



**UNISUL**

**UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA**

**ADRIELE CRISTINA ALVES SCHNEIDER**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTIARTRÍTICA DE  
EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DE *Citrus reticulata* (PONKAN) EM  
CAMUNDONGOS**

Tubarão

2014

**ADRIELE CRISTINA ALVES SCHNEIDER**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTIARTRÍTICA DE  
EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DE *Citrus reticulata* (PONKAN) EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Da Saúde – Mestrado, da Universidade do Sul de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Anna Paula Piovezan, Dr<sup>ª</sup>.

Tubarão

2014



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força e coragem que me deu nessa etapa de minha vida, também agradeço a proteção dada por Ele nas intermináveis viagens necessárias para concluir o mestrado.

A professora Dr<sup>a</sup> Anna Paula Piovezan, orientadora, motivadora, amiga, que em todos os momentos me guiava para o caminho certo, me tranquilizando nos momentos de dúvidas e incertezas.

Ao professor Luiz Alberto Kanis, e a todos do laboratório pela ajuda na obtenção do extrato da casca da ponkan.

Aos professores Daniel e Clarissa, e aos estagiários do laboratório de Neurociências Experimental da Unisul, Campus Pedra Branca, pela ajuda com os modelos animais e a aplicação dos testes.

A todos os funcionários e professores que compõem o Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde.

E também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo.

A minha mãe Rosane, uma mulher batalhadora, que sempre me ajuda a encarar todas as dificuldades, sendo meu exemplo de vida, me ensinou a não desistir dos sonhos.

Ao meu filho Gabriel, que foi a força e o motivo para continuar a estudar e a fazer o mestrado, por ser uma criança alegre e sempre me fazer sorrir, desde que nasceu meu mundo se tornou melhor.

Ao meu marido Marcos, pela paciência, força e apoio, espero sempre contar com seu companheirismo.

Agradeço a meus irmãos Andressa, Adriano e Augusto, e a todos os meus familiares pelas palavras de apoio, confiança e força.

A todos muito obrigada!

“Que o seu alimento seja seu medicamento, e seu medicamento seja seu alimento”

(Hipócrates)

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito antinociceptivo de um extrato hidroalcoólico a partir das cascas da fruta *Citrus reticulata* (EBCR), popularmente conhecida como ponkan, em diferentes modelos de nocicepção e em modelo de AR induzido por *Complete Freund's Adjuvant* (CFA). A artrite reumatoide (AR) é uma doença que tem como principal sintoma a dor, os medicamentos utilizados no tratamento levam a diversos efeitos colaterais, sendo importante a busca por medicamentos fitoterápicos com menos efeitos adversos. Os modelos de nocicepção aguda tais como o teste do glutamato, da formalina e da carragenina serviu para uma triagem preliminar da capacidade do extrato de planta em promover ação antinociceptiva, já que a dor é o principal sintoma a ser eliminado durante a AR. Os experimentos foram realizados em camundongos da linhagem Swiss, machos. Antes de cada experimento os animais eram aclimatados por pelo menos uma hora. A nocicepção foi avaliada através do comportamento de lambar a pata e pela alodinia mecânica, avaliada pelo teste de Von Frey (força de dobragem de 0,6g); a medida do edema foi obtida através de micrômetro, sendo os resultados expressos como a diferença entre a espessura da pata traseira direita (em  $\mu\text{m}$ ) antes e após a administração do agente inflamatório. Na análise do teor do flavonoide naringenina, foi encontrado 0,29 mg do flavonoide por grama do extrato, quantidade diferente as encontradas em outros estudos. O extrato nas doses de 10, 100 e 300mg/Kg não causaram efeito sobre a primeira fase da formalina (dor neurogênica), porem apresentou efeito na segunda fase (dor inflamatória). O EBCR não apresentou efeito no teste do glutamato. No modelo de carragenina todas as doses apresentaram efeito nociceptivo, tanto no tratamento profilático como terapêutico. No modelo do CFA a dose de 30mg/Kg foi a que apresentou melhor efeito após uma hora do tratamento. No terceiro dia do CFA foi avaliado a ação dos sistemas opioidérgico e adenosinérgico, seus antagonistas naloxona e cafeína, respectivamente, reverteu a ação do extrato, indicando uma possível ação desses sistemas sobre o EBCR. O efeito antiedematogênico do EBCR só foi visto no tratamento terapêutico no modelo de carragenina. Em conjunto os resultados indicaram uma importante ação antinociceptiva do EBCR, inclusive em modelo de AR.

Palavras-chave: *Citrus reticulata*. Nocicepção. Edema. CFA. Opióide.

## ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the analgesic effect of a hydroalcoholic extract from the barks of the fruit *Citrus reticulata* (EBCR), popularly known as ponkan in different models of nociception and AR model induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA). Rheumatoid arthritis (RA) is a disease whose main symptom was pain, medicines used to treat it can lead on many side effects, for this is important to search for herbal medicines with fewer adverse effects. Models of acute nociception such as testing of glutamate, formalin and carrageenan were used for preliminary screening of the ability of plant extracts to promote antinociceptive, since pain is the main symptom being eliminated during AR. The experiments were performed in male mice of the Swiss strain. Before each experiment the animals were acclimated for at least an hour. Nociception was assessed using the paw licking behavior, and the mechanical allodynia, was assessed by von Frey test (bending force of 0.6 g); measurement of edema was obtained by micrometer, and the results were expressed as the difference between the thickness of the right hind paw (in  $\mu\text{m}$ ) before and after administration of the inflammatory agent. On the analysis of the naringenin flavonoid, was found 0.29 mg per gram of extract, different amount was found in other studies. The extract, at doses of 10, 100 and 300mg/kg, did not show effect on the first phase of formalin (neurogenic pain), however, it was effective in the second phase (inflammatory pain). The EBCR had no effect on the glutamate test. In the carrageenan model all doses had nociceptive effect, both in the prophylactic and therapeutic treatment. In the CFA model 30mg/Kg dose showed the best effect after one hour of treatment. On the third day of the CFA was evaluated the action of opioid systems and adenosinergic, their antagonists naloxone and caffeine, respectively, reversed the action of the extract, indicating a possible effect of these systems on the EBCR. About the antiedematogenic effect was only seen in the therapeutic treatment in the carrageenan model. Together, the results indicated a significant antinociceptive action, including in the AR model.

Key-Words: *Citrus reticulata*. Nociception. Edema. CFA. Opióide.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Critérios classificatórios para AR 2010 ACR/EULAR. ....	09
Figura 2 - Anatomia de uma articulação e células envolvidas na fisiopatologia da artrite. ....	11
Figura 3 - Principais sintomas da artrite e as citocinas envolvidas .....	13
Figura 4-Influência de plantas medicinais sobre múltiplas vias envolvidas no desenvolvimento e progressão da artrite.....	17
Figura 5 - Estrutura química dos principais flavonoides presentes nas cascas do gênero <i>Citrus</i> . .....	19
Figura 6 - Representação anatômica da Via Aferente Nociceptiva.....	22
Figura 7 - Cascas da <i>Citrus reticulata</i> .....	28
Figura 8 - Protocolo utilizado no modelo de formalina.....	30
Figura 9 – Protocolo utilizado no modelo do glutamato.....	30
Figura 10 – Protocolo utilizado no modelo de carragenina. ....	31
Figura 11 – Protocolos utilizados no modelo de CFA. ....	33
Figura 12 – Protocolo utilizado para investigar a contribuição dos sistemas opioidérgico e adenosinérgico no modelo do CFA. ....	34
Figura 13 – Aparência final do EBCR.....	36
Figura 14 - Influência do tratamento prévio dos animais com EBCR sobre a nocicepção e o edema no teste da formalina e em camundongos .....	37
Figura 15 - Influência do tratamento prévio com EBCR no teste do glutamato em camundongos.....	38
Figura 16 - Influência do tratamento profilático (1 h antes do agente inflamatório) dos animais com EBCR sobre a nocicepção e o edema no modelo teste da carragenina em camundongos. .....	39
Figura 17 - Influência do tratamento terapêutico (1 h após administração do agente inflamatório) dos animais com EBCR sobre a nocicepção e o edema no modelo teste da carragenina em camundongos. ....	41
Figura 18 - Influência do EBCR sobre a alodinia mecânica e o edema no modelo de artrite reumatoide induzida por CFA em camundongos. ....	42
Figura 19 - Decurso temporal do efeito do EBCR sobre a alodinia mecânica no modelo de artrite reumatoide induzida por CFA em camundongos.....	44
Figura 20 - Influência dos sistemas opioidérgico e adenosinérgico no efeito do EBCR sobre a alodinia mecânica no modelo de artrite reumatoide induzida por CFA em camundongos.....	44

Figura 21 – Inibição de alguns mediadores inflamatórios pela ação do EBCR .....51

## LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Avaliação da influência do EBCR de <i>Citrus reticulata</i> sobre a atividade locomotora de camundongos. ....	45
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACR – Colégio Americano de Reumatologia, do inglês, *American College of Rheumatology*
- ADAMTS - Desintegrina metaloproteases
- anti-CCP - antipeptídeos citrulinados cíclicos do inglês, *anti-cyclic citrullinated peptide antibody*
- AR – Artrite Reumatoide
- BK – Bradicinina
- CFA – Adjuvante Completo de Freund, do inglês *Complete Freund's Adjuvant*
- COX-2 - Ciclo-oxigenase-2
- DA – Dopamina
- DMARD - modificadores do curso da doença, do inglês, *Disease Modifying Anti-rheumatoid Drugs*
- EBCR - Extrato bruto de *Citrus reticulata*
- EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
- EULAR - Liga Europeia contra o Reumatismo, do inglês, *European League Against Rheumatism*
- IL – Interleucina
- IASP – Associação Internacional de Estudo da Dor, do inglês, *International Association for the Study of Pain*
- LDL – lipoproteína de baixa densidade, do inglês, *Low Density Lipoprotein*
- MMPs - metaloproteinases da matriz
- MPO - Mieloperoxidase
- NA - Noradrenalina
- NG- Naringenina
- NOB - Nobiletina
- ON - óxido nítrico
- proMMP – Pro-metaloproteinase da matrix
- PCR – Proteína-C Reativa
- PGE2 - Prostaglandina E2
- RENAME - Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
- SNC – Sistema Nervoso Central
- TBARS - Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
- TNF – Fator de necrose tumoral, do inglês, *tumor necrosis factor*

VAN – Via Ascendente Nociceptiva

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular, do inglês, *vascular endothelial growth factor*

5-Ht - Serotonina

i.pl. – Intraplantar

i.p. – Intraperitoneal

$t_{1/2abs}$  - meia-vida de absorção

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
1.1 ARTRITE REUMATOIDE - DEFINIÇÃO, EPIDEMIOLOGIA, SINTOMAS E DIAGNÓSTICO.....	7
1.2 FISIOPATOLOGIA DA ARTRITE REUMATOIDE .....	10
1.3 TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE.....	14
1.4 PLANTAS MEDICINAIS COMO RECURSO NO TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE.....	16
1.5 PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS DA <i>Citrus reticulata</i> .....	18
1.6 DOR E NOCICEPÇÃO.....	21
1.7 MODELOS ANIMAIS DE NOCICEPÇÃO .....	23
1.8 MODELO ARTRITE REUMATOIDES INDUZIDA PELO ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA) .....	24
1.9 CONSIDERAÇÕES SOBRE A RELEVÂNCIA DO ESTUDO .....	25
2 OBJETIVO .....	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
3 MÉTODOS.....	28
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	28
3.2 PRODUÇÃO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DE <i>Citrus reticulata</i> (EBCR).....	28
3.3 PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO EM CONTEÚDO DO FLAVONOIDE NARINGENINA .....	29
3.4 ANIMAIS .....	29
3.5 PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EBCR EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO .....	29
<b>3.5.1 Teste da formalina .....</b>	<b>29</b>
<b>3.5.2 Teste do glutamato .....</b>	<b>30</b>
<b>3.5.3 Modelo da carragenina .....</b>	<b>31</b>
3.6 PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIARTRÍTICA DO EBCR.....	32
<b>3.6.1 Modelo do Complete Freund's Adjuvant (CFA).....</b>	<b>32</b>
3.7 AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DOS SISTEMAS OPIOIDÉRGICO E ADENOSINÉRGICO SOBRE OS EFEITOS DO EBCR.....	33
<b>3.7.1. Envolvimento dos sistemas opioidérgico e adenosinérgico no efeito do EBCR.....</b>	<b>33</b>

3.8 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO EBCR SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA .....	34
3.9 DROGAS E REAGENTES .....	34
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4 RESULTADOS .....	36
4.1 PADRONIZAÇÃO DO EBCR EM CONTEÚDO DO FLAVONOIDE NARINGENINA: .....	36
4.2 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EBCR EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO ..	36
<b>4.2.1 Teste da formalina .....</b>	<b>36</b>
<b>4.2.2 Teste do glutamato .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2.3 Modelo da Carragenina .....</b>	<b>39</b>
4.3 PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIARTRÍTICA DO EBCR.....	41
<b>4.3.1 Modelo do Adjuvante Completo de Freund (CFA) .....</b>	<b>42</b>
4.4 AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DOS SISTEMAS OPIOIDÉRGICO E ADENOSINÉRGICO SOBRE OS EFEITOS DO EBCR.....	43
4.5 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO EBCR SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA DE CAMUNDONGOS .....	45
5. DISCUSSÃO .....	46
6. CONCLUSÃO.....	52
7. REFERÊNCIAS .....	53

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ARTRITE REUMATOIDE - DEFINIÇÃO, EPIDEMIOLOGIA, SINTOMAS E DIAGNÓSTICO

Segundo Wilkins (2004) as doenças reumáticas são conhecidas pelos termos artrite ou reumatismo, estando entre as doenças inflamatórias crônicas que apresentam as maiores causas de incapacidade no mundo, constituindo um dos principais problemas de saúde pública (HELMICK et al, 2008). Tais condições comprometem o sistema músculo-esquelético que inclui as articulações, os músculos, os tecidos conectivos e os tecidos moles em torno das articulações e ossos (GRAY, 2014). Ainda, compreendem uma ampla classe de doenças, sendo as principais: a artrite reumatoide (AR), a artrite reumatoide juvenil, a osteoartrite, o lúpus eritematoso sistêmico, a arterite temporal, a polimialgia reumática, a gota, a síndrome de Sjögren e a espondilite anquilosante (GABRIEL; MICHAUD, 2009).

Dados do Centro para o Controle e Prevenção de Doenças (CDC- do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*) registram que mais de 50 milhões de adultos sofrem atualmente com doenças reumáticas (CDC, 2012). No Brasil segundo Barros et al. (2011), dados da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD), apontou no ano de 2008 uma prevalência de 5,67% da população com doenças crônicas categorizadas como artrite/reumatismo e, na capital de Santa Catarina a prevalência de artrite autorreferida entre os anos de 2009 e 2010 foi de 7,7% (GOMES; PERES, 2012). A AR é uma das principais doenças reumáticas, com uma prevalência mundial, segundo Scott, Wolfe e Huizinga (2010), de aproximadamente 0,5 a 1% da população; sendo definida como uma doença inflamatória crônica, sistêmica e auto-imune; caracterizada por inflamação e hiperplasia sinovial, afetando articulações sinoviais e tecidos, além de causar danos a cartilagem e erosão óssea (MCINNES; SHETT, 2011).

Dentre os fatores determinantes para a ocorrência da AR encontram-se variáveis como pertencer ao sexo feminino, ter histórico familiar de AR, além de tabagismo (AHO; HELIOVAARA, 2004; KLARESKOG; WEDREN; ALFREDSSON, 2009). Segundo Goeldner et al. (2011), fatores genéticos também podem contribuir em 60% para o desenvolvimento da doença, sendo forte a associação com a positividade dos anticorpos antipeptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCP, do inglês, *anti-cyclic citrullinated peptide antibody*), que são produzidos localmente na membrana sinovial inflamada e no líquido

sinovial de pacientes com AR (KINLOCH et al., 2008). Além disso, segundo Yazbek e colaboradores (2011), certas infecções causadas por micro-organismos como o vírus Epstein-Barr influenciam na fisiopatologia da doença, também certos processos inflamatórios como os causados por doenças periodontais parecem contribuir para seu desenvolvimento (WEGNER et al., 2010).

O impacto econômico causado pela AR é grande, com custos médicos diretos que envolvem despesas médicas, medicamentos, hospitalização e exames, bem como indiretos dentre os quais se encontram perda salarial, assistência domiciliar, absenteísmo, entre outros (HER, KAVANAUGH, 2012). Estudos em diferentes países mostraram que o custo médio anual por paciente com AR é de US\$ 2.682,00 na Tailândia e de US\$ 3.093,00 na Argentina (OSIRI; MAETZEL; TUGWELL, 2007; CATAY et al., 2012). Além disso, nos EUA estimou-se um gasto anual de 39 bilhões de dólares no tratamento dos pacientes com a doença (BIRNBAUM et al., 2010). No Brasil o custo médio anual por paciente está em torno de US\$ 2.423,51 (AZEVEDO; FERRAZ; CICONELLI, 2008).

O diagnóstico da AR depende da associação de sintomas e sinais clínicos, achados laboratoriais e radiográficos, sendo baseado nos critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia (ACR, do inglês, *American College of Rheumatology*) e pela Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR, do inglês, *European League Against Rheumatism*) 2010, conforme demonstra a Figura 1 (MOTA et al., 2011). Os testes de laboratório incluem marcadores inflamatórios como taxa de sedimentação de eritrócitos e níveis de proteína C-reativa no sangue, além de auto-anticorpos (FR e anti-CCP) (GOELDNER et al., 2011). Porém nenhum teste, isoladamente, seja este laboratorial, de imagem ou histopatológico, é suficiente para confirmar o diagnóstico (BERTOLO et al., 2007).

Figura 1 - Critérios classificatórios para AR 2010 ACR/EULAR.

População-alvo (quem deve ser testado?)	
Paciente com pelo menos uma articulação com sinovite clínica definida (edema).* Sinovite que não seja melhor explicada por outra doença.	
*Os diagnósticos diferenciais são diferentes em pacientes com diferentes apresentações, mas podem incluir condições tais como lúpus eritematoso sistêmico, artrite psoriática e gota. Se houver dúvidas quanto aos diagnósticos diferenciais relevantes um reumatologista deve ser consultado.	
Critério de classificação para AR (algoritmo baseado em pontuação: soma da pontuação das categorias A-D). Pontuação maior ou igual a 6 é necessária para classificação definitiva de um paciente como AR	
Envolvimento articular <sup>A</sup>	
1 grande articulação <sup>B</sup>	0
2-10 grandes articulações	1
1-3 pequenas <sup>C</sup> articulações (com ou sem envolvimento de grandes articulações)	2
4-10 pequenas articulações (com ou sem envolvimento de grandes articulações)	3
>10 articulações <sup>D</sup> (pelo menos uma pequena articulação)	5
Sorologia <sup>E</sup> (pelo menos o resultado de um teste é necessário para classificação)	
FR negativo <u>e</u> AACP negativo	0
FR positivo em título baixo <u>ou</u> AACP positivo em título baixo	2
FR positivo em título alto <u>ou</u> AACP positivo em título alto	3
Provas de fase aguda <sup>F</sup> (pelo menos o resultado de um teste é necessário para classificação)	
PCR normal <u>e</u> VHS normal	0
PCR anormal <u>ou</u> VHS anormal	1
Duração dos sintomas <sup>G</sup>	
< 6 semanas	0
≥ 6 semanas	1

Legenda: A) O envolvimento articular se refere a qualquer articulação edemaciada ou dolorosa ao exame físico e pode ser confirmado por evidências de sinovite detectada por um método de imagem. As articulações interfalangeanas distais (IFDs), primeira carpometacarpiana (CMTC) e primeira metatarsofalangeana (MTF) são excluídos da avaliação. As diferentes categorias de acometimento articular são definidas de acordo com a localização e o número de articulações envolvidas (padrão ou distribuição do acometimento articular). A pontuação ou colocação na categoria mais alta possível é baseada no padrão de envolvimento articular. B) São consideradas grandes articulações: ombros, cotovelos, quadris, joelhos e tornozelos. C) São consideradas pequenas articulações: punhos, MTFC, IFP, interfalangeana do primeiro quirodáctilo e articulações MTF. D) Nesta categoria, pelo menos uma das articulações envolvidas deve ser uma pequena articulação; as outras articulações podem incluir qualquer combinação de grandes e pequenas articulações, bem como outras não especificamente mencionados em outros lugares (por exemplo, temperomandibular, acromioclavicular e esternoclavicular). E) Negativo refere-se a valores (Unidade Internacional-UI) menores ou iguais ao limite superior normal (LSN) para o método e laboratório. Título positivo baixo corresponde aos valores (UI) maiores que o LSN, mas menores ou iguais a três vezes o LSN para o método e laboratório. Título positivo alto: valores maiores que 3 vezes o o LSN para o método e laboratório. Quando o FR só estiver disponível como positivo ou negativo, um resultado positivo deve ser marcado como “positivo em título baixo”. F) Normal / anormal é determinado por padrões laboratoriais locais (Outras causas de elevação das provas de fase aguda devem ser excluídas). G) Duração dos sintomas se refere ao relato do paciente quanto a duração dos sintomas ou sinais de sinovite (por exemplo, dor, inchaço) nas articulações que estão clinicamente envolvidas no momento da avaliação, independentemente do status do tratamento. FR = fator reumatoide; AACP = anticorpos antiproteína/peptídeo citrulinados; LSN = limite superior do normal; VHS = velocidade de hemossedimentação; PCR = proteína C-reativa.

