



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA



VANDA SANTANA QUEIROZ DINI

**O EFEITO DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera* spp.) SOBRE A
MORFOLOGIA DAS ARTICULAÇÕES DE CAMUNDONGOS NA
ARTRITE AGUDA INDUZIDA POR ZYMOSAN**

MANAUS
2021

VANDA SANTANA QUEIROZ DINI

O EFEITO DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera spp.*) SOBRE A MORFOLOGIA DAS ARTICULAÇÕES DE CAMUNDONGOS NA ARTRITE AGUDA INDUZIDA POR ZYMOSAN

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, para a obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

ORIENTADOR: DR. OSCAR TADEU FERREIRA DA COSTA

COORIENTADOR: DR. ANTÔNIO LUIZ RIBEIRO BOECHAT LOPES

MANAUS
2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

D585e Dini, Vanda Santana Queiroz
O efeito do óleo de copaíba (*Copaifera spp.*) sobre a morfologia das articulações de camundongos na artrite aguda induzida por zymosan / Vanda Santana Queiroz Dini . 2021
158 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Oscar Tadeu Ferreira da Costa
Coorientador: Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Zymosan. 2. estereologia. 3. morfologia. 4. microscopia eletrônica. 5. modelo animal. I. Costa, Oscar Tadeu Ferreira da. II. Universidade Federal do Amazonas

VANDA SANTANA QUEIROZ DINI

O EFEITO DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera spp.*) SOBRE A MORFOLOGIA DAS ARTICULAÇÕES DE CAMUNDONGOS NA ARTRITE AGUDA INDUZIDA POR ZYMOSAN

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, para a obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Data:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof^a Dra. Geane Antiques Lourenço
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof. Dr. André Luis Willerding
Centro de Biotecnologia do Amazonas - CBA

Prof^a Dra. Maria Cristina dos Santos
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira
Fundação de Medicina Tropical

Dedico esse trabalho ao meu esposo, Rodrigo Dini, que com muito carinho, apoio e cuidados durante toda minha trajetória acadêmica não mediu esforços para que eu concluísse essa meta de vida

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser a força que me inspira nos momentos mais difíceis.

Ao meu grande orientador, Dr. Oscar Costa, fonte de conhecimentos e ensinamentos, que com certeza contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. Além de toda paciência e atenção dada, tornando possível a conclusão deste projeto. *“O Sr. tem a minha eterna admiração e gratidão!”*

Aos companheiros(as) do laboratório, Lene, Violeta, Nayana, Gustavo, Pedro, Nadyelle, Aguyda, que sempre estiveram ao meu lado nessa jornada, contribuindo significativamente em muitas das etapas.

Ao Lucas, do laboratório de microscopia do INPA, por todo empenho em analisar as processar e analisar as amostras.

Ao Prof. Palhares, que revisou as micrografias de seções para fins de interpretação das alterações histológicas.

A Calcida, que analisou algumas amostras biológicas envolvidas no projeto.

Ao Prof. Boechat, que juntamente com o Prof. Oscar, idealizaram o projeto e conduziram a experimentação animal.

Aos demais professores da UFAM, que contribuíram em várias etapas do projeto, como o. Emerson (forneceu o óleo de copaíba), Fernando e Sylvania (revisão sistemática), Maria Cristina e Geane (manipulação animal) e Pritech (forneceu os animais).

A todos os meus professores e coordenadores do curso de pós-graduação pelos ensinamentos que contribuíram para a minha formação.

Ao biotério do INPA e os funcionários, que de forma muito profissional mantiveram os animais sob excelentes condições e sempre forneceram suporte de forma muito prestativa.

Aos animais, manifesto a minha gratidão e o meu respeito, que com ética, são essenciais para o avanço da ciência.

Ao Edson, sempre muito prestativo, atencioso e paciente no desempenho de suas funções.

A FAPEAM, pelo incentivo financeiro ao projeto de pesquisa.

Ao meu marido, Rodrigo, que com muita paciência e alegria sempre me fortaleceu nos momentos mais difíceis dessa trajetória acadêmica não medindo esforços para me trazer conforto e apoio. Obrigada por todo seu companheirismo e compreensão ao longo desses anos.

Aos meus pais, Creuza e Nilo, que sempre acreditaram no meu potencial e incentivaram a buscar a realização dos meus objetivos.

As minhas irmãs (Myshelly e Vanessa), meu irmão Victor e sobrinhos (José Henrique, Gabriela, Manuel e Maria Luiza), que pelo amor fraterno me fortalecem a nunca desistir.

As minhas amigas, Jandira, Alita, Ana Paula, Tatiane e Aline pelo incentivo e apoio constante.

