintani, A.; Yu, C.; Stein, C. M.; Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to disease activity and symptoms. **Lupus**, 16:195-200, 2007.
- Baker, C. L. JR.; Ferguson, C. M. Future treatment of osteoarthritis. **Orthopedics**, 28(2 Suppl):s227-34, 2005.
- Banerjee, M, Tripathi, L. M.; Srivastava, V. M.; Puri A.; Shukla, R. Modulation of inflammatory mediators by ibuprofen and curcumin treatment during chronic inflammation in rat. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 25(2):213-24, 2003.

Banji, D.; Pinnapureddy, J.; Banji, O. J.; Saidulu, A.; Hayath, M. S. Synergistic activity of curcumin with methotrexate in ameliorating Freund's Complete Adjuvant induced arthritis with reduced hepatotoxicity in experimental animals. **Eur J Pharmacol**, 668(1-2):293-8, 2011.

Barry, Halliwell J. G. **Free radicals in biology and medicine**, 4th ed. New York: Oxford University Press, 2007.

Bezerra, M.M., Brain, S. D.; Greenacre, S.; Jerônimo, S. M. B.; de Melo, L. B.; Keeble, J., Rocha, F. A. C. R. Reactive nitrogen species scavenging rather than nitric oxide inhibition protects from articular cartilage damage in rat zymosan – induced arthritis. **B J Pharmacol**, 141:172-82, 2004.

Brahan, E. Animal models of reumathoids arthritis: clues to etiology and treatment. **Clin Orthop**, 265:42-53, 1991.

Brown G. D.; Gordon S. Immune recognition: a new receptor for  $\beta$ -glucans. **Nature**, 413(6851):36-7, 2001.

Buhrmann, C.; Mobasher, A.; Matis, U.; Shakibaei, M. Curcumin mediated suppression of nuclear factor-kappaB promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a high-density co-culture microenvironment. **Arthritis Res Ther**, 12:R127, 2010.

Cadenas, E.; Davies, K. J.; Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Rad Biol Med**, 29(3-4):222-30, 2000.

Caltabiano C. **Avaliação dos efeitos antioxidantes do ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) contra o dano oxidativo ao DNA na colite de exclusão. Estudo experimental em ratos.** Dissertação ( em Ciência da Saúde), Universidade São Francisco, Bragança Paulista, São Paulo; 2010.

Cardoso, M. L. **Efeito das frações obtidas da fucoidana de *Fucus vesiculosus* em modelo experimental de artrite induzida por zymosan.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte: 2007.

Chandra, D.; Gupta, S. S. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of volatile oil of *Curcuma longa* (Haldi). **Indian J Med Res**. 1972;60(1):138-42

Chang, Y. H.; Pearson, C. M.; Abe, C. Adjuvant polyarthritis IV: Induction by a synthetic adjuvant: immunologic, histopatologic and others studies. **Arthritis Reuhm**, 23:62-71, 1980.

Chopra, A.; Lavin, P.; Patwardhan, B.; Chitre, D. A 32-week randomized, placebo-controlled clinical evaluation of RA-11, an Ayurvedic drug, on osteoarthritis of the knees. **Clin Rheumatol**, 10(5):236-45, 2004.

Choy, E. H.; Panayi, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**, 344(12):907-16, 2001.

Clutterbuck, A .L.; Mobasheri, A.; Shakibaei, M.; Allaway, D.; Harris, P. Interleukin-1beta-induced extracellular matrix degradation and glycosaminoglycan release is inhibited by curcumin in an explant model of cartilage inflammation. **Ann N Y Acad Sci**, 1171:428-35, 2009.

Cooke, T. D.; Hurd. E. R.; Ziff, M.; Jasin H.E. The pathogenesis of chronic inflammation in experimental antigen-induced arthritis: II preferential localization of antigen-antibody complexes to cartilaginous tissues. **J Exp Med**, 135:323-38, 1972.

Cooke, T. D.; Jasin, H. E. The pathogenesis of chronic inflammation in experimental antigen-induced arthritis: the role of antigen on the local immune response. **Arthritis Rheum**, 15:327-37, 1972.

Cosden, R.; Doble, A.; Glyn, L. E.; Nind, A. P. Production of a chronic arthritis with ovalbumin; its retention in rabbit knee joint. **Ann Reum Dis**, 30:307-15, 1971.