Fonte: Fuller R, 2010.

As manifestações clínicas da AR são classificadas em articulares e extra-articulares e são observadas em pacientes com doença grave e poliarticular, sorologia positiva para fator reumatoide (FR) ou anti-CCP, incluindo quadros cutâneos, oculares, pleuropulmonares, cardíacos, hematológicos, neurológicos e osteometabólicos; as manifestações articulares incluem sinovite persistente não controlada (que pode acometer qualquer uma das articulações diartrodiais do corpo), além de sintomas como febre, fraqueza, fadiga, mialgia e limitação dos movimentos das articulações acometidas (MOTA et al., 2011).

A dor é o sintoma mais limitante nesta condição e o que gera maiores custos diretos e indiretos; ela está presente logo no início da doença e é a principal queixa dos pacientes (TAYLOR et al., 2010). Com a progressão da doença, o estado de saúde do paciente piora com o aumento do sintoma de dor, bem como com a manifestação de fadiga e incapacidade funcional, que tendem a levar à diminuição da qualidade de vida e ao aumento da taxa de hospitalização (PINHEIRO et al., 2013). Além disso, o aparecimento de outras doenças como hipertensão, dislipidemia, diabetes mellitus, aterosclerose, síndrome metabólica e outras comorbidades podem estar diretamente relacionadas ao sintoma de dor e tendem a agravar o quadro (PEREIRA et al., 2012).

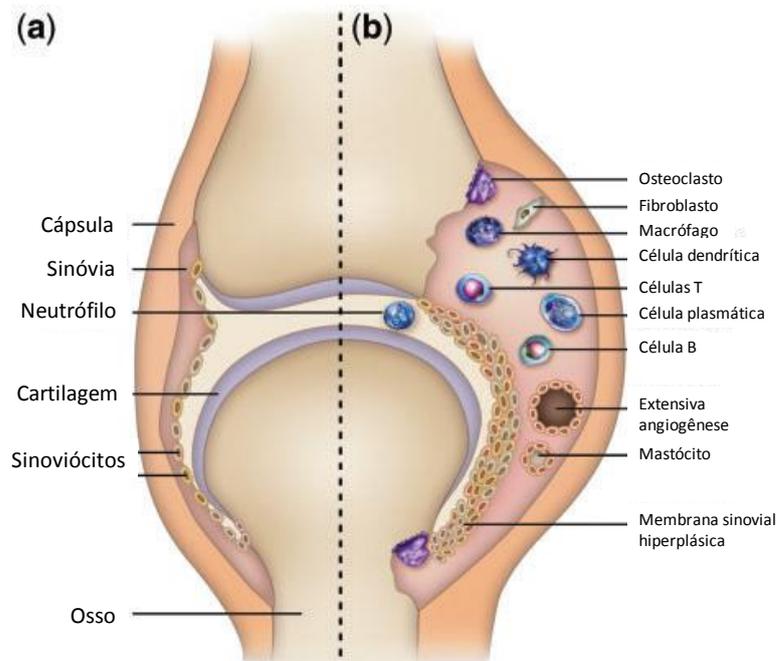
## 1.2 FISIOPATOLOGIA DA ARTRITE REUMATOIDE

A AR é uma doença inflamatória crônica, sistêmica e autoimune, caracterizada por inflamação e hiperplasia sinovial, afetando articulações sinoviais e tecidos, além de causar danos na cartilagem e erosão óssea (MCINNES; SCHETT, 2011). Vários mediadores inflamatórios e enzimas desempenham papel importante no desenvolvimento da artrite, sendo que estes podem ter sua origem em diferentes células presentes na articulação (CHOY, 2012). Dentre os mediadores estão incluídas as prostaglandinas (PGs), o Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF, do inglês, *tumor necrosis factor*), as interleucinas (IL) como a IL-1, a IL-6 e a IL-17, além de mediadores como o óxido nítrico (ON) e enzimas como as metaloproteinases de matriz (MMPs), os quais desempenham diferentes funções que serão descritas posteriormente (DOHERTY; BRYDGES; HOFFMAN, 2011; MCINNES; SCHETT, 2011).

A ilustração da anatomia de uma articulação é representada na Figura 2 a seguir, sendo que o principal alvo de ataque na AR é a membrana sinovial, uma camada de células que envolvem as articulações. O processo inflamatório induzido no quadro de artrite leva à ativação local de células mononucleares (macrófagos, mastócitos, células T e células B) e

células dendríticas, responsáveis pela produção dos mediadores inflamatórios (REGO, 2010). Além do surgimento do processo inflamatório, ocorre a migração de células sanguíneas para o interior das articulações e a síntese de mediadores inflamatórios, levando a um quadro de hiperplasia sinovial e de células linfoides (REGO, 2010).

Figura 2 - Anatomia de uma articulação normal e células envolvidas na fisiopatologia da AR.



Legenda: A) Articulação normal. b) A articulação afetada por AR mostrando o aumento da inflamação e atividade celular.

Fonte: Modificado de Choy, 2012.

As células T estimulam os sinoviócitos a proliferarem e invadirem a cartilagem e o osso (HATA et al., 2004). Com o comprometimento articular ocorre o aparecimento de um tecido inflamatório chamado de “*pannus*” que vai crescendo sobre a cartilagem articular ligando-se a esta. O *pannus* é composto pelos novos vasos capilares, células sinoviais, células inflamatórias, possuindo características semelhantes à dos tecidos tumorais, é o que dá início ao processo de degradação da cartilagem (AINOLA et al., 2005). A invasão causada pelo *pannus* leva à degradação do colágeno tipo II (proteínas que conferem estrutura e força aos tecidos conjuntivos das cartilagens) por ação de MMPs e de citocinas como TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-17, levando à destruição articular (ANDREAS et al., 2008). Subsequente à formação do *pannus*, ocorre também a formação de novos vasos sanguíneos, onde o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês, *vascular endothelial growth factor*) leva ao aumento da

permeabilidade vascular mantendo a progressão do processo inflamatório (REGO, 2010, CHEN et al., 2013).

Os neutrófilos são responsáveis pelos processos que visam a melhora do dano tecidual, diminuindo a gravidade da doença, sendo as primeiras células imunes a entrarem nas articulações em estágios iniciais da doença (CASCÃO; ROSÁLIO; FONSECA, 2009; CASCÃO et al., 2010). A partir destes neutrófilos presentes no local lesionado são também ativadas enzimas como a mieloperoxidase (MPO), que produz espécies reativas de oxigênio (EROs) com função de promoverem reações oxidativas envolvidas na degradação da cartilagem articular (NZEUSSEU et al., 2014). As EROs são produzidas principalmente durante fosforilação oxidativa e sua produção excessiva leva a danos celulares da matriz extracelular, por regular os mediadores da degradação da cartilagem, servindo também como importantes sinalizadores intracelular que aumentam a resposta inflamatória (FILIPPIN et al., 2008). Ainda, os níveis de EROs auxiliam a monitorar a gravidade da AR e, junto com os radicais hidroxila produzidos pelos neutrófilos, correlacionam-se com a carbonilação de proteínas e peroxidação lipídica (DATTA et al., 2014).

Na AR os receptores de glutamato associados com citocinas liberadas por macrófagos, estimulam a proliferação celular, levando ao aumento dos fibroblastos sinoviais (HINOY; YONEDA, 2011). Os fibroblastos contribuem para os danos da AR porque auxiliam na formação dos osteoclastos presentes no *pannus*, sendo estes responsáveis por danos estruturais como aumento da reabsorção óssea e erosões irreversíveis (SCHETT, 2007). A IL-1 também promove reabsorção óssea e destruição da cartilagem por estimular a ação dos osteoclastos, aumentar a produção de MMPs e ativar células T e B, além de modular a produção de ON e de PGs do tipo E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (DAYER, 2003).

Uma citocina chave no processo de inflamação desencadeado na AR é o TNF- $\alpha$ , que é importante na modulação da resposta inflamatória crônica, por induzir as defesas do hospedeiro (BLADLEY, 2008). No entanto, a liberação de grandes quantidades da mesma durante o processo inflamatório crônico parece estar relacionada à gravidade da inflamação, à coagulação intravascular disseminada, à síndrome de resposta inflamatória sistêmica, à falha de múltiplos órgãos e ao choque séptico (KAWAGUCHI et al., 2011). Também pode induzir a produção de ON e desencadear a secreção de IL-6 pelas células sinoviais (HATA et al., 2004; NAGY, et al., 2008).

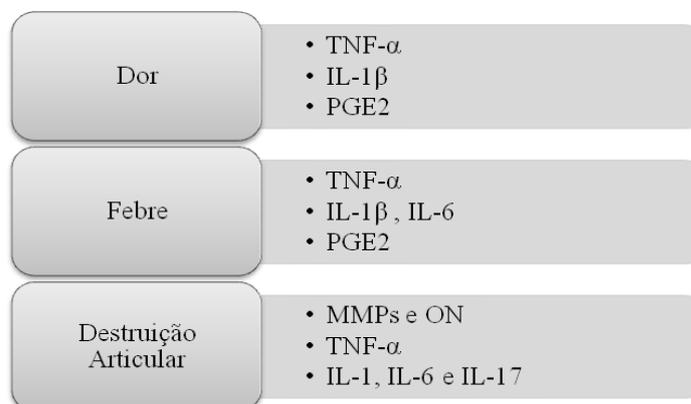
Por sua vez, as PGE<sub>2</sub> formadas a partir do ácido araquidônico por ação da COX, tem ação pró-inflamatória e encontra-se aumentadas no fluido sinovial e no tecido articular de pacientes com AR; seu papel na inflamação articular inclui principalmente a sensibilização de

neurônios aferentes sensoriais a estímulos nociceptivos, sendo o principal responsável pelo sintoma de dor e sensibilidade a estímulos nociceptivos em pacientes com AR. Além disso, induzem febre e modulam a produção de IL-17, IL-12 e interferon (IFN)- $\gamma$ , que amplificam a migração de neutrófilos para as articulações afetadas, além de influenciarem os efeitos de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  sobre a reabsorção óssea (YANG et al., 2013).

A IL-6 é também uma citocina pró-inflamatória chave na patogênese da AR uma vez que é capaz de induzir a produção de proteínas de fase aguda da inflamação como a proteína C-reativa (PCR) e o fibrinogênio, aumentar a expressão de IL-17 que é responsável pela proliferação de macrófagos e indução da expressão de moléculas de adesão na superfície de células endoteliais, bem como de influenciar a diferenciação e a atividade dos osteoclastos e osteoblastos (LE GOFF et al., 2010, ATAIE-KACHOIE; POURGHOLAMI; MORRIS, 2013).

Em animais, Hata e colaboradores (2004), observaram que níveis baixos de IL-6 contribuem para a inibição do desenvolvimento da AR. Em humanos esta tem papel importante no desenvolvimento de inflamação articular e sistêmica, por induzir a produção de IL-8 pelas células endoteliais e a ativação das MMPs, contribuindo ainda mais para a destruição articular e erosão óssea (YOSHIDA; TANAKA, 2014). Esta citocina também é responsável pela manifestação de diferentes sinais e sintomas da AR como febre, mal-estar, distúrbios do sono, fraqueza, anemia, trombose, hipercoagulabilidade e hipoalbuminemia, entre outros (TANAKA; OGATA; KISHIMOTO, 2013). Na figura 3 temos o resumo das principais citocinas responsáveis pelos sintomas da AR.

Figura 3 - Principais sintomas da AR e citocinas envolvidas.



Fonte: A Autora.

### 1.3 TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE

Além da abordagem farmacológica, o tratamento da AR inclui educação do paciente e familiares, fisioterapia, apoio psicossocial, terapia ocupacional e abordagens cirúrgicas (MOTA et al., 2012). Com relação ao tratamento farmacológico, este inclui principalmente os medicamentos da classe dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), os corticosteróides, os agentes antirreumáticos de ação lenta e os fármacos modificadores do curso da doença (DMARD, do inglês, *Disease Modifying Anti-rheumatoid Drugs*), que podem ser sintéticos ou biológicos (RANG; DALE, 2007; RENDAS-BAUM et al., 2011; SIGN, 2011).

Apesar de os DMARDS biológicos serem eficazes no controle da AR, sua segurança a longo prazo não está comprovada; no Brasil, as drogas mais usadas são os bloqueadores de receptores do TNF- $\alpha$ , como o adalimumabe, o certolizumabe, o etanercepte, o infliximabe e o golimumabe; além destes, também o anticorpo monoclonal de receptores CD20 de linfócitos B, o abatacepte, bem como os bloqueadores de receptor de interleucina (IL)-6, o tocilizumabe (MOTA et al., 2012). Esta classe de fármacos reduz o inchaço e a dor nas articulações, diminuem marcadores de fase aguda, evitam a destruição progressiva da articulação e melhoram a função articular (SMITH; SMITH; SEIDNER, 2011). Novas estratégias de manejo da AR incluem a utilização dos DMARD desde a fase inicial e uma terapêutica mais individualizada, levando em conta o manejo das comorbidades, visando a um melhor prognóstico dos pacientes (PEREIRA et al., 2012).

Com relação aos AINEs, amplamente empregados no tratamento da AR, estas são drogas frequentemente utilizadas com o objetivo de reduzir a dor, a febre e a inflamação observadas durante a mesma. Estas drogas são úteis para diminuir o processo inflamatório principalmente no início da doença, porém seu uso deve ser controlado, pois algumas condições clínicas podem ser agravadas pelo uso dos mesmos, tais como hipertensão arterial sistêmica, insuficiência cardíaca, insuficiência renal, doenças gastrintestinal, insuficiência arterial, hepatopatia e distúrbios de coagulação (MOTA et al., 2012). A escolha do AINEs também deve levar em conta as comorbidades e o histórico de eventos adversos do paciente, isto porque este geralmente encontra-se em uso de múltiplas medicações, sendo então a preferência para os inibidores seletivos ou específicos da COX-2, que evitam os efeitos adversos no trato gastrintestinal (TREVISANI; FIDELIX; APPENZELLER, 2011).

As classes de medicamentos mais utilizadas no tratamento da AR podem levar ao aparecimento de outras doenças envolvendo principalmente o sistema cardiovascular,

gastrointestinal e genitourinário (MOTA et al., 2012). Por essa razão, existe um crescente interesse por produtos de origem natural que apresentem efeitos terapêuticos com menor toxicidade e que levem a redução dos efeitos adversos; constituem a alternativa promissora no tratamento de pacientes com AR (YANG et al., 2013).

O tratamento não farmacológico inclui ainda, programas de exercícios e alimentação adequada; neste sentido, o tratamento nutricional é de grande importância e consiste em orientar a uma dieta saudável, evitar alérgenos alimentares e evitar possíveis deficiências de vitaminas como as do complexo B, C e D, além de minerais como o cálcio e o ferro (DUNCAN, 2010). Uma importante área a ser explorada ainda encontra-se no campo dos nutracêuticos, quando o profissional nutricionista pode orientar o paciente a evitar dietas ricas em gordura saturadas e açúcar, que auxiliam no aumento da inflamação e do estresse oxidativo, por aumentarem a produção dos mediadores inflamatórios (BRIOSCHI et al., 2009).

Nutracêuticos são alimentos que desempenham um papel na modificação e manutenção da função fisiológica normal, além de ajudar no combate a alguns dos principais problemas de saúde como obesidade, doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose, artrite, diabetes e dislipidemias. Os produtos alimentares utilizados como nutracêuticos são categorizados como fibra dietética, prebióticos, probióticos, ácidos graxos poli-insaturados, antioxidantes e outros tipos diferentes de ervas ou produtos naturais (DAS et al., 2012).

Alguns alimentos considerados nutracêuticos possuem papel terapêutico na AR das quais se encontram o óleo de peixe, óleo de prímula, extratos de cominho preto, fenogregó, alcaçuz, coentro, tomate, cenoura, batata doce, brócolis, o chá verde, alecrim, avelãs, nozes, gérmen de trigo, além do probiótico *Bifidobacterium bifidum* (AL-OKBI, 2012). Uma dieta rica em peixes, azeite de oliva e vegetais possuem efeito protetor contra AR e o uso combinado dos nutracêuticos com suplementação nutricional específica, pode auxiliar na diminuição do estresse oxidativo e corrigir desequilíbrios hormonais levando a uma melhora clínica da dor (KJELDSSEN-KRAGH, 2003; BRIOSCHI et al., 2009).

O papel da nutrição também é relevante para tratar as comorbidades atribuídas à gravidade da doença e ao perfil nutricional do paciente (geralmente obesidade ou desnutrição), que têm como agravantes os fatores genéticos e/ou o tipo de terapia farmacológica empregada (PEREIRA et al, 2012; AL-OKBI, 2012). Assim a nutrição adequada, com uma dieta contendo alimentos ricos em antioxidantes e anti-inflamatórios, proporcionando uma ingestão adequada de ferro, cálcio, vitamina D e vitaminas do complexo B e aumentando a ingestão de ácido graxo insaturado do tipo ômega-3 pode levar ao alívio

dos sintomas das doenças inflamatórias como a AR, auxiliar na prevenção dos efeitos colaterais causados pelos medicamentos e diminuir a progressão da doença (RENNIE et al., 2003; AL-OKBI, 2012).

#### 1.4 PLANTAS MEDICINAIS COMO RECURSO NO TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE

O tratamento com produtos de origem vegetal vem sendo preferido no Brasil principalmente por pessoas que apresentam doenças crônicas, já que o uso de medicamentos alopáticos em longo prazo pode levar ao risco de maior toxicidade e de interações medicamentosas (ALEXANDRE, BAGATINE, SIMÕES; 2008). O uso de produtos naturais vem crescendo substancialmente e, em nosso país, ganhou destaque em 2012, com a última edição da RENAME (Relação Nacional de Medicamentos Essenciais), que incluiu 12 fitoterápicos dentre os quais está a garra-do-diabo (para o tratamento de dor aguda) e a unha-de-gato (para o tratamento da AR e osteoartrite) (BRASIL, 2012). A grande aceitação e demanda por parte da população por este tipo de produtos estimula o emprego da fitoterapia, conceituada como um tratamento que provem da utilização de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal (BRASIL, 2006).

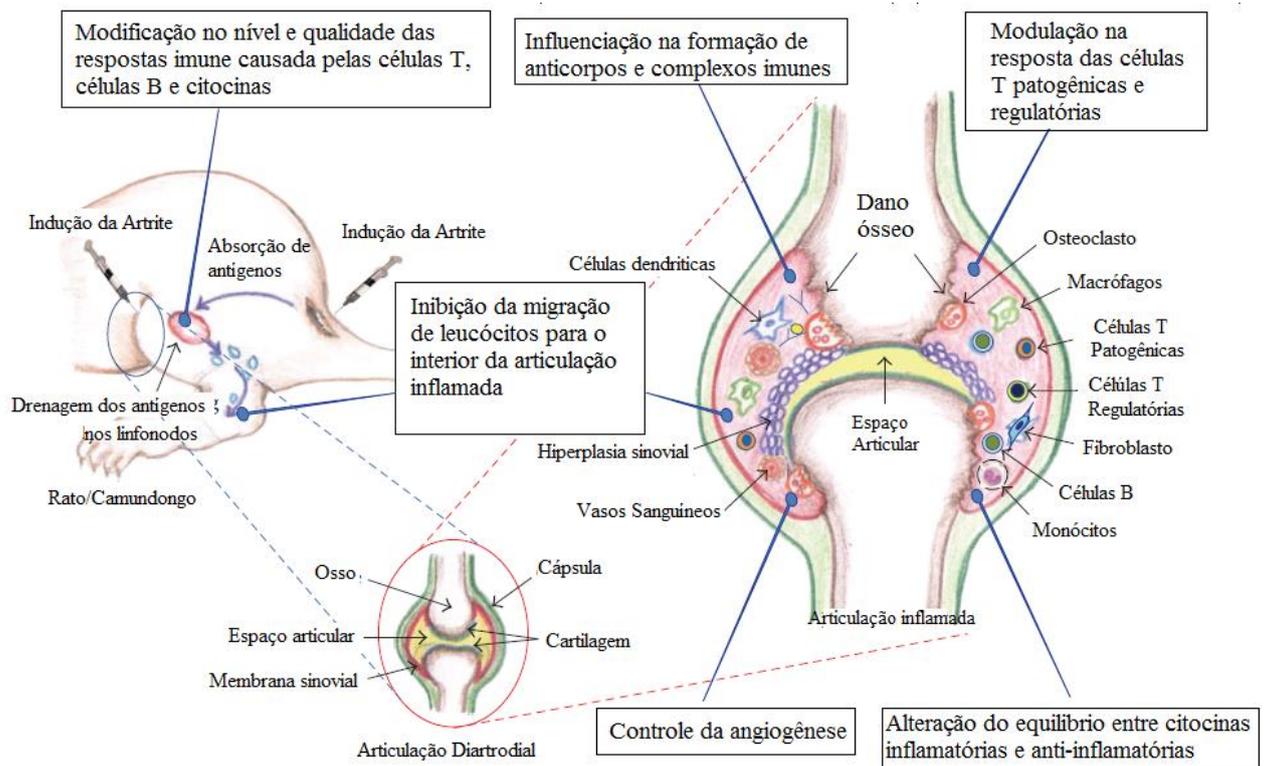
Os fitoterápicos possuem um importante papel no crescimento econômico, por serem mais acessíveis em algumas partes do mundo e por terem ampla aceitação entre muitas populações dos países em desenvolvimento (WHO, 2002). Diferentes organizações em nível mundial e nacional vêm estimulando a capacitação de profissionais das mais diferentes áreas, incentivando pesquisas para o aproveitamento do potencial terapêutico, priorizando a biodiversidade do país e o desenvolvimento de estratégias políticas e regulamentos para garantir a segurança de produtos à base da mesma (BRASIL, 2006). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável em fiscalizar os estudos que comprovam a eficácia e segurança do medicamento fitoterápico (ANVISA, 2010).