E a todos aqueles que contribuíram de forma direta e indireta para realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença que afeta principalmente as articulações, sendo atribuída alterações patogênicas-chaves à membrana sinovial (MS). Os tratamentos disponíveis para a doença são eficazes em minimizar os sintomas, mas a sua capacidade em intervir na progressão da doença e destruição das articulações ainda é limitada, além de apresentam inúmeros efeitos adversos. Nesse sentido, a administração de produtos naturais tem emergido como uma opção. Neste cenário, o óleo de copaíba tem sido matéria de vários estudos visando comprová-las ou adaptá-las à novas terapias. Apesar de amplamente estudado, a sua ação em eventos chaves na AR, tais como hiperplasia e ativação dos sinoviócitos, infiltração de células imunes e invasão tecidual necessitam ser elucidadas. **Objetivo:** Investigar o efeito do óleo de copaíba (*Copaifera* spp.) sobre a morfologia estrutural e ultraestrutural das articulações de camundongos na artrite aguda induzida por Zymosan (Zy), em especial sobre a membrana sinovial. **Materiais e métodos:** Camundongos Balb/c foram induzidos à AZy por injeção s.c. de solução de Zy a 500µg em pata. Dois grupos foram destinados à avaliação do óleo, sendo administrados, por via orogástrica (o.g.), 300 e 600 mg/kg. Para comparação foram empregados grupos tratados com tratamento convencional (diclofenaco), sem intervenção farmacológica (Controle) e tratados apenas com óleo (Controle Copaíba). Após 96 horas da injeção, as patas e tecidos foram removidos para análise histomorfológica, estereológica e por microscopia eletrônica. **Resultados:** A injeção de Zy em pata foi eficaz em desenvolver edema e alterações morfológicas e morfométricas em pequenas articulações (metatarso e falange), das quais destacam-se hiperplasia da MS, que resultou no aumento do seu volume e espaço superficial, erosão óssea e perda de cartilagem, que por sua vez, apresentaram volume e superfície reduzida. O óleo de copaíba demonstrou-se eficaz em preservar a morfologia e a morfometria da articulação e seus componentes, demonstrando grande similaridade ao controle e tratamento convencional. Contudo, em relação ao edema, mostrou-se eficaz apenas nas primeiras horas (1h e 3h), perdendo sua capacidade no decorrer da experimentação. As MS artríticas apresentaram alterações ultraestruturais clássicas, tais como hiperplasia com infiltrado inflamatório, sinoviócitos B rico com aumento de RER e vacúolos citoplasmáticos, cisternas dilatadas repletas de ribossomos e processos citoplasmáticos extensos e sinoviócitos A com inúmeros vacúolos citoplasmáticos. O óleo de copaíba conferiu plasticidade aos sinoviócitos, que arranjaram-se de forma a tornar a membrana impermeável. **Conclusão:** O modelo de AZy é eficaz em desenvolver alterações estruturais e ultraestruturais em pequenas articulações quando aplicado em pata por via s.c. O óleo de copaíba demonstrou-se promissor em conter alterações morfológicas e morfométricas impostas pela artrite experimental por Zy, as quais foram evidenciadas por estereologia e microscopia eletrônica. Contudo estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos e ajustar a dose e período de administração do produto natural.

Palavras-chaves: Zymosan, estereologia, morfologia, microscopia eletrônica, modelo animal.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a disease that mainly affects the joints, with key pathogenic alterations being attributed to the synovial membrane (SM). Available treatments for the disease are effective in minimizing symptoms, but their ability to intervene in disease progression and joint destruction is still limited, in addition to having numerous adverse effects. In this sense, the administration of natural products has emerged as an option. In this scenario, copaiba oil has been the subject of several studies aiming to prove them or adapt them to new therapies. Although widely studied, its action on key events in RA, such as hyperplasia and synoviocyte activation, immune cell infiltration and tissue invasion, need to be elucidated. **Objective:** To investigate the effect of copaiba oil (*Copaifera* spp.) on structural and ultrastructural morphology of joints in mice in acute arthritis induced by Zymosan (Zy), especially on the synovial membrane. **Materials and methods:** Balb/c mice were induced to AZy by s.c. injection of 500µg Zy solution into the paw. Two groups were destined to the evaluation of the oil, being administered, through the orogastric route (o.g.), 300 and 600 mg/kg. For comparison, groups treated with conventional treatment (diclofenac), without pharmacological intervention (Control) and treated only with oil (Control Copaíba) were used. 96 hours after the injection, the paws and tissues were removed for histomorphological, stereological and electron microscopy analysis. **Results:** The injection of Zy in the paw was effective and developed edema and morphological and morphometric changes in small joints (metatarsal and phalanx), from which UL hyperplasia stands out, which resulted in an increase in its volume and surface space, bone erosion and cartilage loss, which in turn, presented reduced volume and surface. Copaiba oil proved to be effective in preserving the morphology and morphometry of the joint and its components, showing great similarity to conventional control and treatment. However, in relation to edema, it proved to be effective only in the first hours (1h and 3h), losing its capacity during the experiment. Arthritic SD showed classic ultrastructural changes, such as hyperplasia with inflammatory infiltrate, rich synoviocytes B with increased rER and cytoplasmic vacuoles, dilated cisterns filled with ribosomes and extensive cytoplasmic processes, and synoviocytes A with numerous cytoplasmic vacuoles. Copaiba oil conferred plasticity on the synoviocytes, which arranged themselves in such a way as to make the membrane impermeable. **Conclusion:** The AZy model is effective in developing structural and ultrastructural changes in small joints when applied to the paw via sc Copaiba oil has shown promise in containing morphological and morphometric changes imposed by experimental arthritis by Zy, which were evidenced by stereology and electron microscopy. However, additional studies are needed to elucidate the mechanisms involved and adjust the dose and period of administration of the natural product.