Csaki, C.; Mobasheri, A.; Shakibaei, M. Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1beta-induced NF-kappaB-mediated inflammation and apoptosis. **Arthritis Res Ther**, 11(6):R165, 2009.

Da Silva, F. S.; Da Rocha, F. A. Zymosan induced arthritis in rats--mechanisms involved in hypernociception and cartilage lyses. **Acta Reumatol Port**, 31(2):143-9, 2006.

Deberg, M.; Labasse, A.; Christgau, S.; Cloos, P.; Bang, Henriksen, D.; Chape, E. J. P.; Zegels, B.; Reginster, J. Y.; Henrotin, Y. New serum biochemical markers (Coll 2-1 and Coll 2-1 NO2) for studying oxidative-related type II collagen network degradation in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, 13(3):258-65, 2005.

De Kloet, E. R.; Sutanto, W.; van den Berg, D. T. W. M.; Carey, M. P.; van Haarst, A. D.; Hornsby, C. D.; Meijer, O. C.; Rots, N. Y.; Oitzl, M. S. Brain mineralocorticoid receptor diversity: functional implications. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 47(1-6):183-90, 1993.

Del Carlo, M. Jr.; Loeser, R. F., Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. **Arthritis Rheum**, 46(2):394-403, 2002.

Deodhar, S. D.; Sethi, R.; Srimal, R. C. Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane). **Indian J Med Res** , 71:632-634, 1980.

Dibonaventura, M.; Gupta, S.; McDonald, M.; Sadosky, A. Evaluating the health and economic impact of osteoarthritis pain in the workforce: results from the National Health and Wellness Survey. **BMC Musculoskelet Disord**, 12:83, 2011.

Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, 82:47-95, 2002.

Dudda, M.; Kim, Y. J.; Zhang, Y.; Nevitt, M. C.; Xu, L.; Niu, J.; Goggins, J.; Doherty, M.; Felson, D. T. Morphologic differences between the hips of Chinese women and white women: could they account for the ethnic difference in the prevalence of hip osteoarthritis? **Arthritis Rheum**, 63(10):2992-9, 2011.

Dumonde, D. C.; Glyn, L. E. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. **Br J Exp Pathol**, 43:373-82, 1962.

Felson, D. T.; Goggins, J.; Niu, J.; Zhang, Y.; Hunter, D. J. The effect of body weight on progression of knee osteoarthritis is dependent on alignment. **Arthritis Rheum**, 50(12):3904-9. 2004.

Felson, D. T.; Lawrence, R. C.; Dieppe, P. A.; Hirsch, R.; Helmick, C. G.; Jordan, J. M.; Kington, R. S.; Lane, N. E.; Nevitt, M. C.; Zhang, Y., Sowers M.; McAlindon T., Spector T.D.; Poole A.R.; Yanovski S.Z.; Ateshian, G.; Sharma, L.; Buckwalter, J. A.; Brandt, K. D.; Fries, J. F. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. **Ann Intern Med**, 133(8):635-46, 2000.

Fermor, B.; Christensen, S. E.; Youn, I.; Cernanec, J. M.; Davies, C. M.; Weinberg, J. B. Oxygen, nitric oxide and articular cartilage. **Eur Cell Mater**, Apr 11;13:56-65, 2007.

Ferreira, A. L. A.; Matsubara, L. S.; Radicais livres: conceitos doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Bras**, 43(1):61-8, 1997.

Filippin, L. I.; Vercelino, R.; Marroni, N. P.; Xavier, R. M. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. **Clin Exp Immunol**, 152(3):415-22, 2008.

Foltz-Gray, D. Alternative treatments for arthritis. **Atlanta: Arthritis Foundation**, p. 231-33, 2005.

Fox, A.; Glyn, L.E. Is persisting antigen responsible for the chronicity of experimental allergic arthritis. **Ann Rheumat Dis**, 36: 34-8, 1977.

Frasnelli, M. E.; Tarussio, D.; Chobaz-Péclat, V.; Busso, M.; So, A. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Res Ther**, 7:R370-R379, 2005.

Fu, Y.; Zheng, Lin J.; Ryerse, J., Chen, A. Curcumin protects the rat liver from CCl<sub>4</sub>-caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation. **Mol Pharmacol**, 73(2):399-409, 2008.