Atualmente diversas plantas e seus compostos apresentam potencial anti-inflamatório, imunomodulador e analgésico em doenças como AR, as atualmente utilizadas são: *Cimicifuga racemosa* (Black cohosh), *Camellia sinensis* (chá verde), *Tripterygium wilfordii* (thunder god vine), *Centella asiática*, *Urtica dioica* (urtiga), *Pterodon pubescens* (sucupira), *Curcuma longa* (Curcuma), *Zingiber officinale* (gengibre), *Harpagophytum procumbens* (garra-do-diabo) e *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato) (BRASIL, 2012,

VENKATESHA et al, 2011; YANG et al, 2013). Testes *in vitro* e *in vivo* vêm sugerindo mecanismos relevantes de ação para combater a inflamação e respostas imunológicas nesta condição, porém ainda são escassos os estudos clínicos que comprovem sua eficácia (KOLASINSKI, 2012).

Dentre os alvos potenciais para a ação dos constituintes das plantas medicinais no quadro de AR, Venkatesha e colaboradores (2011), destacam a possível influência das mesmas sobre a atividade dos mediadores inflamatórios, além da modulação, indução e/ou regulação da doença conforme demonstrado no esquema ilustrado na Figura 3.

Figura 4- Influência de plantas medicinais sobre múltiplas vias envolvidas no desenvolvimento e progressão da artrite.



Fonte: Modificado de Venkatesha SH et al., 2011

Do ponto de vista do acadêmico em formação a partir do presente estudo, o uso destes recursos pelos profissionais nutricionistas é um tema de considerável interesse, sendo que a incorporação destas plantas à dieta, sob diferentes formas, poderia proporcionar alívio de sinais e sintomas e/ou evitar a progressão de doenças (SANGUI et al., 2009).

Este papel do profissional da área da nutrição neste contexto ganha destaque à medida em que, no ano de 2013, foi regulamentada pelo Conselho Federal de Nutrição (CFN) a prescrição de fitoterápicos e preparações magistrais por profissional nutricionista capacitado para esse fim, sendo cabível a prescrição de plantas medicinais e drogas vegetais. O nutricionista poderá adotar a fitoterapia somente quando os produtos prescritos estiverem em seu campo de atuação, baseando-se em evidências científicas que comprovem a eficácia e segurança do produto (CFN, 2013).

O tratamento combinado de fitoterápicos com a dietoterapia pode ser útil como medicina complementar, objetivando a diminuição da progressão da AR, a prevenção de danos irreversíveis nas articulações, o alívio da dor, a redução da inflamação e a melhoria da qualidade de vida do paciente (MOTA; LAURINDO; NETO, 2010).

### 1.5 PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS DA *Citrus reticulata*

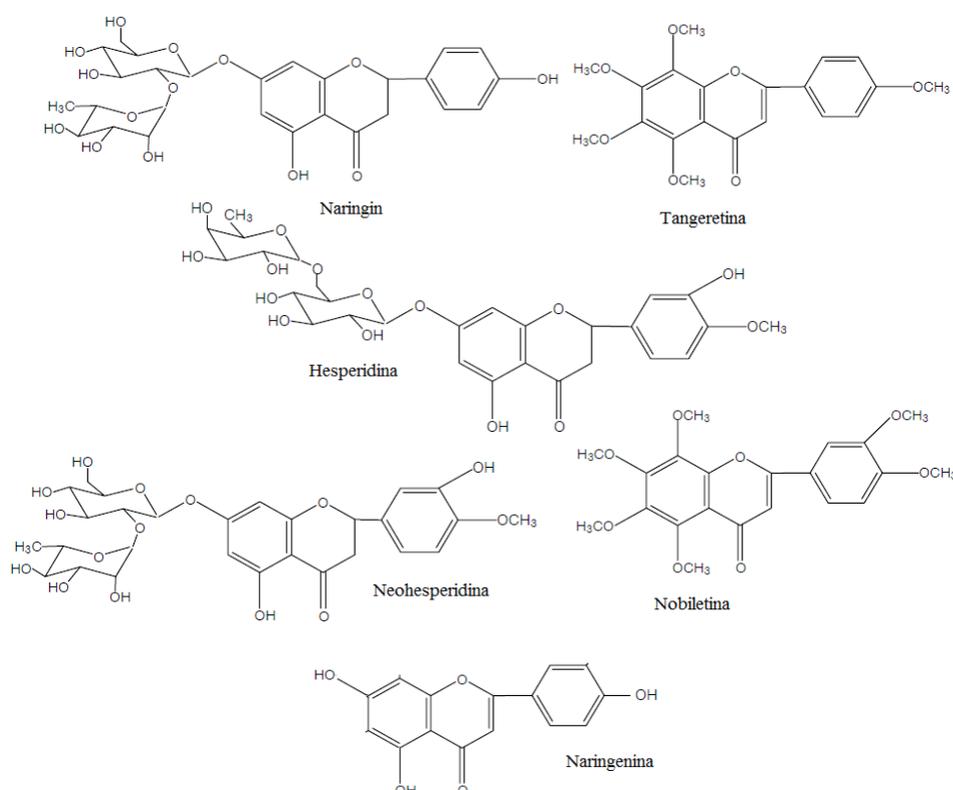
O gênero *Citrus* é um dos mais importantes da família Rutaceae por causa de seus frutos, que são estimados primariamente como artigos de dieta (WAHEED et al., 2009). A família Rutaceae está compreendida por cerca de 150 gêneros, 1.600 espécies, distribuída nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, sendo mais abundante na América Tropical, Sul da África e Austrália. No Brasil, a família está representada por aproximadamente 29 gêneros e 182 espécies, com algumas de importância medicinal, ecológica e econômica (MELO, 2004). Em todo o mundo, as plantas cítricas como a laranja, o limão e a tangerina são amplamente consumidas pela população, principalmente como alimentos, sendo as frutas ricas em vitamina C, fibras dietéticas, carotenoides e flavonoides, possuindo assim um elevado potencial antioxidante (DUZZIONI et al., 2010). O Brasil, a China e a Espanha são responsáveis por 60.3 % da produção mundial de tangerina; em 2012 a região Sul do Brasil produziu 34,05% da produção nacional (IBGE, 2012).

O consumo das mesmas ocorre principalmente na forma de sucos, porém suas cascas constituem-se em subproduto não aproveitável, apesar de estudos fitoquímicos com espécies do gênero *Citrus* revelarem que é nas cascas que encontramos a quantidade importante de alguns flavonoides, como hesperidina (HSP), narirutina, nobiletina e tangeretina (NOGATA et al., 2006; BERMEJO; LLOSÁ; CANO, 2011).

Estruturalmente, os flavonoides são divididos em classes de acordo com sua composição molecular, sendo os principais representantes os flavonóis, tais como o flavonol, as flavonas, as isoflavonas e as flavanonas, além das antocianidinas (DORNAS et al., 2007).

Os principais flavonoides encontrados nas cascas de frutas do gênero *Citrus* são principalmente a hesperidina, a naringenina (NG), a neohesperidina, a narirutina, a nobiletina, a sinensetina e a tangeretina, cujas estruturas químicas podem ser vistas na Figura 4 (HUANG; HO, 2010). Estudo feito por Rincón e colaboradores (2005) mostrou que as cascas da *Citrus reticulata* possuem maior quantidade de nutrientes se comparado com outros *Citrus*, entre os quais cálcio, magnésio, carotenoides, fibras dietéticas e polifenóis totais (grupo onde se encontramos os flavonoides).

Figura 5- Estrutura química dos principais flavonoides presentes nas cascas do gênero *Citrus*.



Fonte: adaptado de Tripoli et al. (2007) e Sun et al. (2010).

Estes compostos já foram estudados por suas diferentes propriedades, tais como sobre a dislipidemia e a resistência à insulina (MULVIHILL; HUFF, 2012). Sobre o sistema cardiovascular, os flavonoides apresentam propriedade redutora sobre o colesterol, sugerindo o papel de prevenção do estresse oxidativo e da aterosclerose (CESAR et al., 2010). O uso combinado de 270 mg de flavonoides presente em frutas cítricas com 30 mg de tocotrienóis, por 4 semanas, em pacientes com hipercolesterolemia, melhorou a função cardiovascular, reduziu o colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês, *Low Density*

*Lipoprotein*), apolipoproteína e os triglicerídeos (ROZA; XIAN-LIU; GUTHRIE, 2007). Estes compostos também apresentaram papel importante na diminuição da incidência de doenças degenerativas como o câncer, possivelmente por uma ação antimutagênica, inibindo o desenvolvimento de tumores e a proliferação das células tumorais (TRIPOLI et al., 2007). Além disso, são relacionados a uma ação neuroprotetora, diminuindo o declínio cognitivo relacionada com a idade e a neurodegeneração em animais e seres humanos (SPENCER et al., 2012). Em modelo animal de artrite os flavonoides presentes na planta *Turpinia arguta seen*, foram eficazes na redução do processo inflamatório e destruição da cartilagem (ZHANG et al., 2007).

Quanto à artrite, a nobiletina é um promissor constituinte, segundo Mulvihill et al. (2011), para ser usado como marcador em medicamento fitoterápico por seu potencial anti-inflamatório e imunomodulador, tendo demonstrado importante ação, segundo Lin et al., (2003), em modelo animal de osteoartrite e em modelo de artrite reumatoide induzida por colágeno em camundongos (IMADA et al., 2008).

A NG é outro importante flavonoide (4,5,7-tri flavanona) encontrado nas cascas da *Citrus reticulata*, possuindo papel na diminuição da glicose sanguínea, na dislipidemia e na hiperinsulinemia (JAIN et al., 2011; MULVIHILL; HUFF, 2012). Segundo Quin e colaboradores (2011) esta substância também apresenta uma importante atividade antitumoral, enquanto Xu e colegas (2011) registraram sua ação na prevenção da aterosclerose. Quanto às propriedades anti-inflamatórias, Chao e colaboradores (2010) demonstraram seu papel antioxidante, enquanto Al-rejaie et al. (2013) e Azuma et al. (2013), observaram sua ação em modelos de colite ulcerativa e de AR (WILCOX; BORRADAILE; HUFF, 1999; KAWAGUCHI et al, 2011).

As cascas da *Citrus reticulata* já foram estudadas em alguns modelos animais, mostrando atividade antiangiogênica por aumento da expressão do VEGF, inibindo a formação de vasos sanguíneos e aumentando a densidade óssea, sendo estes resultados importante para evitar a progressão da AR (ADELINA et al., 2008; CHRISNANTO et al., 2008). Apesar destes achados, nenhum estudo ainda deve como objetivo avaliar o potencial terapêutico de um extrato bruto hidroalcoólico produzido das cascas da *Citrus reticulata* sobre nocicepção.

Pelo acima exposto, o presente estudo se justifica na medida em que esta planta foi selecionada por ser cultivada na região sul de Santa Catarina, bem como por conhecer-se que a casca atualmente constitui-se em subproduto da planta e que esta foi a espécie que

apresentou maior teor de flavonoides em suas cascas, quando comparada a outras frutas cítricas (NOGATA et al., 2006; HUANG; HO, 2010).

## 1.6 DOR E NOCICEPÇÃO

O termo antinociceptivo diz respeito à capacidade de diferentes classes de substâncias em reduzir a sensibilidade a estímulos nociceptivos em animais, sendo que a esta propriedade dos compostos infere-se uma possível ação analgésica em humanos.

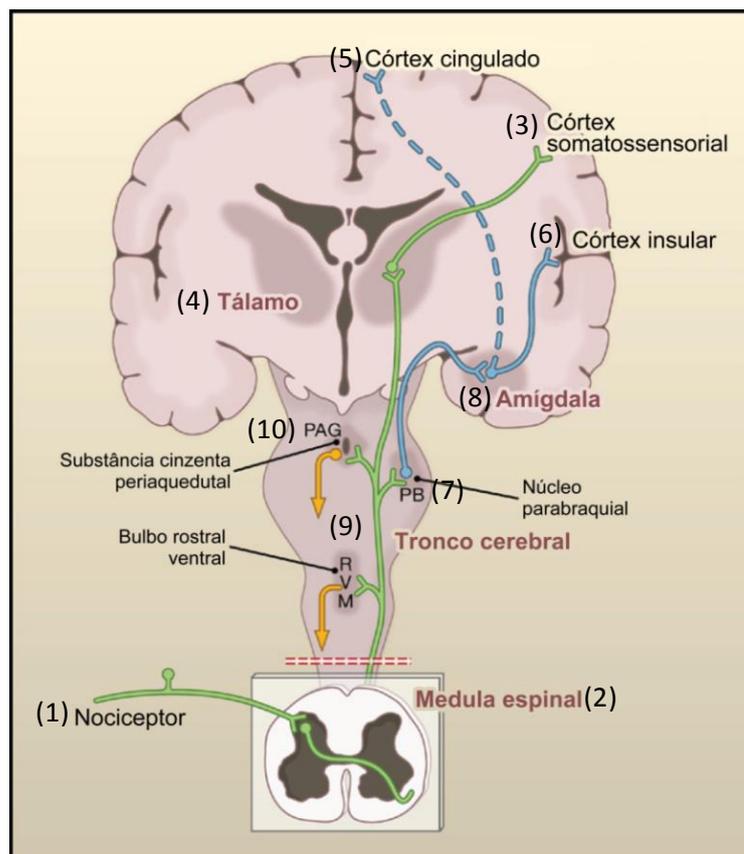
Para melhor entendimento, podemos destacar que a Associação Internacional de Estudo da Dor (IASP, do inglês, *International Association for the Study of Pain*), conceituou a dor em 1986 como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com a lesão tecidual real ou descrita em termos de tal lesão” (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008). A partir deste conceito, entende-se que a sensação dolorosa em humanos ocorre posteriormente ao processo neural de codificação e processamento de estímulos nocivos, ao qual denominamos de nocicepção; além disso, processos emocionais e cognitivos, bem como fatores fisiológicos e psicológicos também podem influenciar a dor (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Porém, uma vez que os estudos animais não são capazes de distinguir os componentes emocionais desta sensação, os mesmos utilizam o registro de comportamentos que são interpretados como dor, mas que dizem respeito à ativação de vias nociceptivas específicas, preferindo-se então adotar o termo nocicepção ou, para substâncias capazes de reduzir tais comportamentos, denominamos as mesmas de substâncias "antinociceptivas" (LOESER; TREEDE, 2008).

No homem a dor aguda surge como consequência de trauma, na presença de estímulos nocivos, por ativação direta dos nociceptores, estando relacionada à ativação da Via Ascendente Nociceptiva (VAN) que é representada na Figura 5 (LOESER; MELZACK, 1999; JI; WOOLF, 2001). De acordo com esta figura, a dor aguda tem início por meio da detecção de estímulos nociceptivos (de alta intensidade) captados pelos nociceptores presentes na camada superficial da pele, nos tecidos periféricos e na cartilagem (JULIUS; BASBAUM, 2001). Os estímulos capazes de promover a dor podem ser de diferentes modalidades, incluindo estimulação mecânica, química ou térmica, sendo estes transmitidos pelos nervos periféricos até a medula espinal. Os neurônios sensoriais responsáveis por esta detecção são de dois tipos, incluindo as fibras do tipo A $\delta$  que são responsáveis pela detecção da dor aguda e as fibras do tipo C, associadas a dor crônica (KLAUMANN; WOUK;

SILLAS, 2008). Ao chegar à medula espinal, a transmissão nociceptiva é controlada no corno posterior da medula espinal e, a partir daí, a informação é transmitida para centros supraespinais como o tálamo e o córtex e, após sua ativação, a chegada da informação nociceptiva nesta última estrutura resulta na percepção e localização da dor (MILLAN, 1999; MILLAN, 2002, BASBAUM et al., 2009).

Figura 6 - Representação anatômica da Via Aferente Nociceptiva.



Legenda: Nociceptores (1) transmitem informações nociceptivas para os neurônios de projeção dentro do corno posterior da medula espinal (2). Um subconjunto destes neurônios de projeção transmite a informação para o córtex somatossensorial (3) através do tálamo (4), fornecendo informações sobre a localização e a intensidade do estímulo doloroso. Outros neurônios de projeção envolvem o córtex cingulado (5) e o insular (6), via conexões no tronco encefálico como o núcleo parabraquial (7) e amígdala (8), que contribuem para o componente afetivo da experiência dolorosa. Esta informação ascendente também acessa neurônios do bulbo (9) e da substância cinzenta periaquedutal (10) do mesencéfalo, envolvidos nos sistemas de retroalimentação descendente que regulam a saída da informação dolorosa ao nível da medula espinal.

Fonte: adaptado de Basbaum e colaboradores (2009).

Por outro lado, a percepção da dor pela VAN pode também desencadear uma resposta que é retransmitida para a medula espinal através de vias descendentes de controle da dor (BASBAUM et al., 2009). Este sistema descendente pode modular a sensação de dor, mas não a intensidade, e é dependente de neurotransmissores como noradrenalina (NA), serotonina

(5-HT), dopamina (DA), opióides, canabinóides e adenosina; os mesmos podem exercer tanto ações inibitórias quanto estimulatórias sobre a percepção da dor, dependendo do local onde é liberado e do receptor que ele atuará (MILLAN, 2002). A ativação inicial destas vias descendentes se inicia em regiões que incluem giro do cíngulo anterior, a amígdala e o hipotálamo e alcançam a medula espinal passando por estruturas do tronco encefálico como a substância cinzenta periaquedutal e a porção rostroventral do bulbo. Os transmissores inibitórios nestes percursos incluem a NA, a 5-HT e os opióides endógenos (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009).

### 1.7 MODELOS ANIMAIS DE NOCICEPÇÃO

Dentre os modelos animais de dor aguda conhecidos atualmente, o teste do glutamato continua sendo bastante empregado na literatura (KARIM; BHAVE; GEREAU IV, 2001; LAM; NG, 2010; OSIKOWICZ; MIKA; PRZEWLOCKA, 2013). Neste modelo a administração do glutamato por via subcutânea na pata traseira do animal desencadeia um comportamento de dor na forma de *licking* (lamber a pata) que se inicia rapidamente e apresenta curta duração (cerca de 15 min), com formação de edema associado. Assim, este teste é usado para discriminar a atividade de substâncias sobre a dor aguda ou neurogênica, uma vez que a dor associada ao mesmo é decorrente da ativação da VAN (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002).

O glutamato é um dos mais importantes mediadores nociceptivos por ser o neurotransmissor mais abundante do sistema nervoso central (SNC); ele pode ser encontrado no encéfalo, na medula espinal e também na periferia, sua liberação ocorre em resposta a estímulos nociceptivos seguidos ou não de lesão tecidual (BLEAKMAN; ALT; NISENBAUM, 2006). Segundo Hinoi e Yoneda (2011), em modelos experimentais de artrite encontramos níveis elevados de glutamato no fluido sinovial a partir de articulações do joelho de ratos e o mesmo pode ser correlacionado ao sintoma de dor encontrado na mesma, já que a estimulação contínua e a liberação sustentada de glutamato podem levar a um estado de hiperexcitabilidade de neurônios nociceptivos, acarretando em hipersensibilidade térmica e mecânica (YOUN; GERBER; SATHER, 2013).