Keywords: Zymosan, stereology, morphology, electron microscopy, animal model.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - Ação anti-inflamatória do óleo de copaíba em artrite induzida em modelo animal: uma Revisão Sistemática

Figura. 1 – Diagrama PRISMA mostrando a seleção de artigos para revisão..... 19

CAPÍTULO 2 - O efeito do óleo de copaíba (*Copaifera* spp.) sobre a morfologia das articulações de camundongos na artrite aguda induzida por Zymosan

Figura 1 - Desenho esquemático de uma diartrose (articulação sinovial).....	44
Figura 2 – Cartilagem hialina, sem pericôndrio.	45
Figura 3 – Figura esquemática da estrutura histológica da membrana sinovial	46
Figura 4 – Representação tridimensional da ultraestrutura da membrana sinovial.	47
Figura 5 – Etapas do estudo	60
Figura 6 – Ilustração esquemática do procedimento de gavagem intragástrica.	67
Figura 7 – Avaliação do volume da pata dos animais antes e após aplicação s.c. de Zy ou salina	74
Figura 8 – Espessura da pata, em mm, de Balb/c após 96h da inoculação s.c. de Zy ou salina, de acordo com o tempo e grupo experimental.....	76
Figura 9 - Variação do peso corporal após 96 horas da inoculação de Zymosan ou Salina.	78
Figura 10 - Articulação IFP com características histomorfológicas normais.	79
Figura 11 – Morfologia da MS em articulação IFP de Balb/c após aplicação s.c. de Zy	80
Figura 12 – Morfologia da erosão óssea em articulação IFP de Balb/c após 96h da injeção s.c. de Zy	81
Figura 13 – Morfologia da cartilagem em articulação IFP de Balb/c após aplicação s.c. de Zy	82
Figura 14 – Morfologia da remodelação óssea em articulação IFP de Balb/c após injeção s.c. de Zy	82
Figura 15 – Volume e histomorfologia da articulação interfalangeana proximal (IFP)	83
Figura 16 – Volume e histomorfologia da cápsula articular	84
Figura 17 - Volume e histomorfologia da membrana sinovial da articulação IFP	86
Figura 18 - Volume e histomorfologia do espaço sinovial da articulação IFP.....	87
Figura 19 - Volume e histomorfologia da cartilagem hialina de camundongos.....	88
Figura 20 – Volume e histomorfologia do osso em articulação de camundongos	90
Figura 21 - Área superficial da cartilagem hialina.....	91
Figura 22 - Área superficial da membrana sinovial.....	93
Figura 23 - Análise dos componentes principais (PCA) dos parâmetros estereológicos	94

CAPÍTULO 3 - O efeito do óleo de copaíba (*Copaifera* spp.) sobre a morfologia ultraestrutural da membrana sinovial de camundongos na artrite aguda induzida por Zymosan

Figura 1 – Ultraestrutura da articulação MTF de animais Controle.....	128
Figura 2 – Microscopia eletrônica de transmissão da superfície da membrana sinovial da MTF.	129
Figura 3 – Sinoviócitos tipo B com morfologia normal	130
Figura 4 – Alterações morfológicas de articulação MTF em modelo de AZy	131
Figura 5 – Ultraestrutura dos sinoviócitos em modelo de AZy	132
Figura 6 – Morfologia dos sinoviócitos tipo B na articulação artrítica.....	133
Figura 7 – Sinoviócitos tipo A em modelo de inf	134
Figura 8 – Alterações morfológicas do osso periarticular de articulação MTF em modelo de AZy... ..	135
Figura 9 – Morfologia da MS em animais artríticos tratados com óleo de copaíba.	136
Figura 10 – Sinoviócitos em articulação MTF de camundongos Balb/c tratados com óleo de copaíba	137
Figura 11 – Articulação sinovial MTF de modelo animal de AZy tratados com diclofenaco.....	138

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO 1 - Ação anti-inflamatória do óleo de copaíba em artrite induzida em modelo animal: uma Revisão Sistemática

Quadro 1 – Dados do estudo incluído na revisão sistemática.....20

CAPÍTULO 2 - O efeito do óleo de copaíba (*Copaifera* spp.) sobre a morfologia das articulações de camundongos na artrite aguda induzida por Zymosan

Tabela 1 – Caracterização dos grupos experimentais65

Tabela 2 – Caracterização da cronologia experimental66

Tabela 3 – Espessura da pata (mm) dos animais após 6 e 96 horas da inoculação de Zy.....75

ANEXOS

ANEXO 1 – Equipe do projeto de pesquisa.....	150
ANEXO 2 – Página inicial do artigo científico publicado na revista Scientia Amazonia	151
ANEXO 3 – Parecer do CEUA/INPA	152

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
Artrítico	grupo Artrítico não tratado, que recebeu Zy por via s.c. e salina por gavagem
ACPAs	Anticorpos Anti-Proteínas Citrulinadas
Ad	Células Adiposas
AINEs	Anti-inflamatórios não Esteroidais
AZy	Artrite induzida por Zymosan
MTF	Metatarsofalangeana, articulação
ANOVA	Análise de variância
AR	Artrite reumatoide
CCop	grupo Controle Copaíba, não artrítico que recebeu salina s.c. e óleo de copaíba a 300 mg/kg (o.g.)
C.E	coeficiente de erro
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (agrupamento de diferenciação)
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Brasileiro para o Controle da Experimentação Animal
Controle	grupo Controle, que recebeu apenas salina por via o.g. e s.c.
Cop300	grupo Artrítico tratado com óleo de copaíba a 300 mg/kg
Cop600	grupo Artrítico tratado com óleo de copaíba a 600 mg/kg
DMARDs	Drogas Antirreumáticas Modificadoras de Doença (<i>disease-modifying antirheumatic drug</i>)
FR	Fator reumatoide
GTA	Glutaraldeído
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (antígenos de leucócitos humanos)
i.a.	intra-articular, via de administração
ICB	Instituto de Ciências Biológicas