Funk, J. L.; Frye, J. B.; Oyarzo, J. N.; Kuscuoglu, N.; Wilson, J.; McCaffrey, G.; Stafford, G.; Chen, G.; Lantz, R. C.; Jolad, S. D.; Sólyom, A. M.; Kiela, P. R.; Timmermann, B. N.; Efficacy and mechanism of action of turmeric supplements in the treatment of experimental arthritis. **Arthritis Rheum**, 54(11):3452-64, 2006a.

Funk, J. L.; Oyarzo, J. N.; Frye, J. B.; Chen, G.; Lantz, R. C.; Jolad, S. D.; Sólyom, A. M.; Timmermann, B. N. Turmeric extracts containing curcuminoids prevent experimental rheumatoid arthritis. **J Nat Prod**, 69(3):351-5, 2006b.

Gadó, K.; Gligler, G. Zymosan inflammation: a new method suitable for evaluating new antiinflammatory drugs. **Agents Actions**, 32:119-21, 1991.

Gegout, P.; Gillet, P.; Chevrier, D.; Guigamp, C.; Terlain, B.; Netter, P. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life Sci**, 17:321-6, 1994.

Gegout, P.; Gillet, P.; Terlain, B.; Netter, P. Zymosan induced arthritis in rats II. Effects of antiinflammatory drugs. **Life Sci.**, 56: 389-94, 1995.

Golding, D. N. **Reumatologia em medicina de reabilitação**. 1. Ed. São Paulo: Atheneu, 2001. p.161-5.

Grabowski, P. S.; Wright, P. K.; Van, T.; Hof, R. J.; Helfrich, M. H.; Oshima, H.; Ralston, S. H. Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Br. J. Rheumatol**, 36(6):651-5, 1997.

Gregersen, P. K.; Silver, J.; Winchester, R. J. Genetic susceptibility to rheumatoid arthritis and human leukocyte antigen class II polymorphism. The role of shared conformational determinants. **Am J Med**, 85(6A):17-9, 1988.

Griffiths, H. R. ROS as signalling molecules in T cells - evidence for abnormal redox signalling in the autoimmune disease, rheumatoid arthritis. **Redox Rep**, 10:273-80, 2005.

Guilak, F.; Fermor, B.; Keefe, F. J.; Kraus, V. B.; Olson, S. A.; Pisetsky, D. S.; Setton, L.A.; Weinberg, J. B. The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. **Clin Orthop Relat Res**, (423):17-26, 2004.

Gutteridge, J. M.; Halliwell, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Ann N Y Acad Sci**, 899:136-47, 2000.

Hallas, B. Lehman, S.; Bosak, A.; Tierney, S.; Galler, R.; Jacovina, P.; Scandalis, T. A.; Wells, M. Establishment of behavioral parameters for the evaluation of osteopathic treatment principles in a rat model of arthritis. **J Am Osteopha Assoc**, 97(4):207-14, 1997.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. **J Neurochem**, 69(3):1330-1, 1997.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys**, 246(2):501-14, 1986.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. The antioxidants of human extracellular fluids. **Arch Biochem Biophys**, 280(1):1-8, 1990.

Hansra, P.; Moran, E. L.; Fornasier, V. L; Bogoch, E. R. Carrageenan-induced arthritis in the rat. **Inflammation**, 24(2): 145-55, 2000.

Harvey, W. F.; Niu, J.; Zhang, Y.; McCree, P. I.; Felson, D. T.; Nevitt, M.; Xu, L.; Aliabadi P.; Hunter D.J. Knee alignment differences between Chinese and Caucasian subjects without osteoarthritis. **Ann Rheum Dis**, 67(11):1524-8, 2008.

Helfgott, S.M; Dynesius-Trentham, R; Brahn, E; Trentham, D. E. An arthritogenic lymphokine in the rat. **J Exp Med**, 162(5):1531-45, 1985.

Henrotin, Y. E.; Bruckner, P.; Pujol, J. P. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. **Osteoarthritis Cartilage**, 11(10):747-55, 2003.

Henrotin, Y.; Clutterbuck, A. L.; Allaway, D.; Lodwig, E. M.; Harris, P.; Mathy-Hartert, M.; Shakibaei, M.; Mobasheri, A. Biological actions of curcumin on articular chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage**, 18:141–149, 2010.

Hitchon, C. A.; El-Gabalawy, H. S. Oxidation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, 6:265–78, 2004.