Com relação ao teste da formalina, este é outro modelo de grande utilidade já que consegue discriminar a ação de substâncias sobre a dor aguda (neurogênica) e crônica (inflamatória), sendo assim possível avaliar o efeito antinociceptivo de substâncias sobre o SNC e periférico, bem como uma possível ação anti-inflamatória pela redução do edema

causado pelo agente. A nocicepção neste modelo é induzida pela administração subcutânea de formalina na pata do animal, distinguindo-se a fase neurogênica (ou 1ª fase) entre 0 a 5 minutos após a sua administração, além da dor inflamatória (ou 2ª fase) entre 15 a 30 minutos após a mesma. Assim sendo, a primeira fase é empregada para avaliar a dor aguda e a segunda fase avalia a dor crônica (TJOLSEN et al., 1992; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

Finalmente, o teste da carragenina também permite avaliar os efeitos de substâncias sobre os parâmetros inflamatórios de dor e edema. Neste modelo são promovidos edema e alodinia mecânica após a administração intraplantar (i.pl.) deste agente inflamatório, que é um polissacarídeo derivado de algas marinhas. A inflamação ocorre pela rápida produção de mediadores inflamatórios tais como histamina, 5-HT, bradicinina (BK), PGE<sub>2</sub>, ON, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, com um pico máximo de resposta por volta da quinta hora após a sua aplicação (THOMSON; FOWLER, 1981; MORRIS, 2003; TAMADDONFARD et al., 2013). A resposta inflamatória induzida pela carragenina ocorre em três fases, na fase inicial (0-1h) ocorre a liberação de histamina e serotonina, na fase II (2-4h) de bradicinina, e na fase posterior (4-6h) ocorre o aumento das PGs pela ativação da COX-2 (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971; MORRIS, 2003).

## 1.8 MODELO ARTRITE REUMATOIDES INDUZIDA PELO ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA)

O estudo da AR a partir de modelos animais é importante na compreensão da doença, bem como na avaliação pré-clínica da eficácia de potenciais terapias (DI PAOLA; CUZZOCREA, 2008). Contudo, a escolha do modelo mais apropriado para tais estudos é a garantia da possibilidade de responder a perguntas importantes para o uso mais eficiente das mesmas (VINCENT et al., 2012).

Um bom modelo experimental para o estudo da AR deve levar em conta a capacidade do mesmo de reproduzir reações autoimunes semelhantes às que ocorrem na AR em humanos, permitir a avaliação de inibidores de citocinas como alvos terapêuticos, já que estas vêm sendo empregados na clínica com sucesso, além de reproduzir a eficácia de fármacos empregados na clínica sobre os efeitos promovidos no modelo (WOOLEY, 2004). O modelo de artrite induzida quimicamente por Adjuvante Completo de Freund (CFA, do inglês, *Complete Freund's Adjuvant*) preenche parcialmente a estes critérios, uma vez que o mesmo não reflete os alvos fisiologicamente mais relevantes (VINCENT et al., 2012). Apesar disto, é um modelo de artrite induzida quimicamente que ainda vem sendo empregado

atualmente, principalmente por apresentar determinadas vantagens em relação a outros métodos, como custos mais baixos e por ser reprodutivo com certa robustez nas linhagens de animais que são mais frequentemente utilizadas no país (HAN et al., 2012). Além disso, o modelo reproduz com bastante fidelidade os fenômenos de dor e de edema que são observados em pacientes com a doença, sendo os mesmos responsáveis por causarem limitação de movimentos e perda da qualidade de vida nos pacientes acometidos (LEVY et al., 2006).

O CFA, segundo Billiau e Matthis (2001), é composto por um óleo contendo mono-oleato de manitol e uma micobactéria morta, a *Mycobacterium butyricum* ou *M. tuberculosis*, causando resposta inflamatória local caracterizada por monoartrite resultante de inflamação crônica, edema e migração de leucócitos para o local, que são efeitos bastante semelhantes ao do quadro de artrite que ocorre em seres humanos (WHITEHOUSE, 2007). Por estas características, é amplamente empregado para triagem da ação antiartrítica de substâncias, bem como para a investigação da ação de medicamentos em doenças crônicas, permitindo conhecer a etiopatogenia, o prognóstico e a efetividade do tratamento (KIM et al., 2002). Estas respostas ao agente podem ser investigadas pela presença de edema, além de fenômenos de sensibilidade aumentada no membro afetado a estímulos mecânicos que anteriormente não eram percebidos como nociceptivos, ou seja, alodinia mecânica (WHITEHOUSE, 2007). A investigação deste último parâmetro neste modelo também é importante uma vez que a dor é um dos principais sintomas da AR, responsável por causar limitação de movimentos e perda da qualidade de vida nos pacientes acometidos.

## 1.9 CONSIDERAÇÕES SOBRE A RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Diante do exposto, justifica-se a relevância do presente estudo uma vez que existe grande demanda pelo uso da fitoterapia pela população brasileira. Principalmente por esta razão e também pelo desconhecimento das ações de grande número de espécies vegetais, estudos que investiguem tais propriedades biológicas de plantas cultivadas no Brasil são estimulados pelos governos estadual e nacional.

Com relação ao profissional nutricionista em formação a partir do presente trabalho, o mesmo desempenha importante papel na área da saúde com relação à problemática dos distúrbios nutricionais e de doenças decorrentes da alimentação inadequada; isto torna relevante o seu papel na utilização de fitoterápicos e nutracêuticos, agregando mais um recurso para o tratamento dietoterápico, aumentando a eficácia do tratamento e melhorando o

prognóstico do paciente. Ao se especializar em áreas afins, poderá orientar a população de forma segura para que os fitoterápicos promovam o resultado esperado, evitando e prevenindo o agravamento da doença.

O presente estudo também é promissor no sentido de vislumbrar a possibilidade de utilização de um subproduto das frutas cítricas na saúde, gerando conhecimento e fortalecendo ideias sobre os benefícios das plantas, principalmente sobre os sintomas observados em condições como a AR. Isto é importante para fortalecer a importância das plantas cultivadas no território nacional, bem como de abrir perspectivas para o uso destas para além da finalidade alimentícia, como fitoterápicos ou nutracêuticos, por exemplo, em condições ainda não investigadas.

Finalmente, o estudo das ações antinociceptiva e antiartrítica de um extrato da casca da *Citrus reticulata* poderá fornecer novos subsídios para o desenvolvimento de produtos na área da saúde, além de elucidar os possíveis mecanismos de ação do mesmo.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as ações antinociceptiva e antiartrítica de um extrato bruto hidroalcoólico das cascas de *Citrus reticulata* (EBCR), bem como os possíveis mecanismos implicados nas mesmas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir um extrato bruto hidroalcoólico à base das cascas de *Citrus reticulata* (EBCR) e quantificar os níveis do flavonoide naringenina, possivelmente presente nas cascas da *Citrus reticulata*;
- Avaliar a influência do tratamento dos animais com EBCR sobre a nocicepção em diferentes modelos em camundongos;
- Analisar a influência do tratamento dos animais com EBCR sobre a nocicepção e o edema induzidos em modelo de artrite em camundongos;
- Investigar a possível contribuição dos sistemas opioidérgico e adenosinérgico sobre os efeitos induzidos pelo EBCR em modelo de artrite em camundongos.

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A planta foi colhida no final do mês de julho de 2013, no município de Araranguá-SC. A espécie de tangerina foi identificada botanicamente pelo Professor Jasper Zanco, do Curso de Agronomia da UNISUL como: Família Rutaceae, nome comum Ponkan e nome científico *Citrus reticulata*. Uma exsicata da mesma foi depositada no Herbário *Laelia purpurata* sob Voucher número SRS 00050047.

#### 3.2 PRODUÇÃO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DE *Citrus reticulata* (EBCR)

O extrato da planta foi produzido pelo Prof. Luiz Alberto Kanis, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Para isto, cascas da planta (Figura 7) foram colocadas para secar, durante dois dias, em estufa a 40°C.

Figura 7 - Cascas da *Citrus reticulata*.



Fonte: A autora.

O material seco foi triturado e padronizado quanto ao diâmetro de partícula (entre 250  $\mu\text{m}$  e 850  $\mu\text{m}$ ). Posteriormente foi colocado sob maceração mecânica, utilizando etanol como líquido extrator à temperatura ambiente. Após isto, o extrato foi filtrado e o solvente evaporado sob pressão reduzida a 40°C. O extrato bruto obtido foi eluído em coluna de sílica gel 60, utilizando como solvente o etanol. Esta etapa teve como objetivo obter um extrato com maior concentração do flavonoide.

### 3.3 PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO EM CONTEÚDO DO FLAVONOIDE NARINGENINA

A naringenina (SIGMA<sup>®</sup>) foi usada como marcador químico do extrato da planta por ser uma das substâncias possivelmente presentes na constituição química da casca desta. O perfil cromatográfico e o teor deste marcador foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando o padrão primário adquirido comercialmente.

### 3.4 ANIMAIS

Para os estudos *in vivo* foram utilizados camundongos da espécie *Mus Musculus*, linhagem Swiss, machos, com cerca de 30 g. Estes foram mantidos, durante o período dos experimentos, em ambiente com temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}$  C) e luminosidade (ciclo claro-escuro de 12 h, a partir das 6:00 h) controlados, com livre acesso a ração e água, em número máximo de 30 animais por gaiola. Nos dias dos experimentos, os animais foram aclimatados ao laboratório por pelo menos 1h antes dos testes, e foram homogeneamente distribuídos entre os diferentes grupos de tratamento. O número de animais por grupo (n) foi igual a oito, de acordo com a literatura da área (MARTINS et al., 2011).

Todos os protocolos envolvidos no estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UNISUL, sob Número de Registro 13.039.4.03.IV.

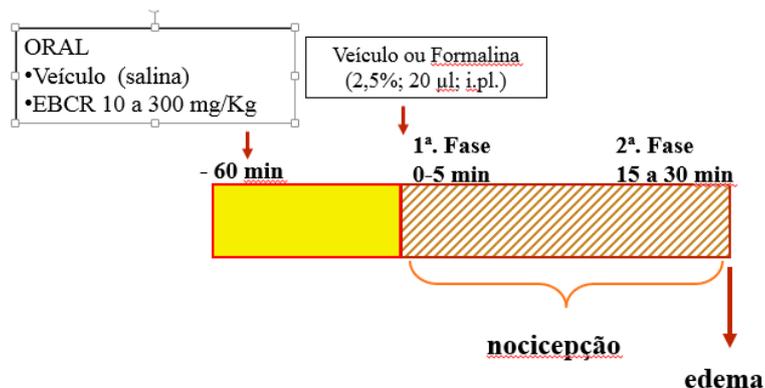
### 3.5 PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EBCR EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO

#### 3.5.1 Teste da formalina

Grupos de animais foram tratados por via oral com veículo (salina) ou diferentes doses ( $10$  a  $300$   $\text{mg}/\text{kg}^{-1}$ ) do EBCR. Uma hora após este tratamento, os animais receberam injeção i.pl. de  $20\mu\text{L}$  de solução de formalina a 2,5% (em salina). A nocicepção foi determinada pelo tempo gasto em lamber/morder a pata, no período cronometrado nos períodos entre 0 a 5 minutos (1ª fase) e 15 a 30 minutos (2ª fase) da injeção deste agente, ao

final foi avaliado o edema (TJOLSEN et al., 1992; SANTOS; CALIXTO, 1997; MARTINS et al., 2011). As etapas desse procedimento encontram-se esquematizadas na Figura 8.

Figura 8 – Protocolo utilizado no modelo de formalina.

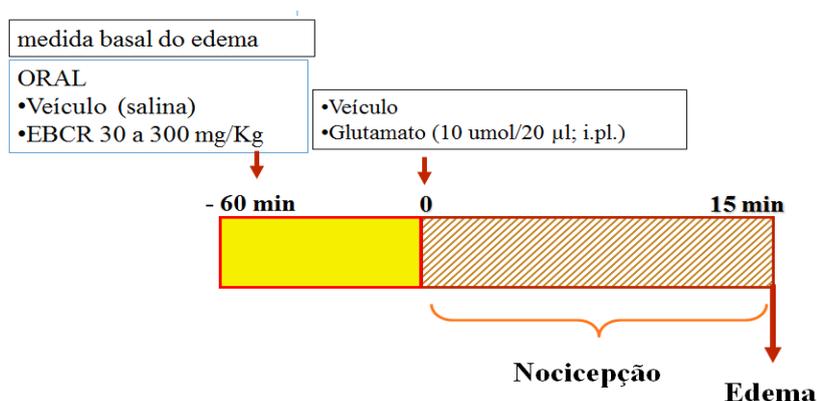


Fonte: A autora.

### 3.5.2 Teste do glutamato

Grupos de animais foram tratados por via oral com veículo (salina) ou diferentes doses ( $30$  a  $300$  mg/kg<sup>-1</sup>) do EBCR. Uma hora após este tratamento, os animais receberam injeção intraplantar (i.pl.) de  $20\mu\text{L}$  de glutamato ( $10$   $\mu\text{mol}$ /pata) dissolvido em solução salina. Esse procedimento (Figura 9) induz a estimulação direta dos neurônios nociceptivos, bem como a liberação de vários mediadores inflamatórios e neuropeptídios envolvidos na nocicepção, promovendo um comportamento de nocicepção imediata que é determinado pelo comportamento de morder/lamber a pata tratada (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002; BAGGIO et al., 2010; MARTINS et al., 2011). Esse índice foi registrado no período de 15 min após a administração do composto (NASCIMENTO et al., 2010).

Figura 9 – Protocolo utilizado no modelo do glutamato.



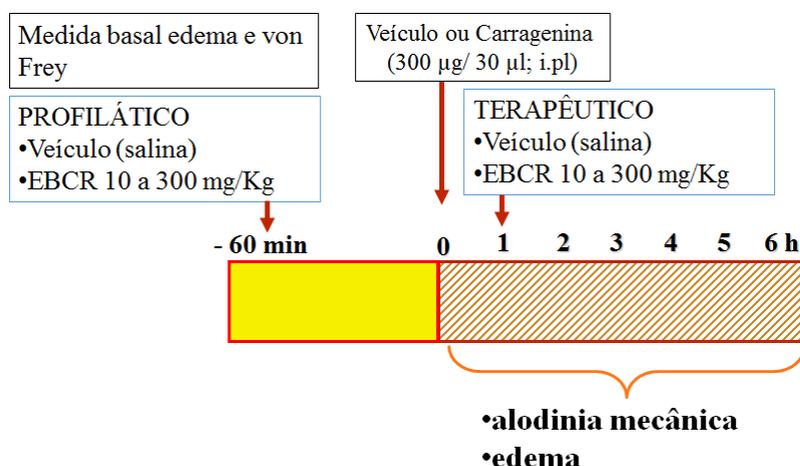
Fonte: A autora.

### 3.5.3 Modelo da carragenina

O protocolo foi desenvolvido de acordo com o utilizado por Albano et al. (2013), a partir da indução do edema pela administração i.pl. de carragenina (300 µg/pata) na pata traseira direita de camundongos. Anteriormente a isto, foi feita uma medida da espessura desta pata com o uso de micrômetro, sendo este valor registrado como medida basal e 1 h antes diferentes grupos de animais foram tratados por via oral com veículo (água estéril, controle negativo) ou diferentes doses do EBCR (10 a 300 mg/kg). O edema de pata foi medido nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a administração do agente inflamatório conforme descrito a seguir. Os resultados foram expressos como a diferença entre a espessura da pata traseira direita (em µm) antes e após a administração do agente inflamatório.

Além disso, neste modelo foi avaliado também o efeito do EBCR sobre a alodinia mecânica induzida após a administração de carragenina na pata dos animais. A alodinia mecânica induzida pela sensibilização da pata foi avaliada utilizando monofilamentos de nylon, denominado von Frey (VFH, Stoelting, Chicago, USA). Foram utilizados como indicativo de resposta os valores percentuais para a frequência de retirada da pata dos animais para 10 aplicações do filamento de von Frey, com a força de 0,6 g. Esta pressão foi selecionada para a avaliação de alodinia mecânica, a partir de estudo anterior que observou que este valor não causa retirada da pata (nocicepção) em animais do grupo controle (MARTINS et al., 2011). O protocolo empregado nesse modelo para ambos os tratamentos está esquematizado na Figura 10

Figura 10 – Protocolo utilizado no modelo de carragenina.



O teste foi aplicado utilizando-se uma plataforma de 70 x 40 cm, que consiste em uma tela de arame com malha de 6 mm, para facilitar a aplicação do filamento na superfície ventral da pata posterior, sendo os animais colocados individualmente em uma câmara de observação feita em acrílico (9 x 7 x 11 cm), sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre a plataforma (PITCHER; HENRY, 2004).

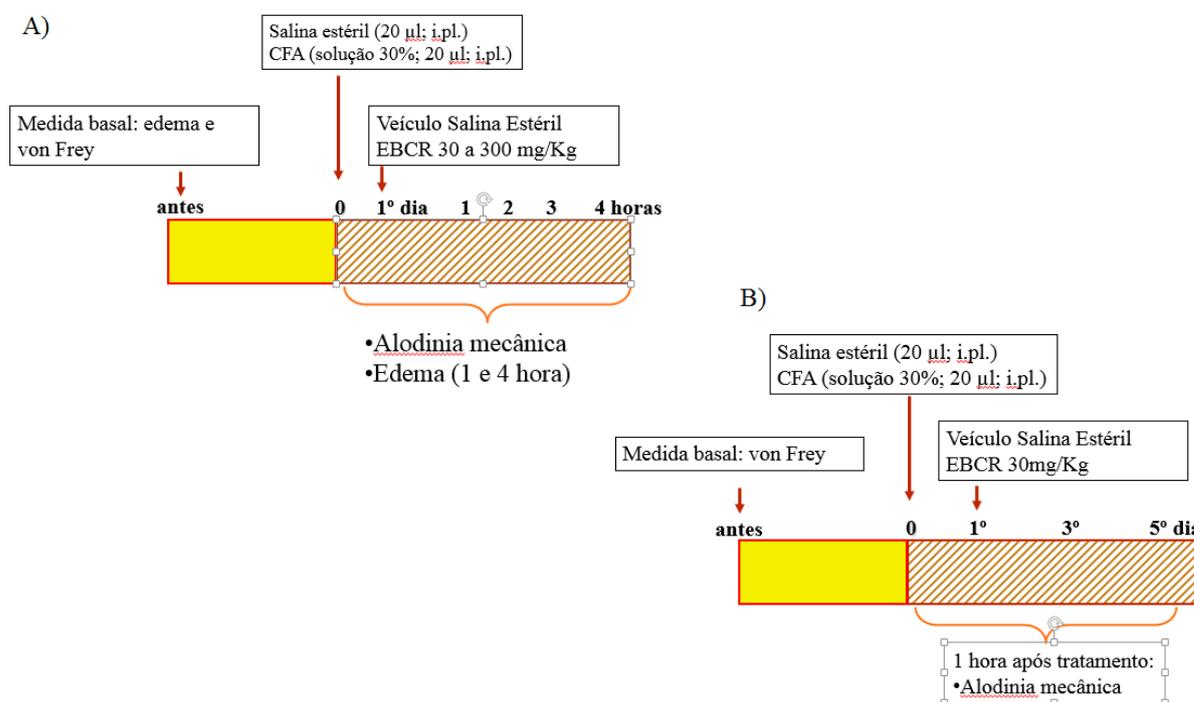
Os critérios para a aplicação do estímulo mecânico foram: a) a aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar, com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total; b) os animais foram avaliados quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela; c) a resposta de retirada foi considerada positiva quando o animal removia totalmente a pata da tela de apoio.

### 3.6 PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIARTRÍTICA DO EBCR

#### 3.6.1 Modelo do Complete Freund's Adjuvant (CFA)

Diferentes grupos de animais receberam injeção i.pl. de 20 µL de veículo (controle negativo, salina estéril) ou solução a 30% de CFA para indução da dor inflamatória crônica, conforme utilizado por Nascimento et al. (2010). Para avaliar o efeito antinociceptivo (alodinia mecânica) do EBCR, diferentes doses do mesmo (30 a 300 mg/kg, via oral) foram administradas 24 horas após a administração do CFA. O desenvolvimento da alodinia mecânica (conforme descrito no item anterior) foi avaliado nos tempos de 1 a 4 h após o tratamento para verificar o decurso temporal do efeito do extrato sobre a resposta de alodinia; ao final desta quarta hora foi avaliado também o efeito do EBCR sobre o edema. Para a dose com maior atividade nestas primeiras 24 h, esta ação antialodínica da planta foi investigada por longo-prazo (nos dias 1, 3 e 5) posteriormente (1h) ao tratamento dos animais com o EBCR uma vez ao dia, sendo que esta última etapa teve como objetivo avaliar um possível efeito acumulativo para o extrato com um protocolo de tratamento diário. Um esquema deste protocolo é visualizado na Figura 11.