IgG	imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
KW	Kruskal-Wallis
LaMiq	Laboratório de Microscopia Quantitativa
LTME	Laboratório Temático de Microscopia Eletrônica
MEC	Matriz Extracelular
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão (<i>Transmission Electron MICROSCOPY</i>)
MMP	Metaloproteinases da Matriz
MTX	Metotrexato
NF-kB	Fator Nuclear- kB (<i>nuclear factor kappa-B</i>)
o.g.	Orogástrica (gavagem), via de administração
PPGIBA	Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada
RANK	ligante ativador do receptor do fator nuclear-kB (<i>receptor activator of NF-kB ligand</i>)
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
REr	retículo endoplasmático rugoso
s.c.	Subcutânea, via de administração
SSF	Sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (ou sinoviócitos do tipo B)
SSM	Sinoviócitos semelhantes a macrófagos (ou sinoviócitos do tipo A)
STEM	Microscopia eletrônica de transmissão de varredura (<i>Scanning transmission electron microscopy</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
Thy-1	antígeno de superfície celular Thy-1 (ou CD90)
TLR2	<i>Toll-like receptors 2</i> (receptores tipo Toll 2)
TLR4	<i>Toll-like receptors 4</i> (receptores tipo Toll 4)
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factor alpha</i>)

UDP	Uridina difosfato
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
Zy	Zymosan A

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Ação anti-inflamatória do óleo de copaíba em artrite induzida em modelo animal: uma Revisão Sistemática	12
RESUMO.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. METODOLOGIA	17
2.1 Estratégia de pesquisa	17
2.2 Critérios de Inclusão	17
2.3 Critérios de Exclusão	18
2.4 Seleção de estudos	18
2.5 Extração de dados	18
3. RESULTADOS	18
3.1 Característica do estudo incluído	19
4. DISCUSSÃO.....	20
5. CONCLUSÃO	24
6. REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO 2 - O efeito do óleo de copaíba (Copaifera spp.) sobre a morfologia das articulações de camundongos na artrite aguda induzida por Zymosan	39
1. INTRODUÇÃO.....	42
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	44
2.1 Articulação sinovial (Diartroses)	44
2.1.1 Membrana sinovial	45
2.1.1.1 Sinoviócitos tipo B.....	48
2.2 Artrite reumatoide (AR)	49
2.1 Patogênese na Artrite reumatoide	49
2.3.1.1 Patogênese da AR mediada pela membrana sinovial	50
2.3 Modelos experimentais de artrite	52
2.3.1 Artrite induzida por Zymosan (AZy)	52
2.4 Opções terapêuticas para a artrite reumatoide.....	54
2.4.1 Tratamento alternativo para AR.....	55
2.5 Ferramentas da Estereologia.....	57
3. OBJETIVOS.....	59
3.1 Objetivo geral.....	59
3.2 Objetivos específicos	59
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
4.1 Tipo e etapas do estudo.....	60
4.2 Substâncias utilizadas.....	61

4.2.1 Solução salina fisiológica.....	61
4.2.2 Veículo para administração oral de substâncias	61
4.2.3 Óleo de copaíba (OC) destilado	62
4.2.4 Diclofenaco	62
4.2.5 Zymosan	63
4.3 Etapas do projeto e técnicas empregadas.....	64
4.3.1 Experimentação animal.....	64
4.3.2 Coleta dos tecidos e processamento histológico	70
4.3.3 Análise estereológica	71
4.3.4 Análise estatística	73
5. RESULTADOS.....	74
5.1 Desenvolvimento da inflamação aguda	74
5.1.1 Espessura da pata	74
5.1.2 Peso corporal	77
5.2 Histomorfologia da articulação interfalangeana proximal (IFP).....	78
5.3 Estereologia da articulação IFP	82
5.3.1 Volume total da articulação interfalangeana proximal (IFP)	83
5.3.2 Volume da cápsula articular	84
5.3.3 Volume da membrana sinovial	85
5.3.4 Volume do espaço sinovial	87
5.3.5 Volume da cartilagem hialina	88
5.3.6 Volume do osso periarticular	89
5.3.7 Área superficial da cartilagem hialina da articulação IFD.....	91
5.3.8 Área superficial da membrana sinovial da articulação IFD	92
5.4 Análise dos componentes principais (PCA).....	94
6. DISCUSSÃO.....	96
7. CONCLUSÃO	103
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
CAPÍTULO 3 – O efeito do óleo de copaíba (<i>Copaifera</i> spp.) sobre a morfologia ultraestrutural da membrana sinovial de camundongos na artrite aguda induzida por Zymosan.....	118
1. INTRODUÇÃO.....	120
2. OBJETIVOS.....	125
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	126
4. RESULTADOS.....	128
4.1 Membrana sinovial normal.....	128
4.2 Articulação sinovial em modelo de AZy	131
4.3 Membrana sinovial em modelo de AZy tratados	135
5. DISCUSSÃO.....	139

6. CONCLUSÃO	146
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147
ANEXOS.....	150

Capítulo 1

Ação anti-inflamatória do óleo de copaíba em artrite induzida em modelo animal: uma Revisão Sistemática

ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO NA REVISTA *Scientia Amazonia*, v. 8, n.1, CB1-CB12, 2019;
Disponível em: <http://scientia-amazonia.org/wp-content/uploads/2018/11/v.8-n.1-CB1-CB12-2019.pdf>;
Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>, ISSN:2238.1910 (ANEXO 1)

ACÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO DE COPAÍBA EM ARTRITE INDUZIDA EM MODELO ANIMAL: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