Hrubey, P. S.; Harvey, A. K.; Bendele, A. M.; Chandrasekhar, S. Effects of anti-arthritic drugs on IL-1 induced inflammation in rats. **Agents Actions**, 34(1-2):56-9 1991.

Inman, R. D.; Chiu, B. Synoviocyte-packaged Chlamydia trachomatis induces a chronic aseptic arthritis. **J Clin Invest**, 102(10):1776-82, 1998.

Isler, P.; Vey, E.; Zhang, J. H.; Dayer, J. M. Cell surface glycoproteins expressed on activated human T cells induce production of interleukin-1 beta by monocytic cells: a possible role of CD69. **Eur Cytokine Netw**, 4(1):15-23, 1993.

Jakobsson, U.; Hallberg, I. R. Quality of life among older adults with osteoarthritis: an explorative study. **J Gerontol Nurs**, 32(8):51-60, 2006.

Jansson, L.; Holmdahl, R. Enhancement of collagen-induced arthritis in female mice by estrogen receptor blockage. **Arthritis Rheum**, 44(9):2168-75, 2001.

Jancinová, V; Perecko, T; Nosál, R; Kostálová, D; Bauerová, K; Drábiková, K. Decreased activity of neutrophils in the presence of diferuloylmethane (curcumin) involves protein kinase C inhibition. **Eur J Pharmacol**, Jun10;612(1-3):161-6, 2009.

Jancinova, V; Nosal, R; Lojek, A; Ciz, M; Ambrozova, G; Mihalova, D; Bauerova, K; Harmatha, J; Perecko, T. Formation of reactive oxygen and nitrogen species in the presence of pinosylvin - an analogue of resveratrol. **Neuro Endocrinol Lett**, 31 Suppl 2:79-83, 2010.

Joe, B.; Rao, U.J.; Lokesh, B.R. Presence of an acidic glycoprotein in the serum of arthritic rats: modulation by capsaicin and curcumin. **Mol Cell Biochem**, Apr;169(1-2):125-34, 1997.

Jones, D. P. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. **Chem Biol Interact**, 163(1-2):38-53, 2006.

Jurenka, J. S. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: A review of pre-clinical and clinical research. **Altern Med Rev**, 14(2):277, 2009.

Keystone, E. C.; Schorlemmer, H. U.; Pope, C.; Allison, A. C. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis Rheum**, 20:1397-1401, 1977.

Khalifé, S.; Zafarullah, M. Molecular targets of natural health products in arthritis. **Arthritis Res Ther**, 13(1):102, 2011.

Khanna, D.; Sethi, G.; Ahn, K. S.; Pandey, M. K.; Kunnumakkara, A. B.; Sung, B.; Aggarwal, A.; Aggarwal, B. B. Natural products as a gold mine for arthritis treatment. **Curr Opin Pharmacol**, 7(3):344-51, 2007.

Kotlarz, H.; Gunnarsson, C. L.; Fang, H.; Rizzo, J. A. Osteoarthritis and absenteeism costs: evidence from US National Survey Data. **J Occup Environ Med**, 52(3):263-8, 2010.

Kruijsen, M. W. M.; van der BERG, W. B.; van de PUTTE, L. B. A. Sequential alterations of particular structures in antigen-induced arthritis in mice: histological observation on fibrous capsule, ligaments, bones and muscles, using whole joint sections. **Br J exp Pathol**, 64: 298-305, 1983.

Kulkarni, R. R.; Patki, P. S.; Jog, V. P.; Gandage, S. G.; Patwardhan, B. Treatment of osteoarthritis with a herbomineral formulation: a double-blind, placebo controlled cross-over study. **J Ethnopharmacol**, 33:91-5, 1991.

Kuptniratsaikul, V.; Thanakhumtorn, S.; Chinswangwatanakul, P.; Wattanamongkonsil, L.; Thamlikitkul, V. Efficacy and safety of Curcuma domestica extracts in patients with knee osteoarthritis. **J Altern Complement Med**, 15(8):891-7, 2009.

Lantz, R. C.; Chen, G. J.; Solyom, A. M.; Jolad, S. D.; Timmermann, B. N. The effect of turmeric extracts on inflammatory mediator production. **Phytomedicine**, 12:445-52, 2005.

Larocca, T. S. **Reumatologia: Princípios e prática**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 269-72.