Figura 11 – Protocolos utilizados no modelo de CFA.



Legenda: A) Primeira etapa do modelo de CFA. B) Etapa após escolha da dose mais eficaz.  
Fonte: A autora.

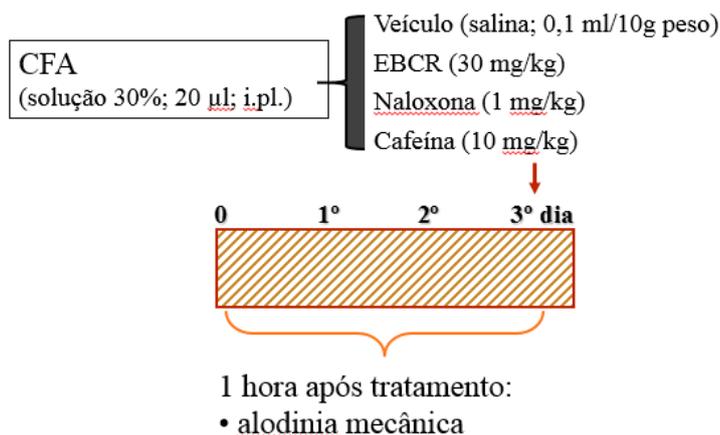
### 3.7 AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DOS SISTEMAS OPIOIDÉRGICO E ADENOSINÉRGICO SOBRE OS EFEITOS DO EBCR

#### 3.7.1. Envolvimento dos sistemas opioidérgico e adenosinérgico no efeito do EBCR

Para investigar a possível contribuição dos sistemas opioidérgico e adenosinérgico sobre os efeitos antiedematogênico e antinociceptivo (alodinia) do EBCR no modelo de dor induzida por CFA, diferentes grupos de animais receberam tratamento com CFA ou salina (Figura 12) i.pl., no 3<sup>o</sup> dia após a administração i.pl. de CFA, conforme descrito anteriormente. Previamente a isto, estes dois grupos foram subdivididos em dois grupos assim tratados: a) grupo salina: animais tratados intraperitoneal (i.p) com salina (1 mL/kg), naloxona (antagonista não-seletivo de receptores opióides, 1 mg/kg) ou cafeína (antagonista não-seletivo de receptores de adenosina, 10 mg/kg); b) grupo CFA: animais tratados i.p. com salina (1 mL/kg), naloxona (antagonista não-seletivo de receptores opióides, 1 mg/kg) ou cafeína (antagonista não-seletivo de receptores de adenosina, 10 mg/kg). Uma hora após os

tratamentos, os animais foram avaliados quanto à alodinia mecânica e o edema, conforme já descrito.

Figura 12 – Protocolo utilizado para investigar a contribuição dos sistemas opioidérgico e adenosinérgico no modelo do CFA.



Fonte: A autora.

### 3.8 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO EBCR SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA

Para avaliar a possível ocorrência de efeito não específicos do EBCR, tais como relaxamento muscular ou sedação, observou-se o desempenho dos animais no teste do rota-rod, conforme realizado por De Mattos et al. (2007), para isto, apenas os animais que no dia anterior permaneceram durante 60 s sobre uma barra cilíndrica em rotação constante de 22 r.p.m. foram selecionados. No dia posterior, os animais receberam veículo (salina, 0,1 ml/kg) ou EBCR (30 mg/kg) e foram observados no rota-rod por um tempo de 90 s nos períodos de 1h, 2h ou 24 h após esta administração. O tempo (em s) que cada animal permaneceu sobre a barra rotatória foi registrado como índice de coordenação motora.

### 3.9 DROGAS E REAGENTES

Foram utilizadas as seguintes substâncias e produtos químicos: cafeína, cloridrato de naloxona, glutamato, indometacina cristalina, carragenina e CFA (Sigma Chemical Co., USA), formaldeído (Chemco Ind. e Com., Campinas, Brazil). O ácido acético e cloridrato de morfina foram adquiridos do Merck A.G. (Darmstadt, Germany). Para a confecção do extrato

foi utilizado a naringenina (Sigma Chemical Co., USA), o metanol (Vetec Quimica Fina, Duque de Caxias, RJ, BR) e o etanol (Lafan Quimica Fina, Varzea Paulista, SP, BR).

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (Erro Padrão da Média). Analisados no programa Graphpad Insta®, usando a análise de variância (ANOVA) de uma via seguido de Kruskal-Wallis, ou ANOVA de duas vias seguida de Tukey ou Bonferroni, respectivamente, para comparação entre grupos ( $P < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PADRONIZAÇÃO DO EBCR EM CONTEÚDO DO FLAVONOIDE NARINGENINA:

O conteúdo de naringenina no EBCR produzido foi calculado em 0,29 mg/g de material vegetal (cascas) utilizado para a confecção do extrato. O extrato obtido apresentou cor castanho escuro, com consistência viscosa e forte aroma cítrico (Figura 13).

Figura 13 – Aparência final do EBCR.



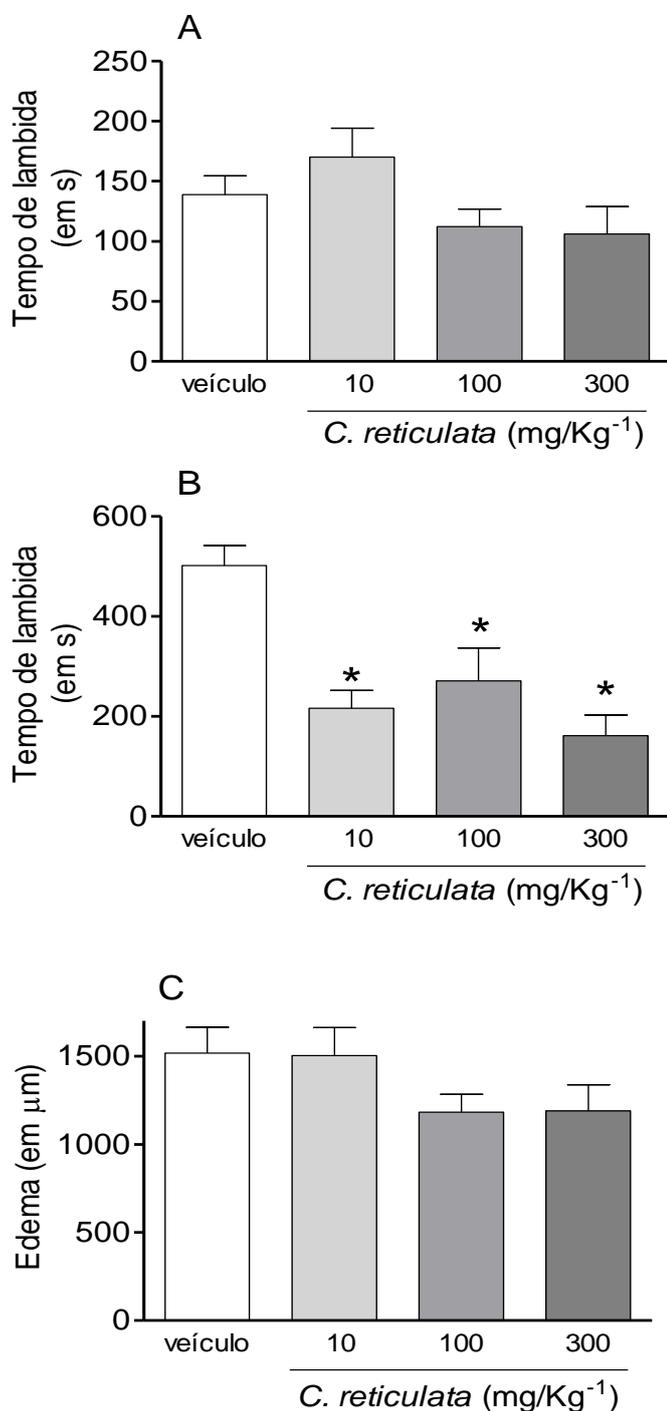
Fonte: A autora.

### 4.2 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EBCR EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO

#### 4.2.1 Teste da formalina

Conforme pode ser observado na Figura 14 neste teste não se observou alteração da resposta nociceptiva dos animais na primeira fase (Figura 14A) nem do edema (Figura 14C) nos animais tratados com EBCR (300 mg/kg: 106,2 s  $\pm$  22,7 e 1.189,0  $\mu$ m  $\pm$  147,2, respectivamente) em relação aos animais do grupo controle (138,8 s  $\pm$  15,6 e 1.517,0  $\mu$ m  $\pm$  147,1, respectivamente). Por outro lado, o tratamento reduziu o comportamento de lambida da pata na segunda fase do teste (Figura 14B), sendo que a dose de 10 mg/kg (216,3 s  $\pm$  35,8) demonstrou a mesma eficácia que a maior dose avaliada no estudo (300 mg/kg: 161,8 s  $\pm$  41,1). O extrato não demonstrou efeito sobre o edema nesse modelo.

Figura 14 - Influência do tratamento prévio dos animais com EBCR sobre a nocicepção e o edema no teste da formalina em camundongos.

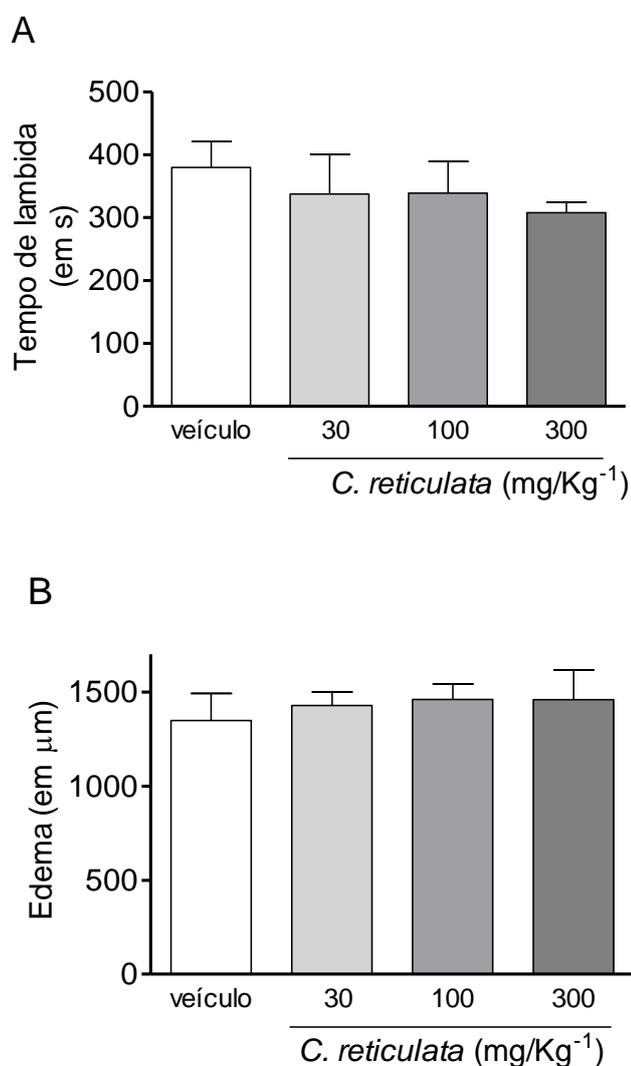


Legenda: A) Efeito do EBCR na primeira fase da formalina. B) Efeito do EBCR na segunda fase da formalina. C) Efeito do EBCR sobre o edema. Os efeitos foram observados após a injeção i.pl. de formalina (20 $\mu\text{L}$  dissolvido a 2,5% em solução salina) na pata traseira dos animais, sendo a primeira fase medida no período entre 0 e 5 min e a segunda fase no período entre 15 e 30 min após a administração do agente, enquanto o edema foi avaliado ao final deste período. Dados apresentados como a média  $\pm$  S.E.M. (n= 6 a 12). (\*)  $p \leq 0,05$ , ANOVA de uma via seguida de Tukey.

#### 4.2.2 Teste do glutamato

No período de 15 min após a administração i.pl. de glutamato (20 $\mu$ L/ 10  $\mu$ mol/pata) na pata traseira dos animais, observaram-se pronunciados efeitos de nocicepção (Figura 15A) e edema (Figura 15B); contudo, o tratamento prévio (60 min) dos animais com diferentes doses do EBCR não promoveu alteração destes efeitos (300 mg/kg: 308,3 s  $\pm$  16,3 ou 1.460,0  $\mu$ m  $\pm$  157, 0 respectivamente) em relação aos animais do grupo controle (veículo: 379,3 s  $\pm$  41,9 ou 1.350,0  $\mu$ m  $\pm$  142,7 respectivamente).

Figura 15 - Influência do tratamento prévio com EBCR no teste do glutamato em camundongos.



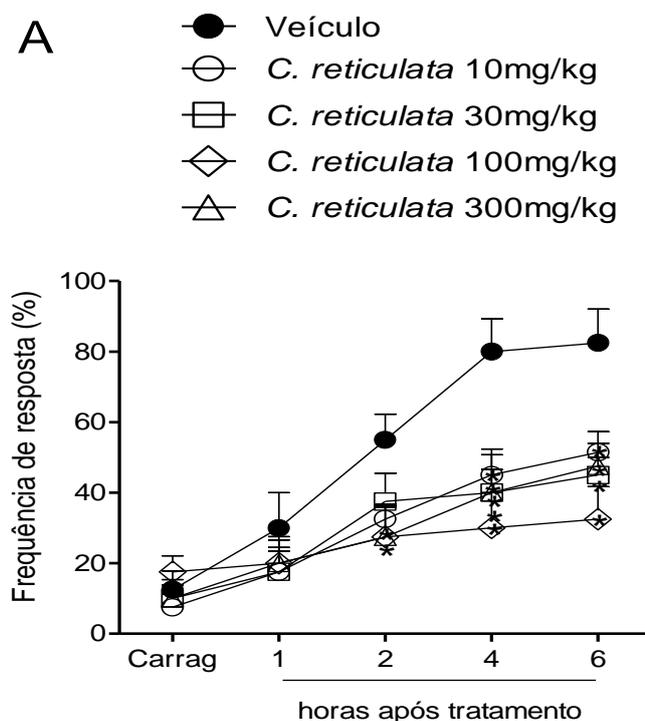
Legenda: Os efeitos foram observados 15 min após a injeção i.pl. de glutamato (20 $\mu$ L/10  $\mu$ mol/pata) na pata traseira dos animais, sendo a nocicepção medida no período entre 0 e 15 min após a administração do agente e o

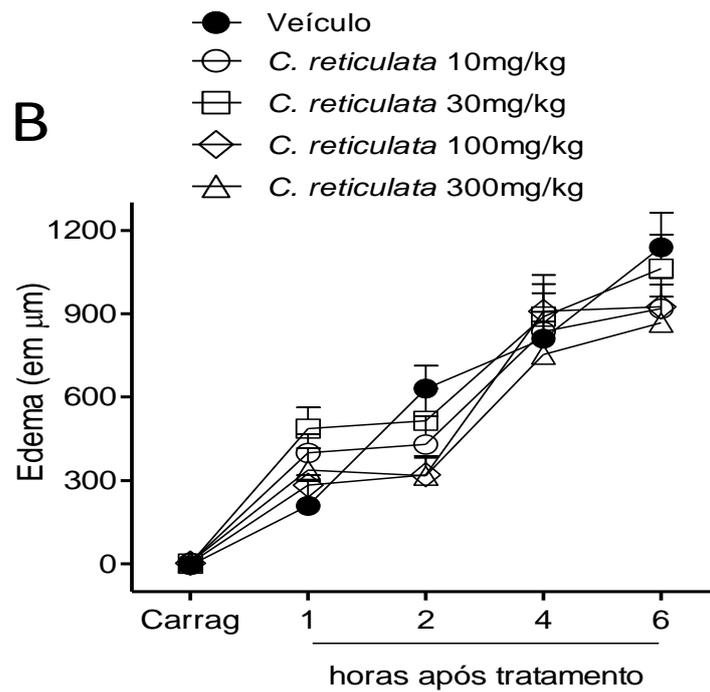
edema avaliado ao final deste período. Dados apresentados como a média  $\pm$  S.E.M. (n= 6 a 12), ANOVA de uma via.

#### 4.2.3 Modelo da Carragenina

Neste modelo foram avaliados dois tipos de tratamento para o EBCR, sendo estes o tratamento profilático (Figura 16) e o tratamento terapêutico (Figura 17). Conforme pode ser observado na Figura 16A, quando o tratamento dos animais com o extrato foi realizado de maneira profilática, ou seja, 1 h antes da administração da carragenina, observou-se redução da alodinia mecânica a partir da segunda hora após a administração deste agente inflamatório para as doses de 100 mg/kg e 300 mg/kg, bem como para todas as doses avaliadas (10 a 300 mg/kg) a partir da quarta hora após a injeção da carragenina. Sobre o edema (Figura 16B) não foram observados resultados significativos para o EBCE após a segunda hora da aplicação da carragenina.

Figura 16 - Influência do tratamento profilático (1 h antes do agente inflamatório) dos animais com EBCR sobre a nocicepção e o edema no modelo teste da carragenina em camundongos.

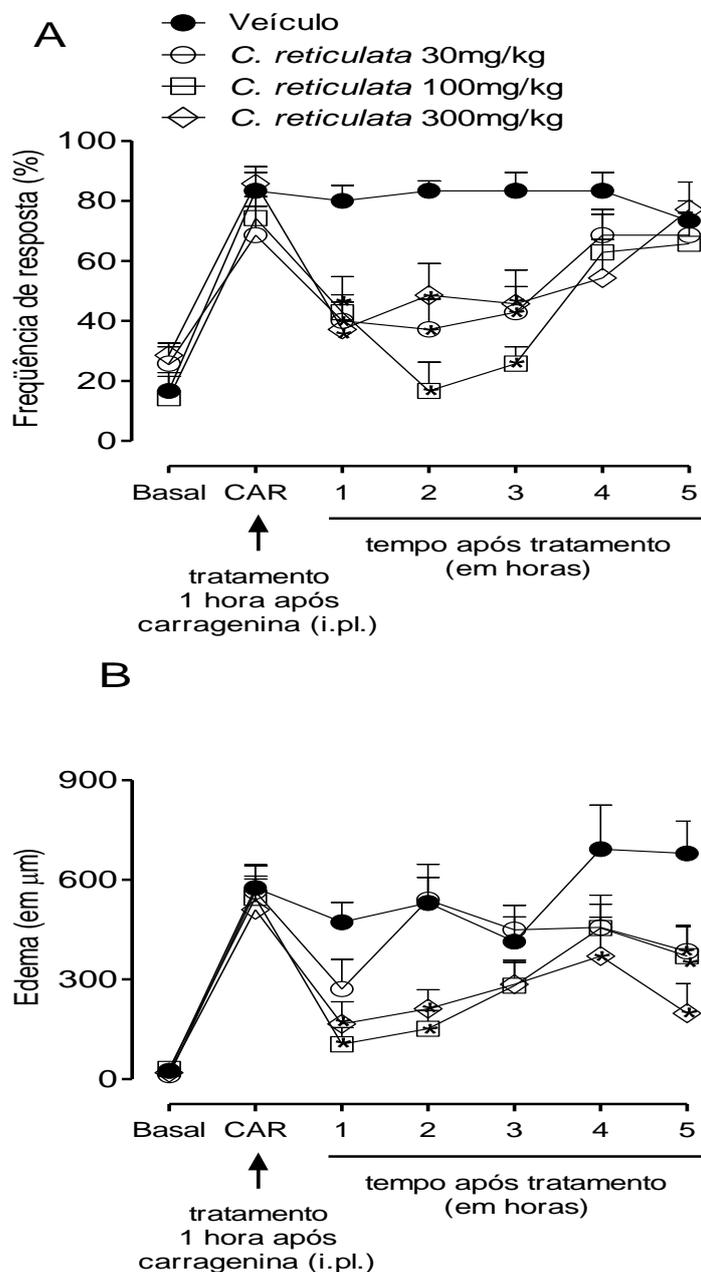




Legenda: A) Efeito do EBCR sobre a alodinia mecânica. B) Efeito do EBCR sobre o edema. Os efeitos foram observados entre 1 a 5 horas após a injeção i.pl. de carragenina (300 µg/pata) na pata traseira dos animais. Dados apresentados como a média ± S.E.M. (n= 6 a 12). (\*)  $p \leq 0,05$ , ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni.

Quanto ao tratamento realizado com o EBCR de maneira terapêutica, ou seja, 1 h após a administração da carragenina, conforme pode ser observado na Figura 17 este tratamento foi capaz de promover redução tanto da alodinia mecânica (Figura 17A) quanto do edema (Figura 17B). A redução da alodinia mecânica foi mais pronunciada no tempo de 2 horas após tratamento para a dose de 100 mg/kg; em relação ao edema o efeito mais persistente foi observado para a dose de 300 mg/kg, que causou redução deste efeito entre a primeira e a quinta hora após tratamento.