RESUMO

O óleo de copaíba (*Copaifera* sp.) é usado na medicina alternativa devido as propriedades anti-inflamatória, antitumoral e antimicrobiana já comprovados, tornando-o atrativo para o tratamento de diversas doenças, como por exemplo a artrite, caracterizada como uma doença inflamatória sistêmica, que acomete 1% da população. Esta revisão sistemática identificou estudos que relatassem os efeitos do óleo de copaíba sobre a inflamação em modelos animais de artrite experimental, a fim de verificar as doses efetivas e tóxicas e os mecanismos anti-inflamatórios eficazes. Oitenta e quatro estudos foram encontrados por pesquisa eletrônica, que foram triados de acordo com critérios de inclusão e exclusão pré-definidos. A dose efetiva, segura e não tóxica do óleo de copaíba necessita ser investigada. Esta revisão sistemática permitiu concluir que o principal componente químico da copaíba que apresenta atividade anti-inflamatória é o β -cariofileno, entretanto, o mecanismo de ação necessita ser elucidado. Além disso, a falta de estudos que abordem o óleo de copaíba como agente anti-inflamatório na artrite reumatoide é insuficiente para sustentar o uso efetivo e seguro desse óleo-resina, sendo necessário mais estudos, tendo em vista os benefícios promissores já comprovados desse composto medicinal.

Palavras-Chave: eficácia e segurança, dose tóxica, fitoterápico, artrite experimental

Anti-inflammatory action of copaiba oil in animal model-induced arthritis: A Systematic Review

Copaiba oil (*Copaifera* sp.) is used in alternative medicine because of the proven anti-inflammatory, antitumor and antimicrobial properties, making it attractive for the treatment of several diseases, such as arthritis, characterized as a systemic inflammatory disease, which affects 1% of the population. This systematic review identified studies that reported the effects of copaiba oil on inflammation in animal models of experimental arthritis in order to verify effective and toxic doses and effective anti-inflammatory mechanisms. Eighty-four studies were found by electronic research, which were screened according to pre-defined inclusion and exclusion criteria. The effective, safe and non-toxic dose of copaiba oil needs to be investigated. This systematic review allowed us to conclude that the main chemical component of copaiba that has anti-inflammatory activity is β -caryophyllene, however, the mechanism of action needs to be elucidated. In addition, the lack of studies addressing copaiba oil as an anti-inflammatory agent in rheumatoid arthritis is insufficient to support the effective and safe use of this oil-resin, and further studies are needed in view of the already proven promising benefits of this compound medicinal.

Key-words: efficacy and safety, toxic dose, phytotherapeutic, experimental arthritis

¹ Aluna Doutorado Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, UFAM, vanda_santana@hotmail.com

² Professora Departamento de Morfologia, ICB, UFAM, silvania_furtado@yahoo.com.br

³ Professor Departamento de Morfologia, ICB, UFAM, fmarques123@gmail.com

⁴ Professor Departamento de Morfologia, ICB, UFAM, oscarcosta@ufam.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica e autoimune que acomete aproximadamente 1% da população geral (ALAMANOS; VOULGARI; DROSOS, 2006; GABRIEL; MICHAUD, 2009; GIBOFSKY, 2012; UHLIG; MOE; KVIEN, 2014). Pode acarretar em dor, deformidades e incapacitação, comprometendo a qualidade de vida do indivíduo (SCHETT, 2007). Além disso, também está associada a uma alta taxa de mortalidade, principalmente devido a complicações cardiovasculares, e aumento nos custos, tanto individuais, por impossibilitar o trabalho, como estatais, aumentando os gastos com a saúde (ALAMANOS; VOULGARI; DROSOS, 2006; DE AZEVEDO; FERRAZ; CICONELLI, 2008; KITAS; GABRIEL, 2011; TOBÓN; YOUINOU; SARAUX, 2010; UHLIG; MOE; KVIEN, 2014).

No Brasil, estima-se que a prevalência desta doença seja de 0,2 a 1% (MARQUES NETO, JF; GONÇALVES, ET; LANGEN, LF; CUNHA, MF; RADOMINSKI, S; OLIVEIRA, SM; CURY, SE; MEDEIROS, F; SAMPAIO, 1993; SATO et al., 1990). Na região Norte do Brasil são encontrados poucos registros epidemiológicos sobre a AR, no qual apenas um estudo, realizado em Belém, relata a prevalência dessa doença, que demonstra que a AR acomete 1% da população (MARQUES NETO, JF; GONÇALVES, ET; LANGEN, LF; CUNHA, MF; RADOMINSKI, S; OLIVEIRA, SM; CURY, SE; MEDEIROS, F; SAMPAIO, 1993). Apesar de não haver estudos abrangentes para a região Norte, o Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS), do Ministério da Saúde demonstra que aproximadamente 1.474 mil internações em hospitais do SUS, devido a AR e outras poliartrites (M05-M14 da CID-10), ocorreram na região Norte durante um período de 12 meses (dezembro de 2016 a novembro de 2017). A mesma fonte demonstrou que para o estado do Amazonas ocorreram, aproximadamente, 101 internações para o mesmo período (MINISTÉRIO DA SAÚDE - SISTEMA DE INFORMAÇÕES HOSPITALARES DO SUS (SIH/SUS), 2017).