Lawrence, R. C.; Felson, D. T.; Helmick, C. G.; Arnold, L. M.; Choi, H.; Deyo, R. A.; Gabriel, S.; Hirsch, R.; Hochberg, M. C.; Hunder, G. G.; Jordan, J. M.; Katz, J. N.; Kremers, H. M.; Wolfe, F. National Arthritis Data Workgroup. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. **Arthritis Rheum**, 58(1):26-35, 2008.

Lianza, A. S. **Medicina de Reabilitação**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 197-8.

Mahajan, A.; Verma, S.; Tandon, V. Osteoarthritis. **J Ass Physicians India**, 53:634-41, 2005.

Mandal, M. N.; Patlolla, J. M.; Zheng, L.; Agbaga, M. P.; Tran, J. T.; Wicker, L.; Kasus-Jacobi, A.; Elliott, M. H.; Rao, C. V.; Anderson, R. E. Curcumin protects retinal cells from light-and oxidant stress-induced cell death. **Free Radic Biol Med**, 46(5):672-9, 2009.

Marshall, S. W.; Golightly, Y. M. Sports injury and arthritis. **N C Med J**, 68(6):430-3, 2007.

Martinez, C. A. R.; Nonose, R.; Spadari, A. P.; Máximo, F. R.; Priolli, D.G.; Pereira, JÁ; Margarido, N. F. Quantification by computerized morphometry of tissue levels of sulfomucins and sialomucins in diversion colitis in rats. **Acta Cir Bras**, 25(3):231-40, 2010.



May, A.; Cecílio Filho, A. B.; Cavarianni, R. L.; Barbosa, J. C. Desenvolvimento e produtividade da cúrcuma (*Curcuma longa* L.) em função de doses de nitrogênio e potássio. **Rev Bras PI Med**, 7(3):1-7, 2005.

McInnes, I. B.; Schett, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nat Rev Immunol**, 7:429–42, 2007.

Ménard, H. A.; Demers, J. C. Use of hapten-carrier system in experimental immune arthritis in rabbits. **Arthritis Rheum**, 20:1402-8, 1977.

Moon, D. O.; Kim, M. O.; Choi, Y. H.; Park, Y. M.; Kim, G.Y. Curcumin attenuates inflammatory response in IL-1beta-induced human synovial fibroblasts and collagen-induced arthritis in mouse model. **Int Immunopharmacol**, 10(5):605-10, 2010.

Morais, N. C. R. **Efeitos anti-inflamatórios do laser e LED de baixa potência na artrite induzida por zymosan em ratos Wistar**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica), Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, São Paulo, 2008.

Mukhopadhyay, A.; Basu, N.; Ghatak, N.; Gujral, P.K. Anti-inflammatory and irritant activities of curcumin analogues in rats. **Agents Actions**, 12:508–15, 1982.

Mun, S. H.; Kim, H. S.; Kim, J. W.; Ko, N. Y.; Kim, D. O. K.; Lee, B. Y.; Kim, B.; Won, H. S.; Shin, H. S.; Han, J. W.; Lee, H. Y.; Kim, Y. M.; Choi, W. S. Oral administration of curcumin suppresses production of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 to ameliorate collagen-induced arthritis: inhibition of the PKCdelta/JNK/c-Jun pathway. **J Pharmacol Sci**, 111(1):13-21, 2009.

Moynagh, P. N. The NF-kappaB pathway. **J Cell Sci**, 118:4589–92, 2005.

Narendhirakannan, R.T.; Limmy, T. P. Anti-inflammatory and anti-oxidant properties of *Sida rhombifolia* stems and roots in adjuvant induced arthritic rats. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, Apr;34(2):326-36, 2012.

Nonose, R. **Avaliação do padrão de expressão e conteúdo de mucinas na mucosa cólica em modelo experimental de colite de exclusão: Estudo em ratos**. Dissertação (mestrado em ciências da saúde). Universidade São Francisco, Bragança Paulista, São Paulo, 2009.

Nonose, R.; Spadari, A. P. P.; Priolli, D. G.; Máximo, F. R.; Pereira, J. A.; Martinez, C. A. R. Tissue quantification of neutral and acid mucins in the mucosa of the colon with and without fecal stream: Experimental study in rats. **Acta Cir Bras**, 24(4):267-75, 2009.

Okamoto, T. Oxidative stress in rheumatoid arthritis. In: Surh Y-J, Packer L, eds. Oxidative stress, inflammation and health. Califórnia, CA: **Taylor & Francis**, 245–70, 2005.