Figura 17 - Influência do tratamento terapêutico (1 h após administração do agente inflamatório) dos animais com EBCR sobre a nocicepção e o edema no modelo teste da carragenina em camundongos.



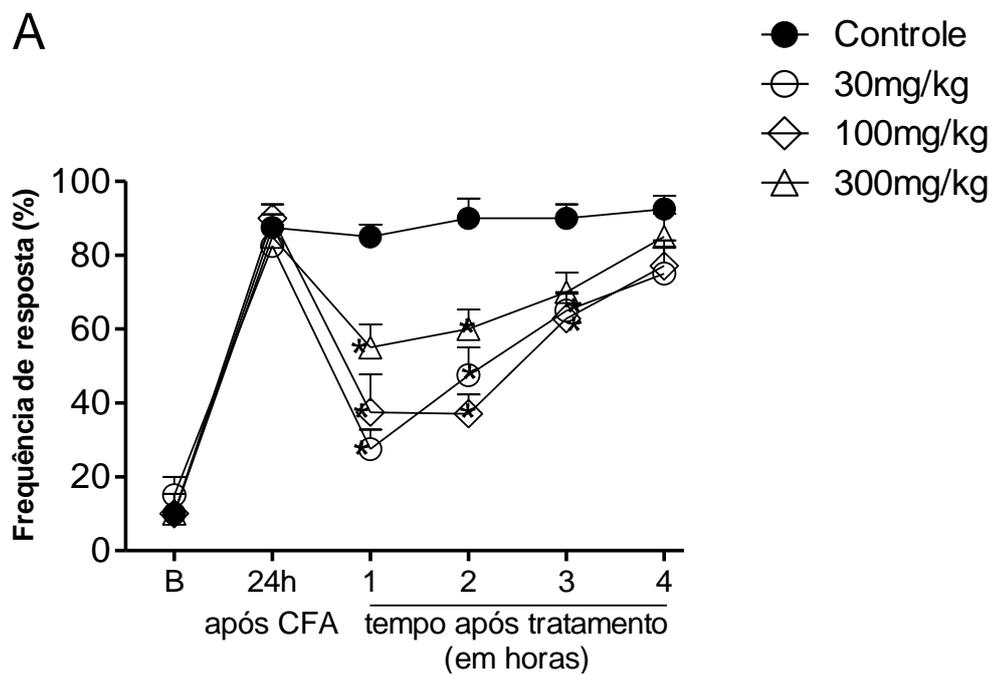
Legenda: A) Efeito do EBCR sobre a alodinia mecânica. B) Efeito do EBCR sobre o edema. Os efeitos foram observados entre 1 a 5 horas após a injeção i.pl. de carragenina (300 µg/pata) na pata traseira dos animais. Dados apresentados como a média ± S.E.M. (n= 6 a 12). (\*)  $p \leq 0,05$ , ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni.

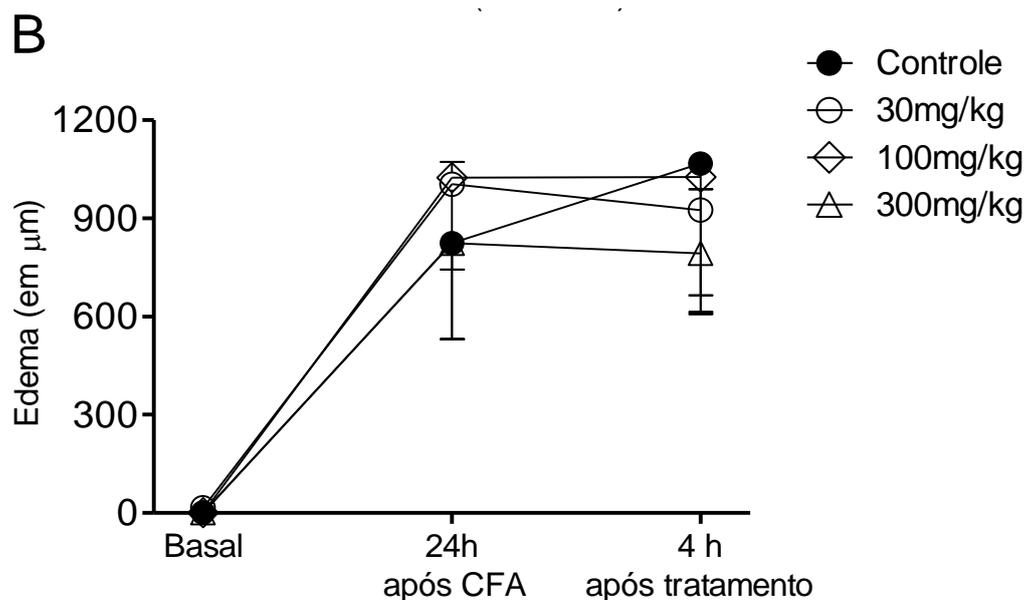
#### 4.3 PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIARTRÍTICA DO EBCR

### 4.3.1 Modelo do Adjuvante Completo de Freund (CFA)

Conforme pode ser observado na Figura 18, depois de 24 h da injeção i.pl. do CFA na pata traseira dos camundongos observou-se expressiva alteração da nocicepção, na forma de alodinia mecânica, bem como de edema de pata nos animais. O tratamento com diferentes doses do EBCR reduziu a alodinia mecânica mesmo na menor dose avaliada no estudo, no período entre a 1<sup>a</sup> e a 3<sup>a</sup> hora após o mesmo (Figura 18A); entretanto não promoveu alteração de edema induzido por este na quarta hora após o tratamento dos animais (Figura 18B).

Figura 18 - Influência do EBCR sobre a alodinia mecânica e o edema no modelo de artrite reumatoide induzida por CFA em camundongos.





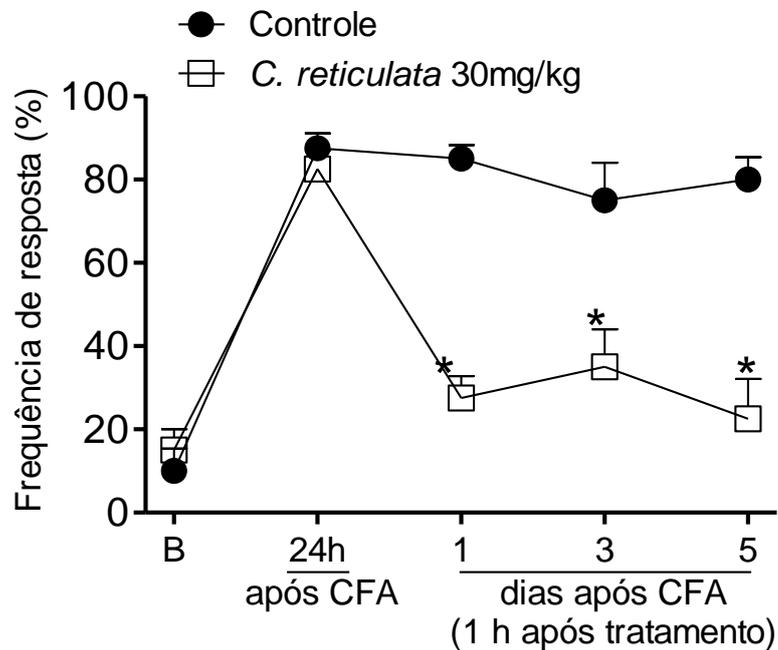
Legenda: A) Ação do EBCR sobre alodinia mecânica. B) Ação do EBCR sobre o edema. O tratamento com o EBCR foi realizado 24 h após a indução da inflamação pela administração i.pl. com o agente. Dados apresentados como a média  $\pm$  S.E.M. (n= 6 a 12). (\*)  $p \leq 0,05$ , ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni.

De acordo com a Figura 19, pode-se notar que o efeito sobre a alodinia mecânica observado 1 h após o tratamento dos animais com a dose de 30 mg/kg do EBCR foi reproduzido ao longo dos demais dias de avaliação realizados neste estudo.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DOS SISTEMAS OPIOIDÉRGICO E ADENOSINÉRGICO SOBRE OS EFEITOS DO EBCR

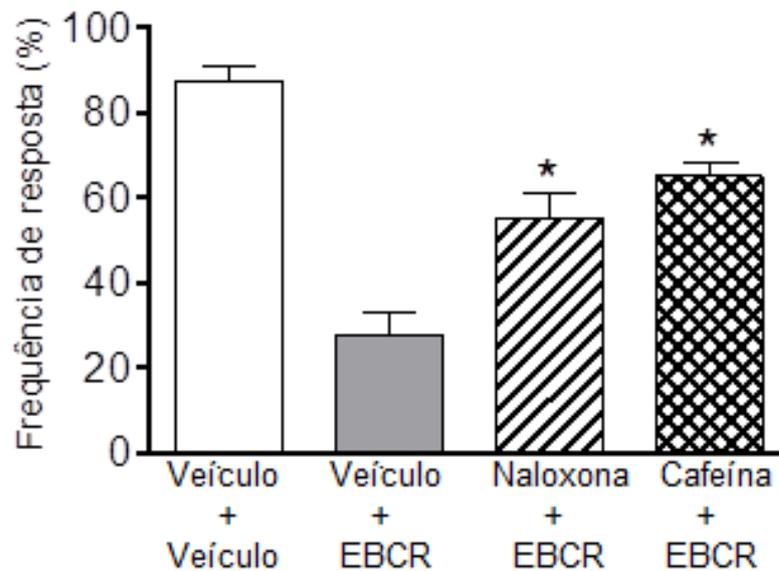
Conforme pode ser observado na Figura 20, o tratamento prévio (1 hora) depois com naloxona (antagonista não-seletivo de receptores opióides, 1 mg/kg, s.c.) ou cafeína (antagonista não-seletivo de receptores adenosinérgicos, 10 mg/kg, s.c.), reverteram a alodinia mecânica ( $55,0 \% \pm 6,3$  e  $65,0 \% \pm 3,3$ , respectivamente) do EBCR (30 mg/kg, via oral:  $27,5 \% \pm 5,2$ ) no 3º dia após indução da artrite reumatoide pela injeção i.pl. do CFA na pata traseira de camundongos.

Figura 19 - Decurso temporal do efeito do EBCR sobre a alodinia mecânica no modelo de artrite reumatoide induzida por CFA em camundongos.



Legenda: O tratamento com o EBCR foi realizado nos dias 1, 3 e 5 após a indução da inflamação pela administração i.pl. com o agente. Dados apresentados como a média  $\pm$  S.E.M. (n= 6 a 12). (\*)  $p \leq 0,05$ , ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni.

Figura 20 - Influência dos sistemas opioidérgico e adenosinérgico no efeito do EBCR sobre a alodinia mecânica no modelo de artrite reumatoide induzida por CFA em camundongos.



Legenda: Dados apresentados como a média  $\pm$  S.E.M. (n= 6 a 12). (\*)  $p \leq 0,05$ , ANOVA de uma via, seguida de Tukey.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO EBCR SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA DE CAMUNDONGOS

Conforme pode ser observado na Tabela 1, o tratamento dos animais com o EBCR na dose de 30 mg/kg, não alterou o tempo de permanência (em s) destes sobre a barra rotatória (22 r.p.m.), empregado como índice de avaliação da coordenação motora, em nenhum dos tempos de observação.

Tabela 1 - Avaliação da influência do EBCR de *Citrus reticulata* sobre a atividade locomotora de camundongos.

Tratamento	Período de observação após tratamento		
	1 h	2 h	24 h
Veículo	90,0 s ± 0,0	90,0 s ± 0,0	90,0 s ± 0,0
EBCR 30 mg/Kg	85,5 s ± 4,5 <sup>ns</sup>	85,5 s ± 4,5 <sup>ns</sup>	90,0 s ± 0,0 <sup>ns</sup>

EBCR: extrato bruto hidroalcoólico de *Citrus reticulata*; veículo: salina (0,1 ml/kg). Dados apresentados como média ± S.E.M (erro padrão da média, n= 6–12 animais). ANOVA de uma via seguida de teste T de *Student* ( $p < 0,05$ ); <sup>(ns)</sup>: não-significante em relação ao grupo controle (veículo).

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou importante ação antinociceptiva para o extrato preparado à base de cascas do fruto da planta *Citrus reticulata* (EBCR), conhecida popularmente como Ponkan, em diferentes modelos animais de nocicepção e AR. A demonstração desta propriedade para esse extrato é bastante promissor, uma vez que estudos de novas substâncias com potencial analgésico com menores efeitos colaterais, principalmente de origem natural, vêm sendo importante alvo de investigação no cenário brasileiro. O extrato obtido apresentou teor de naringenina similar a de outros estudos mas não significativo, sugerindo que as propriedades antinociceptivas encontradas para o EBCR possam ser dependentes também de outros flavonoides e compostos fenólicos presentes nas cascas desta planta.

O gênero *Citrus* é uma das culturas mais importantes em todo o mundo, suas cascas são ricas em compostos fenólicos e flavonoides, possuindo elevado potencial antioxidante (Li et al., 2006; SOOD et al, 2009). Atualmente se busca conhecer as variedades das tangerinas, como a ponkan, além de quantificar seus compostos e seu papel antioxidantes e anti-inflamatório (ZHANG et al, 2014). O teor de flavonoides na casca da *Citrus reticulata* varia conforme o tempo de colheita e o amadurecimento da planta, porém é unânime a presença de flavonoides como hesperitina, nobiletina e tangeritina, além da naringenina que pode não estar presente em todas as variedades (NOGATA et al, 2006; TRIPOLI et al. 2007).

No presente estudo, as cascas para a obtenção do EBCR foram obtidas do fruto maduro e assim encontramos um teor de naringenina de 0.29 mg/g de extrato. Esse resultado foi diferente ao encontrado em outro estudo, no qual a casca dessa fruta não apresentou teor de naringenina (NOGATA et al, 2006). Em outro trabalho, ainda, algumas variedades da *Citrus reticulata* não apresentaram teor de naringenina ou apresentaram teor entre 0,05 a 0,49 mg/g de peso seco, apesar de todas apresentarem hesperidina, nobiletina e tangeritina (ZHANG et al, 2014).

A utilização de modelos de nocicepção aguda tais como testes do glutamato, da formalina e da carragenina, no estudo atual, serviu para uma triagem preliminar da capacidade do extrato de planta em promover ação antinociceptiva, já que a dor é o principal sintoma a ser eliminado durante a AR. No teste do glutamato podemos analisar o efeito sobre os receptores glutamatérgicos, sejam estes ionotrópicos (iGluRs) ou metabotrópicos (mGluRs). Os iGluRs incluem os receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato), AMPA (amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid) e cainato sendo acoplados a canais iônicos, são

considerados excitatórios, e são ativados nos terminais aferentes primários levando à inibição da liberação do transmissor (BARDONI et al., 2004). O mGluRs estão acoplados a proteínas G, através dos neurônios sensoriais periféricos auxiliam na modulação da transmissão nociceptiva, este atua liberando mensageiros secundários no citoplasma ou influenciando a interação dos canais iônicos com proteína G dentro da membrana (KARIN; BHAVE; GEREAU IV, 2001; FREITAS et al., 2009).

O fato do EBCR não ter efeito sobre mGluRs e iGluRs é comum, já que diferentes fármacos com ação antinociceptiva, tanto periférica quanto central, demonstraram que este efeito é independente de mecanismos relacionados à interação com receptores glutamatérgicos (SCHEIDT et al., 2002; ROSA et al., 2005; BATISTA et al., 2008; FREITAS et al., 2009). Apesar disto, Martini e colaboradores (2007) demonstraram a capacidade do extrato hidroalcoólico de outra espécie do gênero *Citrus* em causar aumento da liberação de glutamato a partir do SNC de ratos.

Parte dos resultados obtidos ressaltam que a ação antinociceptiva do EBCR, parece ser mais proeminente sobre o tipo de dor inflamatória, uma vez que não alterou a resposta nociceptiva de animais em modelos de dor neurogênica como o teste do glutamato e a primeira fase do teste da formalina. Por outro lado, o óleo essencial de *Citrus limon* em estudo realizado por Campêlo e colaboradores (2011) apresentou resultado diferente, inibindo tanto a primeira quanto à segunda fase do teste da formalina e sugerindo seu papel tanto na sensibilização periférica quanto central.

No modelo de carragenina, tanto o tratamento profilático quanto o terapêutico com o EBCR mostraram efeito antinociceptivo, sendo maior a eficácia para o primeiro tipo de tratamento. Este achado pode indicar uma possível atuação do EBCR sobre a produção e liberação de classes de mediadores inflamatórios como histamina, serotonina, bradicinina, PGs, ON, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  E IL-6, responsáveis por diferentes fases da resposta nociceptiva, já que seu efeito persistiu até 4 horas após carragenina (MORRIS, 2003).

Como o EBCR apresentou efeito antiedematogênico somente no tratamento terapêutico, com pico máximo nas primeiras 2 horas após carragenina, podemos supor que sua ação está relacionada com a liberação dos mediadores histamina e serotonina, pois neste o edema ocorre pela liberação de histamina, serotonina e cininas, sendo que a fase mais tardia é relacionada à liberação de PGs (THOMSON; FOWLER, 1981). Este efeito antiedematogênico, segundo Mencherini e colaboradores (2013), também foi observado para o extrato hidroalcoólico de uma variação da espécie *Citrus aurantium* em modelos de edema induzidos por histamina e serotonina, enquanto o extrato etil-acetato da espécie *Citrus*

*decumana* foi eficaz em reduzir o edema induzido pela carragenina em ratos, também empregado no presente estudo (SOOD et al., 2009). Por conta destes últimos achados, acredita-se que o efeito do EBCR sobre o edema mereça ser melhor investigado em futuros estudos com modelos de inflamação, já que no presente trabalho o tratamento terapêutico dos animais com o mesmo foi capaz de reduzir o edema induzido pela carragenina.

A via de atuação do EBCR sobre a alodinia mecânica no modelo do CFA sugere também uma ação sobre mediadores derivados de células T, como as citocinas, já que estas também são ativadas por ação das micobactérias que constituem o mesmo sobre o tecido articular, levando a destruição articular e aumento da resposta imune (MATHIS; JALA; HARIBABU, 2007). A produção contínua de TNF- $\alpha$  por células T efetoras e outras células inflamatórias é considerada a marca registrada da AR, sendo que seu bloqueio reduz os sintomas graves da doença (APOSTOLAKI et al., 2010). A IL-1 $\beta$  produz inflamação sistêmica por meio da ativação da ciclooxigenase (COX)-2 e consequente formação de PGE<sub>2</sub> no hipotálamo anterior, causando febre e dor (OLIVEIRA et al., 2011). Neste sentido, o flavonoide presente em frutas cítricas hesperidina já foi alvo de estudos em modelo de AR induzido por CFA, mostrando eficácia na diminuição da formação do pannus e infiltração de células inflamatórias, por meio da inibição da produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  secretadas por macrófagos, bem como pela supressão da proliferação de linfócitos T (LI et al., 2008).

No teste da formalina o EBCR não atuou na 1ª fase, onde ocorre a liberação de substância P e bradicinina, os quais levam a ativação direta dos neurônios nociceptivos da VAN; porém apresentou efeito antinociceptivo na 2ª fase, onde ocorre, novamente, a produção de mediadores inflamatórios tais como histamina, serotonina, PG e bradicinina, que levam à sensibilização de neurônios aferentes primários na periferia e consequente ativação de neurônios secundários em nível da medula espinhal (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

A ação do EBCR nos modelos de nocicepção inflamatória como a segunda fase do teste da formalina e o modelo da carragenina reforçam os achados observados quanto à redução da dor no modelo de AR induzida por CFA, sugerindo uma importante ação dos fitoconstituintes presentes no mesmo sobre o sintoma de dor observada durante esta condição de origem inflamatória em humanos, sendo que muitas drogas utilizadas clinicamente no tratamento da AR também atuam nessa fase, como é o caso dos corticosteroides e dos AINEs (OHKUBO et al., 1990; ELHABAZI et al., 2006; TAMANDDONFARD et al., 2013).

Além disso, a naringenina, flavonóide usado como marcador no presente estudo, também apresentou efeito benéfico em modelo animal de osteoartrite segundo Kawaguchi et al. (2011), atenuando a resposta inflamatória pela redução da produção de TNF- $\alpha$ ; ou segundo Fang et al. (2010), diminuindo a expressão das células T; contudo, pela baixa concentração deste marcador para o EBCR no presente estudo, resultados conclusivos não podem ser retirados quanto à ação exclusiva do mesmo.