O tratamento de primeira escolha para AR consiste na administração de medicamentos modificadores do curso da doença (DMARDs, *disease modifying anti-rheumatic drugs*) associado ou não a glicocorticoides de curto prazo (SMOLEN et al., 2017). Além desses, agentes sintomáticos, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) também são frequentemente administrados por aliviar a dor e o inchaço, embora tenha diminuído o interesse por esses medicamentos por não modificarem o curso da doença (CROFFORD, 2013), o que atualmente é o atributo fundamental de todas as drogas modernas e estratégias

de tratamento, pois inibem o dano estrutural à cartilagem e ao osso, reduzindo o comprometimento da função física, melhorando a qualidade de vida e capacidade social e de trabalho (SMOLEN et al., 2017).

Apesar da variedade de agentes eficazes disponíveis (SMOLEN et al., 2014a), as opções terapêuticas para AR apresentam inúmeras limitações, que incluem alto custo e toxicidade grave (SMOLEN et al., 2017), como relatado para o Metotrexato (MTX), um DMARD sintético, que pode resultar em efeitos adversos potencialmente graves, principalmente de forma dose-dependente, que incluem a toxicidade hepática, insuficiência renal e citopenia grave (CIPRIANI et al., 2014; SALLIOT; VAN DER HEIJDE, 2008). Os AINEs tradicionais, como o ibuprofeno, o naproxeno e o diclofenaco também apresentam desvantagens toxicológicas, principalmente por inibirem a via da ciclooxigenase (COX), podendo ocasionar eventos gastrointestinais e hepáticos, além de afetar a coagulação, interferir na circulação sanguínea renal e resultar em problemas cardiovasculares principalmente quando administrados em grandes quantidades (>2045mg para ibuprofeno) durante um longo período de tempo (risco progressivamente maior para o período de 6 a 30 meses) (NISSEN et al., 2016; OLIVEIRA; LYRA; ESTEVES, 2013; SCHEIMAN, 2016). Além disso, os AINEs, quando administrados concomitantemente com MTX inibem a eliminação desse DMARD, elevando as concentrações sistêmicas, conseqüentemente, exacerbando a sua toxicidade (LEVÊQUE et al., 2011; NOZAKI et al., 2007; THYSS et al., 1986).

Para minimizar essa problemática, várias terapias adjuvantes têm sido propostas como alternativa contra a AR, tal como a inclusão de nutrientes classificados como nutracêuticos ou fármacônútrientes e medicamentos fitoterápicos, que têm sido utilizados como modificadores da resposta biológica exercendo ações antioxidantes, ações anti-inflamatórias e minimizando ações pró-inflamatórias (VASCONCELOS, 2013).

O uso de plantas e ervas para o alívio de sintomas e enfermidades pelo homem é feito desde os primórdios da humanidade (CAMERON; GAGNIER; CHRUBASIK, 2011). Nesse contexto, dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) destacam que até 80% da população mundial utiliza plantas medicinais para cuidados com a saúde. Entretanto, é fundamental estabelecer a segurança, eficácia e controle de qualidade de plantas medicinais e assim evitar efeitos toxicológicos e demais conseqüências (FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JUNIOR, 2014).

Inúmeras plantas medicinais têm sido indicadas para o tratamento de AR, como exemplo, o fitoterápico Arpynflan®, produzido pela Natulab, que foi aprovado para ser

comercializado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2013 (Registro ANVISA nº 138410057). Esse fármaco é um anti-inflamatório natural produzido a partir do extrato da raiz de *Harpagophytum procumbens* (pertencente à família Pedaliaceae e conhecida popularmente como Garra-do-diabo), sendo recomendado para casos de quadros reumáticos, acompanhados de dor, como artrite, artrose e lombalgia e já está disponível no Sistema Único de Saúde (SUS) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013).

Além do fitoterápico Arpynflan®, vários outros medicamentos naturais com efeito anti-inflamatório têm sido propostos, entre eles o Omega-3, derivado de óleos de peixe ou de krill antártico (*Euphausia superba*, pequeno crustáceo semelhante ao camarão, encontrado nas águas frias do oceano Antártico) (CURTIS et al., 2000, 2002; NICOL; FOSTER; KAWAGUCHI, 2012), Curcumina (pigmento que faz parte do componente ativo do açafrão-da-Índia, também conhecido como Cúrcuma longa, a qual consiste em uma planta herbácea, pertencente à família Zingiberaceae) (VILELA; ARTUR, 2008; YANG; WANG, 1993), ácidos boswellicos (presente em extrato de resina de *Boswellia serrata*, um incenso indiano pertencente à família Burseraceae) (AMMON, 2006; SAFAYHI et al., 1992), Resveratrol (uma fitoalexina encontrada em muitas plantas, incluindo uvas, amendoins e bagas) (BERMAN et al., 2017; ELMALI et al., 2007), e alguns óleos essenciais como o óleo de copaíba (KOBAYASHI et al., 2011a; PAIVA et al., 2004; VEIGA et al., 2007).

O óleo de copaíba, obtido a partir da casca do caule da árvore copaibeira (*Copaifera langsdorffii*, pertencente à família Fabaceae Caesalpinioideae), é muito conhecido por suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, bactericidas e cicatrizantes (MARTINS-DASILVA; PEREIRA; LIMA, 2008). Essa planta tem sido alvo de vários estudos que buscam comprovar a eficácia das suas propriedades baseados no dito popular. Apesar de muitos estudos já terem comprovado a eficácia de algumas dessas propriedades, esse composto ainda é alvo de pesquisa para diversas enfermidades, tais como processos inflamatórios crônicos e autoimunidade (AMILIA DESTRYANA et al., 2014; BASILE et al., 1988; DE LIMA SILVA et al., 2009; GELMINI et al., 2013; KOBAYASHI et al., 2011a; VEIGA et al., 2007).