Okamoto, T.; Sakurada, S.; Yang, J. P.; Merin, J. P. Regulation of NF-kappa B and disease control: identification of a novel serine kinase and thioredoxin as effectors for signal transduction pathway for NF-kappa B activation. **Curr Top Cell Regul**, 35:149–61, 1997.

Oliver, S. J.; Brahn, E. Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective. **J Rheumatol**, 23: 56-60, 1996.

Oluyomi, A. O; Nguyen, H; Towbin, H; Dawson, J; Vosbeck, K. Differential effects of prednisolone and indomethacin on zymosan-induced inflammation in a modified murine tissue-chamber model. **Inflamm Res**, 44(8):350-6, 1995.

Ozkan, Y.; Yardym-Akaydyn, S.; Sepici, A.; Keskin, E.; Sepici, V.; Simsek, B. Oxidative status in rheumatoid arthritis. **Clin Rheumatol** 2007; 26:64-8.

Paiva, A. A. O. **Avaliação de uma fração polissacarídica da alga *Lobophora variegata* (Lamouroux) em modelo de artrite induzida em ratos por zymosan.** [Dissertação]. Natal, Rio Grande do Norte: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2010

Park, C.; Moon, D. O.; Choi, I. W.; Choi, B. T.; Nam, T. J.; Rhu, C. H.; Kwon, T. K.; Lee W.H.; Kim G.Y.; Choi Y.H. Curcumin induces apoptosis and inhibits prostaglandin E(2) production in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. **Int J Mol Med**, Sep;20(3):365-72, 2007.

Patro, N.; Sharma, A.; Kariaya, K.; Patro, I. *Spirulina platensis* protects neurons via suppression of glial activation and peripheral sensitization leading to restoration of motor function in collagen-induced arthritic rats. **Indian J Exp Biol**, 49(10):739-48, 2011.

Petrone, W. F.; English, D. K.; Wong, K.; McCord, J. M. Free-radicals and inflammation: superoxide dependent activation of a neutrophil activating factor in plasma. **Proc Natl Acad Sci USA**, 77:1159-63, 1980.

Priolli DG, Margarido NF, Martinez CAR, Rotta CM, Stephani SM. Edema quantification by computerized morphometry as an evaluation parameter for the resistance of colon anastomoses. **Acta Cir Bras**, v. 18, n. 5, p. 398-406, 2003.

Ramadan G.; AL-Kahtani M.A.; EL-Sayed W.M. Anti-inflammatory and anti-oxidant properties of *Curcuma longa* (turmeric) versus *Zingiber officinale* (ginger) rhizomes in rat adjuvant-induced arthritis. **Inflammation**, Aug;34(4):291-301, 2011.

Ramos A.M.O. **Artrite experimental induzida por zymosan: caracterização citológica, histopatológica e imuno-histoquímica da sinóvia e estudo**

**histoquímico e bioquímico dos glicoconjugados da matriz condróide.** Tese (Doutorado em Patologia),. Escola Paulista de Medicina,São Paulo. 2000, 134 p.

Ramos, A. M. O.; Soares, M. L. M.; da Rocha, L. R. M.; Jerônimo, S. M. B.; da Rocha, F. A. C.; Patrício, F. R. S. Artrite induzida por zymosan em ratos: estudo histopatológico, histoquímico e bioquímico dos glicoconjugados da cartilagem articular. **Rev Bras Reumatol**, 41(4):205-12, 2001.

Rocha, F. A. C.; Andrade, L. E. C.; Jancar S. Immune complex induced arthritis in rats: role of lipid mediatorson cell infiltration. **Med Inflamm**, 5:104-9, 1996.

Rocha, F. A. C.; Andrade, C. E. L.; Russo, M.; Jancar, S. PAF modulates eicosanoidsand TNF releasein imune-complex arthritis in rats. **J Lipid Mediat Cell Signal**, 16(1):1-10, 1997.

Rosenbach, T. O; Zor, U; Moshonov, S; Baratz, M; Yaron, M. Induction of acute synovitis in the rat by human interferon. **Clin Exp Rheumatol**, 5(1):35-40, 1987.

Sakaguchi N.; Takahashi T.; Hata H.; Nomura T.; Tagami T.; Yamazaki, S.; Sakihama, T.; Matsutani, T.; Negishi, I.; Nakatsuru, S.; Sakagushi, S. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP- 70 gene causes autoimmune arthritis in mice. **Nature**, 426 (6965): 454-460, 2003.