Com relação ao fato de a resposta antinociceptiva do EBCR (30mg/Kg) não ter sido acumulativa quando do tratamento diário, estudo realizado por Kanaze et al. (2007) também demonstrou que o tempo de meia-vida para a naringenina é em torno de 2 horas, o que pode sugerir que outros flavonóides também apresentem maior eficácia nas primeiras horas após sua administração, conforme observado no presente estudo para o modelo do CFA e, decaindo a partir de então. Por outro lado, o fato de o EBCR ter apresentado ação antinociceptiva mesmo em doses menores (30 mg/kg) do que aquelas empregadas para fármacos analgésicos atualmente usados na AR reforça uma importante possibilidade de uso clínico do mesmo para o alívio da dor nesta condição, podendo o mesmo ser consumido diariamente como nutracêuticos ou fitoterápicos de uso contínuo.

Quanto a uma possível ação do EBCR sobre as vias neurais para ascensão da informação nociceptiva, esta não pode ser completamente descartada, uma vez que as análises de mecanismo de ação do EBCR no presente estudo demonstraram que sua atividade antinociceptiva é afetada por antagonistas dos sistemas opioidérgico (naloxona) e adenosinérgico (cafeína), que exercem papel modulador sobre a condução da informação dolorosa pelas VAN (MILLAN, 2002). A ação da naloxona pode estar associada a sua interação com receptores opioidérgicos presentes tanto na via descendente nociceptiva, bem como sobre neurônios do corno dorsal ou nas fibras sensoriais primárias, levando à inibição da atividade destes neurônios nociceptivos (REN; DUBNER, 2009). A contribuição de uma ação periférica do sistema opióide no processo de reversão da alodinia mecânica no modelo do CFA do presente estudo é reforçada uma vez que o processo inflamatório que ocorre após a injeção do CFA leva ao recrutamento de monócitos e macrófagos, que são responsáveis por uma ação analgésica em outros modelos (SAUER et al., 2014).

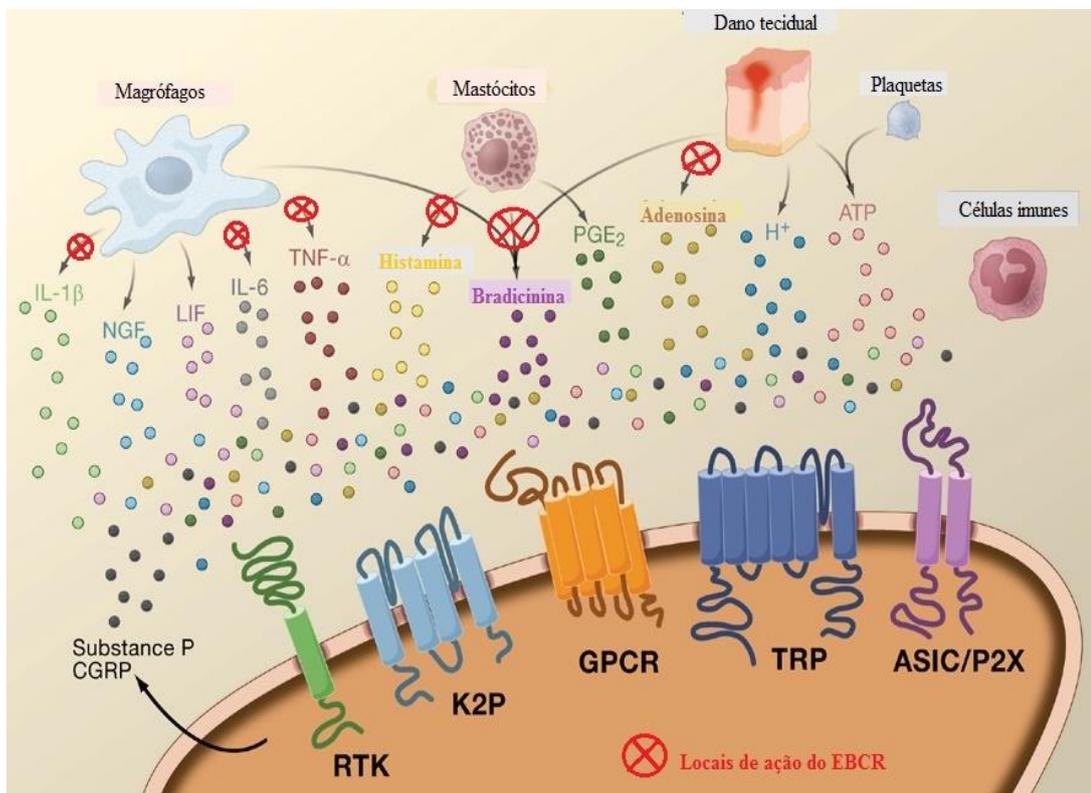
Sobre o sistema adenosinérgico, sabe-se que a adenosina é liberada em condições inflamatórias, e possui quatro subtipos de receptores que possuem tanto atividade anti-inflamatória como pró-inflamatórias, denominados A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, (AKKARI et al, 2006). Segundo Sawynok (2007) os receptores para adenosina estão altamente implicados na modulação da nocicepção, sendo que os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> possuem atividade

antinociceptiva e são ativos em modelos animais de dor neuropática e inflamatória (HASKO et al., 2008). O receptor  $A_{2A}$  possui efeito na produção de citocinas por macrófagos, principalmente limitando a produção de TNF- $\alpha$ , após a ativação dos macrófagos no processo inflamatório (HASKO et al., 2008). Em pacientes com AR os receptores  $A_{2A}$  e  $A_3$  agem diminuindo as citocinas inflamatórias tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, sendo importantes no controle da inflamação (VARANI et al., 2011). A ação da adenosina é antagonizada pela cafeína, que impede a estimulação do SNC e a constrição de vasos sanguíneos. Em baixas concentrações a cafeína age inibindo os receptores de adenosina  $A_1$ ,  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  (SAWYNOK, 2011). No presente estudo podemos supor um efeito do sistema adenosinérgico no EBCR pela atividade dos receptor  $A_2$ , já que outros medicamentos analgésicos que têm sua ação revertida pela cafeína também possuem afinidade pelos receptores  $A_2$ , como é o caso do metotrexato e do paracetamol (MONTESINOS et al., 2000; GODFREY et al., 2006; SAWYNOK; REID; FREDHOLM, 2008). Além disso, quanto à participação do sistema adenosinérgico na ação do EBCR, sabe-se que os opióides induzem a liberação da adenosina na medula espinal, atuando esta como um neuromodulador que produzir efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios, por ativação da via descendente de controle da dor, podendo este sistema também ser eficaz no controle da inflamação periférica, que durante a artrite auxiliaria na redução dos danos causados pelos mediadores inflamatórios (SAWYNOK, 1998; BOYLE et al., 2002; SAWYNOK; LIU, 2003; PEREIRA, 2005).

Por sua vez a ausência de efeito do EBCR sobre o edema, na maior parte dos modelos avaliados no presente trabalho, revela que possivelmente a atuação do mesmo seja seletiva sobre componentes que atuem sobre as vias relacionadas à detecção e percepção da dor, embora o mesmo também seja um importante sintoma observado em quadros inflamatórios. Apesar disto, foi observado por Cakir Gungor et al. (2014), que tanto a hesperidina quanto a nobiletina, flavonóides presente em frutas cítricas, reduziram o edema observado em diferentes modelos no útero ou no cérebro de ratos (YASUDA et al., 2014).

Conforme esquema apresentado na Figura 21 a seguir, estes achados sugerem que possivelmente o mecanismo de ação antinociceptiva do EBCR interfira com fatores que causem sensibilização periférica e/ou da medula espinal que são conhecidos nos modelos estudados, tais como mediadores inflamatórios (histamina, serotonina, bradicinina e citocinas liberadas por células T e macrófagos), além dos componentes neurobiológicos que modulam a transmissão e ascensão da informação dolorosa envolvendo os sistemas opioidérgicos e adenosinérgicos (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001; GRANADOS-SOTO et al, 2001; MORRIS, 2003; BAGGIO, 2010).

Figura 21 – Inibição de alguns mediadores inflamatórios pela ação do EBCR.



Legenda: Após o dano tecidual ocorre a liberação dos mediadores inflamatórios: serotonina, histamina, o glutamato, o ATP, a adenosina, substâncias P, calcitonina-gene relacionado ao peptídeo (CGRP), a bradicinina, PGE2, tromboxanos, leucotrienos, endocanabinóides, TNF- $\alpha$ , IL-1, proteases extracelulares e prótons. Esses fatores atuam diretamente sobre o nociceptor por ligação aos receptores celulares da superfície, incluindo receptores acoplados à proteína G (GPCR), canais TRP, canais iônicos sensíveis ao ácido (ASIC), os canais de potássio de dois poros (K2P), e receptores tirosina-quinases (RTK), conforme representado no terminal do nociceptor periférico. O EBCR atua inibindo a liberação de alguns mediadores.

Fonte: adaptado de Bausbaum et al, 2009.

Com relação à possibilidade de possíveis efeitos inespecífico do EBCR, como sobre o SNC e sobre o relaxamento muscular ou sedação, que segundo Guimarães e colaboradores (2012) podem reduzir a resposta da coordenação motora e assim invalidar os resultados dos testes comportamentais; o teste do rota-rod demonstrou que a dose selecionada do mesmo para a maioria dos testes de nocicepção não alterou a locomoção motora dos animais no tempo de pré-tratamento empregado no estudo (1 hora), bem como em períodos mais prolongados (2 ou 24 horas).

## 6. CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os presentes resultados indicam importante ação antinociceptiva para o EBCR, inclusive em modelo de AR; apesar de o efeito do extrato sobre o edema, bem como o mecanismo de ação para esta última atividade, merecerem ser investigados mais apropriadamente.

Os achados são também promissores no sentido da possível utilização das cascas da *Citrus reticulata* pela indústria farmacêutica como fonte de compostos para a produção de medicamentos fitoterápicos, bem como por indústrias alimentícias que desejem empregar recursos naturais na fabricação de nutracêuticos com possível efeito terapêutico sobre diferentes condições inflamatórias (CHAUHAN et al., 2013).

## 7. REFERÊNCIAS

- Adelina R, Supriyati MD, Nawangsari DA, Jenie RI, Meiyanto E, (2008b). Citrus reticulata Peels Modulate Blood Cholesterol Profile and Increased Bone Density of Ovariectomized Rats. Indonesian J Biotechnology. 2008; 12: 1092-7.
- Aho K, Heliövaara M. Risk factors for rheumatoid arthritis. Annals of Medicine. 2004; 36 (4):242–51.
- Ainola MM, Mandelin JA, Liljeström MP, Li TF, Hukkanen MV, Konttinen YT. Pannus invasion and cartilage degradation in rheumatoid arthritis: Involvement of MMP-3 and interleukin-1. Clinical and Experimental Rheumatology. 2005; 23: 644-650.
- Al-Okbi SY. Nutraceuticals of anti-inflammatory activity as complementary therapy for rheumatoid arthritis. Toxicol Ind Health [Internet]. 2012 [Acesso em: jun. de 2014]. Disponível em : <http://tih.sagepub.com/content/early/2012/10/25/0748233712462468>.
- Albano MN, Silveira MR, Danielski LG, Florentino D, Petronilho F, Piovezan AP. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). Journal of Ethnopharmacology. 2013; 147: 612–17.
- Alexandre RF, Bagatine F, Simões CMO. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. Rev. Brasileira de Farmacognosia. 2008; 18(1): 117-26.
- Al-Rejaie SS, Abuohashish HM, Al-Enazi MM, Al-Assaf AH, Parmar MY, Ahmed MM. Protective effect of naringenin on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. World J Gastroenterol. 2013; 19(34): 5633-44.
- Akkari R, Burbiel JC, Hockemeyer J, Müller CE. Recent progress in the development of adenosine receptor ligands as antiinflammatory drugs. Curr Top Med Chem. 2006; 6(13):1375-99.
- Andreas K, Lübck C, Häupl T, Dehne T, Morawietz L, Ringe J, et al. Key regulatory molecules of cartilage destruction in rheumatoid arthritis: an *in vitro* study. Arthritis Research & Therapy. 2008; 10:1-17.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 14, de 31 de março de 2010: Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília: 2010.
- Apostolaki M, Armaka M, Victoratos P, Kollias G. Cellular Mechanisms of TNF Function in Models of Inflammation and Autoimmunity. Curr Dir Autoimmun. 2010; 11: 1–26.
- Ataie-Kachoie P, Pourgholami MH, Morris DL. Inhibition of the IL-6 signaling pathway: A strategy to combat chronic inflammatory diseases and câncer. Cytokine & Growth Factor Reviews. 2013; 24 (2):163-73.
- Azevedo AB, Ferraz MB, Ciconelli RM. Indirect costs of rheumatoid arthritis in Brazil. Value Health. 2008; 11(5):869-77.

Azuma T, Shigeshiro M, Kodama M, Tanabe S, Suzuki T. Supplemental Naringenin Prevents Intestinal Barrier Defects and Inflammation in Colitic Mice. *J. Nutr.* 2013; 143: 827–34.

Baggio CH, Freitas CS, Martins DF, Mazzardo L, Smiderle FR, Sasaki GL, et al. Antinociceptive Effects of (1→3),(1→6)-Linked  $\beta$ -Glucan Isolated From *Pleurotus pulmonarius* in Models of Acute and Neuropathic Pain in Mice: Evidence for a Role for Glutamatergic Receptors and Cytokine Pathways. *J Pain.* 2010; 11(10): 965-71.

Bardoni R, Torsney C, Tong CK, Prandini M, MacDermott AB. Presynaptic NMDA receptors modulate glutamate release from primary sensory neurons in rat spinal cord dorsal horn. *J. Neurosci.* 2004; 24: 2774–81.

Barros MBA, Francisco PMSB, Zanchetta LM, César CLG. Tendências das desigualdades sociais e demográficas na prevalência de doenças crônicas no Brasil, PNAD: 2003- 2008. *Ciênc Saúde Coletiva.* 2011; 16: 3755-68.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell.* 2009; 139(2): 267–284.

Batista PA, Werner MF, Oliveira EC, Burgos L, Pereira P, Brum LF, et al. Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)- linalool in mice. *Neurosci Lett.* 2008; 440(3): 299-303.

Beirith A, Santos AR, Calixto J B. Mechanisms underlying the nociception and paw edema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Research.* 2002; 924: 219-28.

Bermejo A, Llosá MJ, Cano A. Analysis of bioactive compounds in seven citrus cultivars. *Food Sci Technol Int.* 2011; 17(1):55-62.

Bertolo M B, Brenol CV, Schainberg CG, Neubarth F, Lima FAC, Laurindo IM, et al. Atualização do consenso brasileiro no diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide. *Revista Brasileira de Reumatologia.* 2007; 47(3):151-59.

Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* 2001; 70(6):849-60.

Birnbaum H, Pike C, Kaufman R, Marynchenko M, Kidolezi Y, Cifaldi M. Societal cost of rheumatoid arthritis patients in the US. *Current Medical Research and Opinion.* 2010; 26(1):77–90.

Bladley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008 Jan; 214(2):149-60.

Bleakman D, Alt A, Nisenbaum ES. Glutamate receptors and pain. *Semin Cell Dev Biol.* 2006; 17: 592–604.

Boyle DL, Moore J, Yang L, Sorkin LS, Firestein GS. Spinal adenosine receptor activation inhibits inflammation and joint destruction in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; 46(11):3076-82.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de maio/2006 - Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Brasília: 2006.

BRASIL. Ministério da saúde. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME). Brasília: 2012.

Brioschi EFC, Brioschi ML, Yeng LT, Teixeira MJ. Nutrição funcional no paciente com dor crônica. *Revis. Dor.* 2009;10(3): 276-85.

Cakir Gungor AN, Gencer M, Karaca T, Hacivelioglu S, Uysal A, Korkmaz F, et al. The effect of hesperetin on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Arch Gynecol Obstet* [Internet]. 2014 [Acesso em: maio de 2014]. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00404-014-3267-8>.

Campêlo LML, Almeida AAC, Freitas RLM, Cerqueira GS, Sousa GF, Saldanha GB, et al. Antioxidant and Antinociceptive Effects of Citrus limon Essential Oil in Mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2011; 1-8.

Cascão R, Rosario HS, Souto-Carneiro MM, Fonseca JE: Neutrophils in rheumatoid arthritis: more than simple final effectors. *Autoimmun Rev* 2010, 9:531–535

Cascão R, Rosário HS, Fonseca JE. Neutrophils: warriors and commanders in immune mediated inflammatory diseases. *Acta Reumatol Port.* 2009; 34 (2): 313-26.

Catay E, Castel del Cid C, Narváez L, Velozo EJ, Rosa JE, Catoggio LJ, et al. Cost of rheumatoid arthritis in a selected population from Argentina in the prebiologic therapy era. *Clinico Economics and Outcomes Research.* 2012; 4: 219–25.

CDC - Centers for Disease Control and Protection. Prevalence of doctor diagnosed arthritis attributable activity information- United States, 2010-2012. *MMWR.* 2012; 62(44); 869-73.

César TB, Rodrigues LU, Araújo MSP, Aptekmann NP. Suco de laranja reduz o colesterol em indivíduos normolipidêmicos. *Revista Nutr.* 2010; 23(5): 779-89.

Chao CL, Weng CS, Chang NC, Lin JS, Kao ST, Ho FM. Naringenin more effectively inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in macrophages than in microglia. *Nutr. Res.* 2010; 30:858-64.

Chauhan B, Kumar G, Kalam N, Ansari SH. Current concepts and prospects of herbal nutraceutical: A review. *J Adv Pharm Technol Res.* 2013; 4(1): 4–8.

Chen L, Lu Y, Chu Y, Xie J, Ding W, Wang F. Tissue factor expression in rheumatoid synovium: a potential role in pannus invasion of rheumatoid arthritis. *Acta Histochem.* 2013; 115(7):692-7.

Chrisnanto E, Adelina R, Putri DPP, Sahid MNA, Setyaningtiyas D, Jenie RI et al. Antiangiogenic effect of ethanol extract of Citrus reticulata peel in the Chorio Allantoic Membrane (CAM) induced by bFGF, Proceeding. *The International Symposium on Molecular Targeted Therapy.* 2008; ISBN (978-979-95107-6-1): 57-66.

Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2012; 51(3):10.

Conselho Federal de Nutrição. Resolução CFN nº 525/2013: Regulamenta a Prática da Fitoterapia pelo Nutricionista, atribuindo-lhe competência para, nas modalidades que

específica, prescrever plantas medicinais, drogas vegetais e fitoterápicos como complemento da prescrição dietética e, dá outras providências. Brasília: 2013.

Costigan M; Scholz J; Woolf C J. Neuropathic pain: a maladaptive response of nervous system to damage. *The Annual Review of Neuroscience*. 2009; 32:1-32.

Das L, Bhaumik E, Raychaudhuri U, Chakraborty R. Role of nutraceuticals in human health. *J Food Sci Technol*. 2012; 49(2): 173–83.

Datta S, Kundu S, Ghosh P, De S, Ghosh A, Chatterjee M. Correlation of oxidant status with oxidative tissue damage in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology* [Internet]. 2014 [Acesso em: maio 2014]. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10067-014-2597-z>.

Dayer JM. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2003; 42(2): ii3–10.

De Mattos ES, Frederico MJ, Colle TD, De Pieri DV, Peters RR, Piovezan AP. Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 112:1–6.

Di Paola R, Cuzzocrea S. Predictivity and sensitivity of animal models of arthritis. *Autoimmun Rev*. 2008; 8(1):73-5.

Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby DA. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol*. 1971; 104: 15-28.

Doherty TA, Brydges SD, Hoffman HM, Autoinflammation: translating mechanism to therapy. *J Leukoc Biol*. 2011; 90(1): 37–47.

Dornas WC, Olivera TT, Rodrigues-das-Dores RG, Santos AF, Nagem TJ. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl*. 2007; 28(3): 241-49.

Dray A. Neuropathic pain: emerging treatments. *Br J Anaesth*. 2008; 101(1):48-58.

Duncan C. Terapia Clínica Nutricional para Doenças Reumáticas. In: Mahan LK, Escott-Stump S, Krause MV. *Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia*. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. p. 1047-1050.

Duzzioni AG, Franco AG, Duzzioni M, Sylos CM. Determination of antioxidant activity and antioxidant constituents of citrus fruits. *Alim.Nutr. Araraquara*. 2010; 21(4): 643-49.

Elhabazi K, Aboufatima R, Benharref A, Zyad A, Chait A, Dalal A. Study on the antinociceptive effects of *Thymus broussonetii* Boiss extracts in mice and rats. *J Ethnopharmacol*. 2006; 107(3):406-11.

Fang F, Tang Y, Gao Z, Xu Q. A novel regulatory mechanism of naringenin through inhibition of T lymphocyte function in contact hypersensitivity suppression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 397:163–69.

Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2008; 152(3):415-22.

Francis FYL, Ethel SKN. Substance P and glutamate receptor antagonists improve the anti-arthritic actions of dexamethasone in rats. *British Journal of Pharmacology*. 2010; 159: 958–69.