O óleo de copaíba é constituído predominantemente de sesquiterpenos e diterpenos, e até agora foram descritos mais de 40 sesquiterpenos e 28 diterpenos (VEIGA et al., 2007) (TAPPIN et al., 2004; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). O principal sesquiterpeno encontrado no óleo de diferentes espécies de *Copaifera* sp. são o β -cariofileno seguido do α -humuleno, do α -bergamoteno e do δ -cadineno. A composição dos diterpenos varia de acordo com as espécies (VEIGA et al., 2007), e o ácido copálico foi o único diterpeno encontrado em todos os óleos analisados (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

A comercialização de novos medicamentos, sejam eles sintéticos ou fitoterápicos, deve ser testado previamente a uma série de etapas pré-clínicas, as quais incluem estudos *in vitro* e animal, e clínica, que por sua vez inclui pesquisa em humanos, mas essa última só é contemplada se as fases iniciais forem satisfatórias. As etapas de pesquisa têm como objetivo principal verificar e garantir a segurança, eficácia e controle de qualidade da droga em pesquisa, sendo assim, é essencial realizar inicialmente testes laboratoriais para assegurar o sujeito da pesquisa (RIZZO; CAMARGO, 2013).

Vários estudos sobre AR têm sido realizados com intuito de compreender a dinâmica do processo inflamatório e a instalação da doença, cujo objetivo principal é desenvolver novos fármacos, sejam eles sintéticos ou naturais (OLSEN; STEIN, 2004; SMOLEN et al., 2007, 2014b). Nesse contexto, muitas dessas pesquisas têm sido realizadas em modelos animais, cujo processo patológico é induzido de forma experimental, os quais geralmente manifestam respostas inflamatórias similares a artrite reumatoide do humano. Entre os indutores de artrite experimental, os mais comumente utilizados estão o *zymosan* (Zy), antígenos, colágeno entre outros (DENG, 2014; GEGOUT et al., 1994; ROCHA et al., 1999).

Com isso, o objetivo desta revisão foi identificar estudos que relatassem os efeitos do óleo de copaíba sobre a inflamação em modelos animais de artrite experimental, a fim de verificar as doses efetivas e tóxicas e mecanismos anti-inflamatórios eficazes.

2. METODOLOGIA

2.1 Estratégia de pesquisa

Uma pesquisa eletrônica foi realizada nas bases de dados PubMed, Web of Science e Scielo realizada utilizando as combinações de termos de pesquisa: “*Copaifera*” and “*anti-inflammatory*”. Os limites colocados incluíram publicações em inglês e estudos de experimentação animal.

2.2 Critérios de Inclusão

Inicialmente, a busca pelos estudos incluiu aqueles que abordassem experimentação animal referente ao uso do óleo de copaíba para intervenções no processo inflamatório. Após a pesquisa eletrônica dos artigos foi realizada uma triagem para selecionar estudos que

abordassem a temática em modelos de artrite experimental. Todos os ensaios pré-clínicos (experimentação animal) foram considerados.

O intervalo de tempo para inclusão dos estudos foi de agosto a outubro de 2017.

2.3 Critérios de Exclusão

Estudos que relataram inflamações não relacionadas à artrite experimental, e que abordavam outros componentes químicos que não fossem o óleo de copaíba.

2.4 Seleção de estudos

Dois dos autores deste manuscrito fizeram a triagem e selecionaram todos os resumos e títulos de estudos identificados pela estratégia de busca para inclusão e adequação com base nos critérios de seleção. Cada estudo foi avaliado de forma independente pelos autores. Se necessário, o texto completo do artigo foi obtido para uma avaliação posterior para determinar se o teste atendia aos critérios pré-estabelecidos.

Se nenhum consenso foi alcançado em relação aos critérios pré-estabelecidos de qualquer estudo individual, uma terceira autora fez uma decisão de consenso final.