Salaffi, F.; Carotti, M.; Stancati, A.; Grassi, W. Health-related quality of life in older adults with symptomatic hip and knee osteoarthritis: a comparison with matched healthy controls. **Aging Clin Exp Res**, 17(4):255-63, 2005.

Salter, R. B. **Distúrbios e lesão do sistema músculoesquelético.** MEDSI 3 ed. São Paulo:, 2001. p. 259-64.

Samuhasaneeto, S.; Thong-Ngam, D.; Kulaputana, O.; Suyasanant, D.; Klaikeaw, N. Curcumin decreased oxidative stress, inhibited NF-kappaB activation, and improved liver pathology in ethanol-induced liver injury in rats. **J Biomed Biotechnol**, 2009:981963, 2009.

Schaller, M.; Burton, D. R.; Ditzel, H. J. Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. **Nat Immunol**, 2: 746-753, 2001.

Schalwijk, J; van den Berg, W. B.; van de Putte, L. B. A.; Joosten, L. A. B.; van der Sluis, M. Effects of experimental joint inflammation on bone marrow and periarticular bone: a study of two types of arthritis, using variables degrees of inflammation. **Br J Exp Pathol**, 66: 435-44, 1985.

Sharma, L.; Lou, C.; Cahue, S.; Dunlop, D. D. The mechanism of the effect of obesity in knee osteoarthritis: the mediating role of malalignment. **Arthritis Rheum**, 43(3):568-75, 2000.

Sharma, L.; Lou, C.; Felson, D. T.; Dunlop, D. D.; Kirwan-Mellis, G.; Hayes, K. W.; Weinrach, D.; Buchanan, T. S. Laxity in healthy and osteoarthritic knees. **Arthritis Rheum**, 42(5):861-70, 1999.

Shehzad, A.; Subhan, F.; Lee, Y. S. New mechanisms and the anti-inflammatory role of curcumin in obesity and obesity-related metabolic diseases. **Eur J. Nutr**, 50(3):151-61, 2011.

Sheridan, A. M.; Fitzpatrick, S.; Wang, C.; Wheeler, D. C.; Lieberthal, W. Lipid peroxidation contributes to hydrogen peroxide induced cytotoxicity in renal epithelial cells. **Kidney Int**, 49(1):88-93, 1996.

Shishodia, S.; Sethi, G.; Aggarwal, B. B. Curcumin: getting back to the roots. **Ann N Y Acad Sci**, 1056:206-17, 2005.

Sofia, R. D; Diamantis, W; Ludwig, B. J. Comparative anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic activities of 7-chloro-3,3a-dihydro-2-methyl-2H,9H-isoxazolo-(3,2-b)(1,3)-benzoxazin-9-one and 5-chlorosalicylic acid in rats. **J Pharm Sci**, Aug;64(8):1321-4, 1975.

Spector, T. D.; Cicuttini, F.; Baker, J.; Loughlin, J.; Hart, D. Genetic influences on osteoarthritis in women: **a twin study BMJ**, 312(7036):940-3, 1996.

Song, I. H.; Gold, R.; Straub, R. H. New glucocorticoids on the horizon: repress, don't active! **J Rheumatol**, 32(6):1199-207, 2005.

Srimal, R. C.; Dhawan, B. N. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal antiinflammatory agent. **J Pharm Pharmacol**, 25:447- 452, 1973.

Stoerk, H. D.; Bielinsk, T. C.; Budzilovich, T. Chronic polyarthritis in rats injected with spleen adjuvants (abstract). **Am J Pathol**, 30:616, 1954.

Strutzenberger, G.; Richter, A.; Schneider, M.; Mundermann, A.; Schwameder, H. Effects of obesity on the biomechanics of stair-walking in children. **Gait Posture**, 34(1):119-25, 2011.

Studer, R. K.; Levicoff, E.; Georgescu, H.; Miller, L.; Jaffurs, D.; Evans, C. Nitric oxide inhibits chondrocyte response to IGF1: inhibition of IGF-1Rbeta tyrosine phosphorylation. **Am J Physiol**, 279:C961-969, 2000.

Taty Anna, K.; Elvy Suhana, M. R.; Faizah, O.; Hamzaini, A. H. Anti-inflammatory effect of *Curcuma longa* (turmeric) on collagen-induced arthritis: an anatomico-radiological study. **Clin Ter**, 162(3):201-7, 2011.