Freitas CS, Baggio CH, Twardowschy A, dos Santos AC, Mayer B, Luiz AP, et al. Involvement of glutamate and cytokine pathways on antinociceptive effect of *Pfaffia glomerata* in mice. *J Ethnopharmacol*. 2009; 122(3):468-72.

Fuller R. Critério de classificação da artrite reumatoide ACR-EULAR 2010. *Rev Bras Reumatol*. 2010; 50(5):481-86.

Gabriel SE, Michaud K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(3): 229.

Godfrey L, Yan L, Clarke GD, Ledent C, Kitchen I, Hourani SMO. Modulation of paracetamol antinociception by caffeine and by selective adenosine A2 receptor antagonists in mice. *Eur J Pharmacol*. 2006; 531:80–6.

Goeldner I, Skare TL, Reason IT, Utiyam SRR. Artrite reumatoide: uma visão atual *J Bras Patol Med Lab*. 2011; 47(5): 495-503.

Gomes RS, Peres KG. Desigualdades socioeconômicas e demográficas como fatores de risco para a artrite auto-referida: estudo de base populacional em adultos no Sul do Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 2012; 28 (8):1506-16.

Guimarães AG, Gomes SV, Moraes VR, Nogueira PC, Ferreira AG, Blank AF, et al. Phytochemical characterization and antinociceptive effect of *Lippia gracilis* Schauer. *J Nat Med*. 2012; 66(3):428-34.

Granados-Soto V, Alonso-López R, Asomoza-Espinosa R, Rufino MO, Gomes-Lopes LD, Ferreira SH. Participation of COX, IL-1 beta and TNF alpha in formalin-induced inflammatory pain. *Proc West Pharmacol Soc*. 2001; 44:15-7.

Gray GS. Epigenetic-based immune intervention for rheumatic diseases. *Epigenomics*. 2014; 6(2): 253-71.

Han H, Lee KS, Rong W, Zhang G. Different roles of peripheral mitogen-activated protein kinases in carrageenan-induced arthritic pain and arthritis in rats. *Anesth Analg*. 2012; 115(5):1221-7.

Hasko GJ, Linden, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2008; 7(9):759-70.

Hata H, Sakaguchi N, Yoshitomi H, Iwakura Y, Sekikawa K, Azuma Y, et al. Distinct contribution of IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. *J. Clin. Invest*. 2004; 114:582–88.

Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC, Gabriel S, Hirsch R, Kwoh CK, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(1):15-25.

Her M, Kavanaugh A. Critical analysis of economic tools and economic measurement applied to rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2012; 30(4 Suppl 73):S107-11.

Hinoi E, Yoneda Y. Possible involvement of glutamatergic signaling machineries in pathophysiology of rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Sci.* 2011; 116(3): 248-56.

Huang Y, Ho S. Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel. *Food Chemistry.* 2010; 119:868-73.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária. Produção Agrícola Municipal: culturas temporárias e permanentes. Rio de Janeiro. 2012; 39:1-101.

Imada K, Lin N, Liu C, Lu A, Chen W, Yano M, et al. Nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, suppresses gene expression and production of aggrecanases-1 and -2 in collagen induced arthritic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 373:181-5.

Jain A, Yadav A, Bozhkov AI, Padalko VI, Flora SJ. Therapeutic efficacy of silymarin and naringenin in reducing arsenic-induced hepatic damage in young rats. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2011; 74:607-14.

Ji RR, Woolf CJ. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiology of Disease.* 2001; 8(1):1-10.

Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 2001; 413(6852):203-10.

Kanaze FI, Bounartzi MI, Georgarakis M, Niopas I. Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *European Journal of Clinical Nutrition.* 2007; 61: 472-77.

Karim F, Bhavé G, Gereau IV RW. Metabotropic glutamate receptors on peripheral sensory neuron terminals as targets for the development of novel analgesics. *Mol Psychiatry.* 2001; 6(6): 615-7.

Kawaguchi K, Maruyama H, Hasunuma R, Kumazawa Y. Suppression of inflammatory responses after onset of collagen-induced arthritis in mice by oral administration of the Citrus flavanone naringin. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2011; 33(4):723-9.

Kim HW, Kwon YB, Ham TW, Roh DH, Yoon SY, Han HJ, et al. The antinociceptive and anti-inflammatory effect of ethyl acetate extracts from Bang-Poong (*Radix ledebouriellae*) on the Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *J Vet Sci.* 2002; 3(4):343-9.

Kinloch A, Lundberg K, Wait R, Wegner N, Lim NH, Zendman AJ, et al. Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(8):2287-95.

Kjeldsen-Kragh J. Mediterranean diet intervention in rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis*. 2003; 62(3):193–95.

Klareskog L, Wedren S, Alfredsson L. On the origins of complex immune-mediated disease: the example of rheumatoid arthritis. *J Mol Med*. 2009; 87(4):357-62.

Klaumann PR, Wouk EFPF, Sillas T. Patofisiologia da dor. *Archives of Veterinary Science*, 2008; 13(1):1-12.

Kolasinski SL. Herbal Medicine for Rheumatic Diseases: Promises Kept? *Curr Rheumatol Rep*. 2012; 14:617–23.

Lam FF, Ng ES. Substance P and glutamate receptor antagonists improve the anti-arthritic actions of dexamethasone in rats. *Br J Pharmacol*. 2010; 159(4):958-69.

Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev*. 2011; 53:597–652.

Le Goff B, Blanchard F, Berthelota JM, Heymann D, Maugars Y. Role for interleukin-6 in structural joint damage and systemic bone loss in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2010; 77(3): 201–5.

Levy AS, Simon O, Shelly J, Gardener M. 6-Shogaol reduced chronic inflammatory response in the knees of rats treated with complete Freund's adjuvant. *BMC Pharmacol*. 2006; 1: 6-12.

Li R, Li J, Cai L, Hu CM, Zhang L. Suppression of adjuvant arthritis by hesperidin in rats and its mechanisms. *J Pharm Pharmacol*. 2008; 60(2):221-8.

Li S, Lo CY, Ho CT. Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. *J Agric Food Chem*. 2006; 54:4176–85

Lin N, Sato T, Takayama Y, Mimaki Y, Sashida Y, Yano M, et al. Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. *Biochem Pharmacol*. 2003; 65:2065-71.

Loeser JD, Melzack R. Pain: an overview. *Lancet*. 1999; 353(9164):1607-9.

Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*. 2008; 137(3):473-7.

Martini LH, Jung F, Soares FA, Rotta LN, Vendite DA, Frizzo ME, et al. Naturally occurring compounds affect glutamatergic neurotransmission in rat brain. *Neurochem Res*. 2007; 32(11):1950-6.

Martins DF, Rosa AO, Gadotti VM, Mazzardo-Martins L, Nascimento FP, Egea J, et al. The antinociceptive effects of AR-A014418, a selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3 beta, in mice. *J Pain*. 2011; 12(3):315-22.

Mathis S, Jala VR, Haribabu B. Role of leukotriene B4 receptors in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2007; 7(1):12-7.

- McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2011; 365(23): 2205–19.
- Melo MFF, Zickel CS. Os gêneros *Zanthoxylum* L. e *Esenbeckia* Kunth (Rutaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Botânica Brasileira.* 2004; 18(1):73-90.
- Mencherini T, Campone L, Piccinelli AL, Mesa MG, Sánchez DM, Aquino RP, et al. HPLC-PDA-MS and NMR characterization of a hydroalcoholic extract of *Citrus aurantium* L. var. amara peel with antiedematogenic activity. *J Agric Food Chem.* 2013; 61(8):1686-93.
- Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol.* 2002; 66(6):355-474.
- Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol.* 1999; 57:1-164.
- Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem.* 2011; 46(10):4769-807.
- Montesinos MC, Yap JS, Desai A, Posadas I, McCrary CT, Cronstein BN. Reversal of the anti-inflammatory effects of methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonists theophylline and caffeine. *Arth Rheum* 2000; 43:656–63.
- Moran MM, McAlexander MA, Bíró T, Szallasi A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10(8):601-20.
- Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol Biol.* 2003; 225:115-21.
- Mota LMH, Cruz BA, Brenol CV, Pereira IA, Fronzas LSR, Bertolo MB, et al. Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide. *Rev. Bras. Reumatol.* 2011; 51(3): 199-219.
- Mota LMH, Cruz BA, Brenol CV, Pereira IA, Rezende-Fronza LS, Bertolo MB, et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. *Rev. Bras. Reumatol.* 2012; 52(2): 152-174.
- Mota LMH, Laurindo IMM, Neto LLS. Principios gerais do tratamento da artrite reumatóide. *Rev Assoc Med Bras.* 2010; 56(3):360-2.
- Mulvihill E, Assini JM, Sutherland BG, DiMattia AS, Khami M, Koppes JB, et al. Naringenin Decreases Progression of Atherosclerosis by Improving Dyslipidemia in High-Fat–Fed Low-Density Lipoprotein Receptor–Null Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30:742-748
- Mulvihill E, Huff MW. Protection from Metabolic Dysregulation, Obesity, and Atherosclerosis by Citrus Flavonoids: Activation of Hepatic PGC1 $\alpha$ -Mediated Fatty Acid Oxidation. *PPAR Research.* 2012: 1-9.
- Nagy G, Clark JM, Buzas E, Gorman C, Pasztoi M, Koncz A, Falus A, Cope AP. Nitric oxide production of T lymphocytes is increased in rheumatoid arthritis. *Immunol Lett.* 2008; 118: 55-58.

- Nascimento FP, Figueredo SM, Marcon R, Martins DF, Macedo SJ Jr, Lima DA, et al. Inosine reduces pain-related behavior in mice: involvement of adenosine A1 and A2A receptor subtypes and protein kinase C pathways. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010; 334(2): 590-8.
- Nogata Y, Sakamoto K, Shiratsuchi H, Ishii T, Yano M, Ohta H. Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2006; 70:178-92.
- Nzeusseu AT, Delporte C, Noyon C, Franck T, Rousseau A, Serteyn D, et al. Myeloperoxidase and its products in synovial fluid of patients with treated or untreated rheumatoid arthritis. *Free Radic Res*. 2014; 48(4):461-5.
- Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomao R. Citocinas e Dor. *Rev Bras Anesthesiol*. 2011; 61(2):255-65.
- Ohkubo T, Shibata M, Takahashi H, Inoki R. Roles of substance P and somatostatin on transmission of nociceptive information induced by formalin in spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990; 252(3):1261-8.
- Osikowicz M, Mika J, Przewlocka B. The glutamatergic system as a target for neuropathic pain relief. *Exp Physiol*. 2013; 98(2):372-84.
- Osiri M, Maetzel A, Tugwell P. The economic burden of rheumatoid arthritis in a developing nation: results from a one-year prospective cohort study in Thailand. *J Rheumatol*. 2007; 34(1):57-63.
- Pereira IA, Mota LMH, Cruz BA, Brenol CV, Fronza LSR, Bertolo MB, et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia sobre o manejo de comorbidades em pacientes com artrite reumatoide. *Rev. Bras. Reumatol*. 2012; 52(4):483-95.
- Pereira MAS. Estudo da atividade antinociceptiva da adenosina em camundongos: Análise do mecanismo de ação [Dissertação]. Itajaí (SC): Universidade do Vale do Itajaí, Mestrado em Ciências Farmacêuticas; 2005.
- Pinheiro GRC, Khandker RK, Sato R, Rose A, Piercy J. Impact of rheumatoid arthritis on quality of life, work productivity and resource utilisation: an observational, cross-sectional study in Brazil. *Clin Exp Rheumatol*. 2013; 31(3):334-40.
- Pitcher GM, Henry JL. Nociceptive response to innocuous mechanical stimulation is mediated via myelinated afferents and NK-1 receptor activation in a rat model of neuropathic pain. *Exp Neurol*. 2004; 186(2):173-97.
- Qin L, Jin L, Lu L, Lu X, Zhang C, Zhang F, et al. Naringenin reduces lung metastasis in a breast cancer resection model. *Protein Cell*. 2011; 2(6):507-16.
- Rang HP, Dale MM. *Farmacologia*. 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- Rego CM. Artrite Reumatoide: Fisiopatologia e terapêutica biológica [Dissertação]. Covilhã (Portugal): Universidade da Beira Interior, Mestrado Integrado em Medicina; 2010.
- Rendas-baum R, Wallenstein GV, Koncz T, Kosinski M, Yang M, Bradley J, et al. Evaluating the efficacy of sequential biologic therapies for rheumatoid arthritis patients with an

inadequate response to tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitors. *Arthritis Research & Therapy*. 2011; 13(R25):1-15.

Ren K, Dubner R. Descending Control Mechanisms. In: Basbaum A I, Bushnell MC. *Science of pain*. San Diego: Elsevier; 2009. p.723-62.

Rennie KL, Hughes J, Lang R, Jebb AS. Nutritional management of rheumatoid arthritis: a review of the evidence. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*. 2003; 16(2): 97- 109.

Rincón AM, Vásquez AM, Padilla FC Composicion quimica y compuestos bioactivos de las harinas de cascaras de naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*) cultivadas en Venezuela. *Arch Latinoam Nutr*. 2005;55(3):305-10.

Roza JM, Xian-Liu Z, Guthrie N. Effect of citrus flavonoids and tocotrienols on serum cholesterol levels in hypercholesterolemic subjects. *Altern Ther*. 2007; 13(6):44-8.

Sangui D, Avasthi S, Singh A, Srivastava RN. Nutritional Factors and Osteoarthritis: A review article. *Internet Journal of Medical Update*. 2009; 4(1):42-53.

Santos ARS, Calixto JB. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuropeptides*. 1997; 31: 381–89.

Sauer RS, Hackel D, Morschel L, Sahlbach H, Wang Y, Mousa SA, et al. Toll like receptor (TLR)-4 as a regulator of peripheral endogenous opioid-mediated analgesia in inflammation. *Mol Pain*. 2014; 10(1):1-10.

Sawynok J. Adenosine and ATP receptors. *Handb Exp Pharmacol*. 2007; 177:309-28. 2007.

Sawynok J. Caffeine and pain. *Pain*. 2011; 152: 726-29.

Sawynok J, Reid AR, Fredholm BB. Caffeine reverses antinociception by amitriptyline in wild type mice but not in those lacking adenosine A1 receptors. *Neurosci Lett*, 2008; 440(2):181-184.

Sawynok J, Liu XJ. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Progress in Neurobiology*. 2003; 69: 313–40.

Sawynok, J. Adenosine receptor activation and nociception. *Eur.J. Pharmacol*. 1998; 317:1-11.

Schaible HG, Ebersberger A, Von Banchet GS. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 966: 343-354.

Scheidt C, Santos AR, Ferreira J, Malheiros A, Cechinel-Filho V, Yunes RA, et al. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimaniol. *Neuropharmacology*. 2002; 43(3):340-7.

Schett G. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis: Osteoclasts. *Arthritis Research & Therapy*. 2007; 9:203.

Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN). *Management of early rheumatoid arthritis*. Edinburgh: 2011.

- Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010; 376 (9746): 1094-108.
- Smith HS, Smith AR, Seidner P. Painful rheumatoid arthritis. *Pain Physician*. 2011; 14 (5): E427-58.
- Sood S, Arora B, Bansal S, Muthuraman A, Gill NS, Arora R, et al. Antioxidant, anti-inflammatory and analgesic potential of the *Citrus decumana* L. peel extract. *Inflammopharmacology*. 2009; 17(5):267-74.
- Spencer JPE, Vafeiadou K, Williams RJ, Vauzour D. Neuroinflammation: Modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Molecular Aspects of Medicine*. 2012; 33:83-97.
- Sun Y, Wang J, Gu S, Liu Z, Zhang Y, Zhang X. Simultaneous Determination of Flavonoids in Different Parts of *Citrus reticulata* 'Chachi' Fruit by High Performance Liquid Chromatography—Photodiode Array Detection. *Molecules*. 2010; 15:5378-88.
- Tamaddonfard E, Farshid AA, Eghdami K, Samadi F, Erfanparast A. Comparison of the effects of crocin, safranal and diclofenac on local inflammation and inflammatory pain responses induced by carrageenan in rats. *Pharmacol Rep*. 2013; 65(5):1272-80.
- Tanaka T, Ogata A, Kishimoto T. Targeting of Interleukin-6 for the Treatment of Rheumatoid Arthritis: A Review and Update. *Rheumatol Curr Res*. 2013; S4(002):1-14.
- Taylor P, Manger B, Alvaro-Gracia J, Johnstone R, Gomez-Reino J, Eberhardt E, et al. Patient perceptions concerning pain management in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Int Med Res*. 2010; 38:1213-24.
- Thomson AW, Fowler EF. Carrageenan: a review of its effects on the immune system. *Agents Actions*. 1981; 11(3):265-73.
- Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992; 51(1):5-17.
- Trevisani VFM, Fidelix TSA, Appenzeller S. Uso dos anti-inflamatórios não hormonais na artrite reumatoide, osteoartrite e na lombalgia. *RBM*. 2011; 69:26-31
- Tripoli E, Guardia ML, Giammanco S, Majo DD, Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A Review. *Food Chemistry*. 2007; 104:466-79.
- Varani K, Padovan M, Vicenzi F, Targa M, Trotta F, Govoni M, et al. A2A and A3 adenosine receptor expression in rheumatoid arthritis: upregulation, inverse correlation with disease activity score and suppression of inflammatory cytokine and metalloproteinase release. *Arthritis Research & Therapy*. 2011; 13:R197.
- Venkatesha SH, Rajaiah R, Berman BM, Moudgil KD. Immunomodulation of Autoimmune Arthritis by Herbal CAM. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011; 2011(986797):1-13.
- Vincent TL, Williams RO, Maciewicz R, Silman A, Garside P e Arthritis Research UK animal models working group. Mapping pathogenesis of arthritis through small animal models. *Rheumatology* 2012, 51(11):1931-41.

- Waheed A, Mahmud S, Saleem M, Ahmad T. Fatty acid composition of neutral lipid: Classes of Citrus seed oil. *Journal of Saudi Chemical Society* . 2009; 13: 269-72.
- Wegner N, Lundberg K, Kinloch A, Fisher B, Malmstrom V, Feldmann M, et al. Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews*. 2010; 233(1):34–54.
- Whitehouse MW. Adjuvant arthritis 50 years on: The impact of the 1956 article by C. M. Pearson, 'Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants'. *Inflamm Res*. 2007; 56 (4):133-8.
- WHO-World Health Organization. *Traditional Medicine Strategy 2002–2005*. Geneva; 2002.
- Wilcox LJ, Borradaile NM, Huff MW. Antiatherogenic Properties of Naringenin, a Citrus Flavonoid. *Cardiovascular Drug Reviews*. 1999; 17(2):160–78.
- Wilkins K. Incident arthritis in relation to excess weight. *Health Rep*. 2004; 15:39-49.
- Wooley PH. The usefulness and the limitations of animal models in identifying targets for therapy in arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2004; 18(1):47-58.
- Xu C, Chen J, Zhang J, Hu X, Jiang H. Naringenin inhibits vascular smooth muscle cell function involving reactive oxygen species production modulation and NF-KB activity suppression. *Heart*. 2011; 97(21): A83.
- Yang CLH, Or TCT, Ho MHK, Lau ASY. Scientific Basis of Botanical Medicine as Alternative Remedies for Rheumatoid Arthritis. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2013; 44:284–300.
- Yasuda N, Ishii T, Oyama D, Fukuta T, Agato Y, Sato A, et al. Neuroprotective effect of nobiletin on cerebral ischemia-reperfusion injury in transient middle cerebral artery-occluded rats. *Brain Res*. 2014; 1559: 46-54.
- Yazbek MA, Mazon SB, Rossi CL, Londe AC, Costallat LTL, Bértolo MB. Association analysis of anti-Epstein-Barr nuclear antigen-1 antibodies, anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, the shared epitope and smoking status in Brazilian patients with rheumatoid arthritis. *Clinics*. 2011; 66(8):1401-06.
- Yoshida Y, Tanaka T. Interleukin 6 and Rheumatoid Arthritis. *Biomed Res Inter* [Internet]. 2014 [Acesso em: fev. de 2014]; 2014(698313):1-12. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/698313>.
- Youn DH, Gerber G, Sather WA. Ionotropic glutamate receptors and voltage-gated Ca (2) (+) channels in long-term potentiation of spinal dorsal horn synapses and pain hypersensitivity. *Neural Plast* [Internet]. 2013 [Acesso em: mar. de 2014]; 2013(654257): 1-19. Disponível em: [http:// http://dx.doi.org/10.1155/2013/654257](http://dx.doi.org/10.1155/2013/654257).
- Zhang L, Li J, Yu S, Jin Y, Lv X, Zou Y, et al. Therapeutic effects and mechanisms of total flavonoids of *Turpinia Arguta* Seen on adjuvant arthritis in rats. *Food Chemistry*. 2007; 104: 466-79.

Zhang Y, Sun Y, Xi W, Shen Y, Qiao L, Zhong L, et al. Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. *Food Chemistry*. 2014; 145:674–80.