Trentham, D. E; Dynesius, R. A; David, J. R. Passive transfer by cells of type II collagen-induced arthritis in rats. **J Clin Invest**, 62(2):359-66, 1978.

Vladutiu, A. O. The severe combined immunodeficient (SCDI) mouse as a model for study of autoimmune diseases. **Clin Exp Immunol**, 93:1-8, 1993.

Wluka, A. E.; Cicuttini F.M.; Spector T.D. Menopause, oestrogens and arthritis. **Maturitas**, v, 2000.

Yudoh, K.; Nguyen, T.; Nakamura, H.; Hongo-Masuko, K.; Kato, T.; Nishioka, K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. **Arthritis Res Ther**, 7(2):R380-91, 2005.

Zhang, Y.; Hunter, D. J.; Nevitt, M. C.; Xu, L.; Niu, J.; Lui, L. Y.; Yu, W.; Aliabadi, P., Felson, D. T. Association of squatting with increased prevalence of radiographic tibiofemoral knee osteoarthritis: the Beijing Osteoarthritis Study. **Arthritis Rheum**, 50(4):1187-92, 2004.

# **ANEXOS**

## Anexo 1

<b>Identificação do animal</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Identificação do animal</b>	<b>Peso (g)</b>
<b>1</b>	250	<b>17</b>	245
<b>2</b>	255	<b>18</b>	250
<b>3</b>	230	<b>19</b>	245
<b>4</b>	220	<b>20</b>	245
<b>5</b>	260	<b>21</b>	260
<b>6</b>	240	<b>22</b>	260
<b>7</b>	240	<b>23</b>	250
<b>8</b>	250	<b>24</b>	265
<b>9</b>	250	<b>25</b>	250
<b>10</b>	250	<b>26</b>	250
<b>11</b>	260	<b>27</b>	260
<b>12</b>	250	<b>28</b>	250
<b>13</b>	220	<b>29</b>	270
<b>14</b>	245	<b>30</b>	250
<b>15</b>	240	<b>31</b>	270
<b>16</b>	250	<b>32</b>	300

**Peso dos ratos (em gramas)**

## Anexo 2

### CONTAGEM DE NEUTRÓFILOS POR CAMPO

ANIMAL		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	ANIMAL		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>
1	CONTROLE + 6	41	36	17	CONTROLE + 24	50	40
2	CONTROLE - 6	NL		18	CONTROLE - 24	NL	
3	CURCUMINA 6	6	7	19	CURCUMINA 24	72	93
4	CURCUMINA 6	30	24	20	CURCUMINA 24	59	56
5	1-PRED. 6	30	21	21	1-PRED. 24	19	18
6	1-PRED. 6	30	37	22	1-PRED. 24	31	22
7	8-PRED. 6	17	27	23	8-PRED. 24	37	46
8	8-PRED. 6	64	76	24	8-PRED. 24	32	30
9	CONTROLE + 12	37	32	25	CONTROLE + 48	57	56
10	CONTROLE - 12	NL		26	CONTROLE - 48	NL	
11	CURCUMINA 12	44	36	27	CURCUMINA 48	74	69
12	CURCUMINA 12	35	34	28	CURCUMINA 48	58	62
13	1-PRED. 12	43	51	29	1-PRED. 48	68	69
14	1-PRED. 12	45	31	30	1-PRED. 48	56	42
15	8-PRED. 12	42	44	31	8-PRED. 48	56	54
16	8-PRED. 12	66	72	32	8-PRED. 48	59	54



# APÊNDICE

**Comitê de Ética em Pesquisa – CEP**



Bragança Paulista, 22 de Setembro de 2011.

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**Projeto de Pesquisa :** Estudo Experimental em ratos do efeito da curcumina na artrite induzida por zymosan

**ÁREA DE CONHECIMENTO:** Saúde e Biológicas

**Autor(es):** Prof(a). Dr (a). Nilson Nonose  
**Instituição:** UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

**Protocolo:** 003.06.11

Prezado(a)(s) Pesquisador(a)(s),

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou em reunião extraordinária dia **22/09/2011** as **pendências** do projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

**Parecer: APROVADO**

**Carlos Augusto Real Martinez**  
**Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa**  
**Universidade São Francisco**

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825  
CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Arç CEP 13045-270 (19) 3779-3300  
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933  
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036