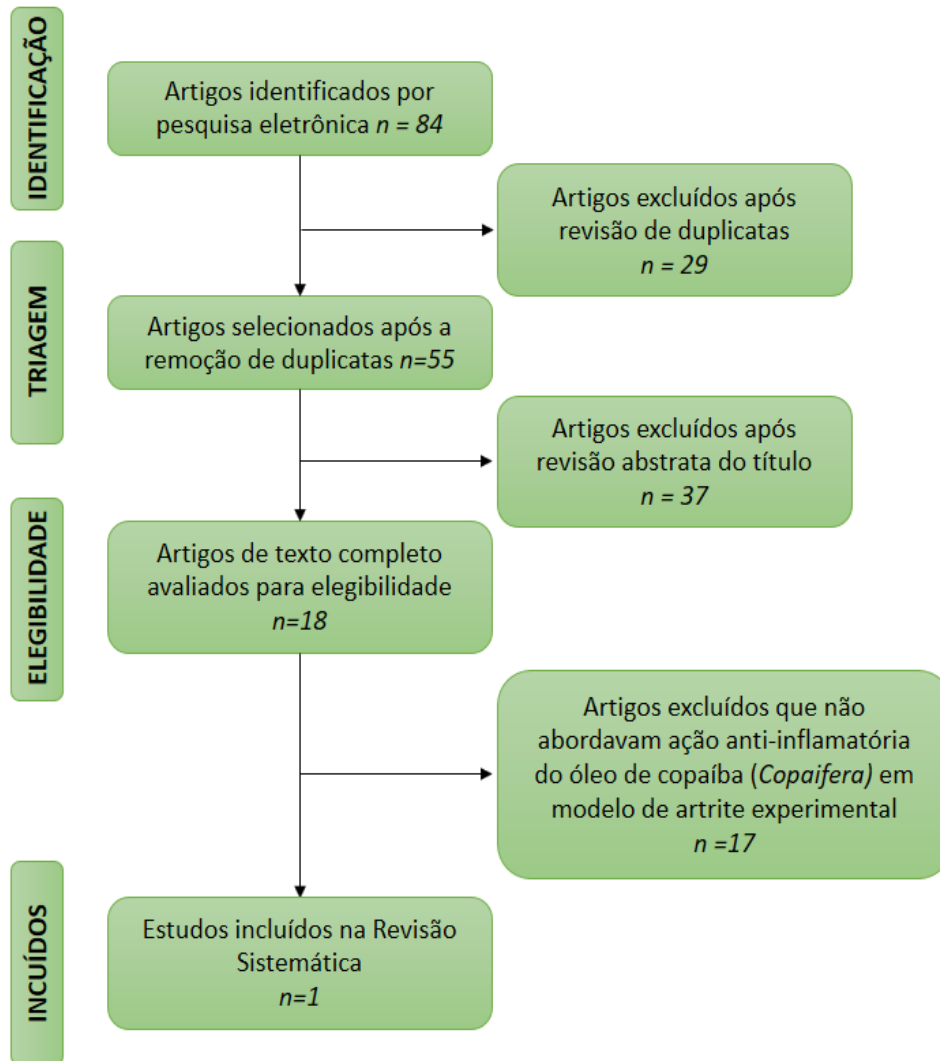
2.5 Extração de dados

A extração de dados foi realizada por dois autores de forma independente, usando uma forma padrão. A informação obtida de todos os estudos incluídos foi: data e país de publicação, localização do estudo, desenho do estudo, tamanho da amostra, modelo de artrite, intervenção e resultados. Todas as discrepâncias foram resolvidas por ambos os autores após uma revisão dos estudos.

3. RESULTADOS

O processo de seleção do estudo é resumido na Figura 1. A pesquisa identificou 84 artigos publicados; 18 artigos preencheram os critérios de inclusão para leitura dos resumos. Dezesete artigos foram excluídos por não apresentarem a temática proposta. Ao final da triagem, um estudo preencheu os critérios de inclusão e foi elegível para esta revisão.

Figura. 1 – Diagrama PRISMA mostrando a seleção de artigos para revisão



3.1 Característica do estudo incluído

O estudo incluído trata-se de experimentação animal (Pré-clínico) com controle, aleatorizado, que descreveu intervenções para a inflamação em ratos artríticos e não artríticos (Quadro 1). O ensaio incluiu 63 animais que foram randomizados em nove grupos. O estudo foi realizado no Estado do Pará, Brasil (CASTRO GHIZONI et al., 2017).

Quadro 1 – Dados do estudo incluído na revisão sistemática

Autor/Ano.....:	CASTRO GHIZONI, Cristiane V. et al., 2017
Tipo de estudo.....:	Controle, aleatorizado, Pré-clínico (animal)
Objetivo.....:	Investigar as ações anti-inflamatórias e antioxidantes do óleo de copaíba (<i>Copaifera reticulata</i>) sobre a inflamação sistêmica, o estado oxidativo e o metabolismo dos hepatócitos de ratos com artrite induzida por adjuvante de Freund (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>).
Modelo de estudo.....:	Ratos <i>Holtzman</i> machos, 170-180 g (50 dias de idade), induzidos a um modelo severo de artrite experimental (poliartrite) por adjuvante de Freund (500µg), com resposta inflamatória generalizada (sistêmica) por 18 dias após indução da artrite (crônico)
Tamanho amostral (n):	63 ratos <i>Holtzman</i> (randomizados em 9 grupos)
Controles.....:	<ul style="list-style-type: none"> – Controle negativo: Solução salina (n=7) e Óleo de milho (n=7) – Controle positivo: Ratos artríticos tratados com ibuprofeno na dose de 30 g·kg⁻¹ (n=7) – Controles tratados: óleo de copaíba nas doses de 0,58 (n=7) e 1,15 (n=7) g·kg⁻¹
Tratamentos.....:	<ul style="list-style-type: none"> – Ratos artríticos com solução salina (n=7) – Ratos artríticos com óleo de milho (n=7) – Ratos artríticas tratados com óleo de copaíba nas doses de 0,58 e 1,15 g·kg⁻¹; (n=7)
Design experimental....:	Os animais foram tratados uma vez por dia pela manhã por administração oral (gavagem) de óleo de copaíba, óleo de milho, solução salina ou ibuprofeno durante 5 dias antes da indução da artrite e por mais 18 dias.
Índice artrítico.....:	Parâmetros inflamatórios – volume da pata e aparência e gravidade das lesões secundárias na cauda e na orelha (pontuação artrítica 0 a 5) – previamente definidas (BRACHT et al., 2012) foram utilizados para determinar o índice artrítico.
Principais conclusões...:	<ul style="list-style-type: none"> – Os animais induzidos a artrite experimental por adjuvantes de Freund desenvolveram poliartrite, sendo confirmada por critérios pré-estabelecidos para índice artrítico. – O óleo de copaíba apresentou ações sistêmicas anti-inflamatórias (redução do edema de pata, do inchaço das adrenais e os dos gânglios linfáticos e da atividade da mieloperoxidase plasmática) e antioxidantes (anulou os aumentos de grupos proteicos de carbonilo e espécies reativas de oxigênio no fígado) em ratos artríticos. Contudo, observou-se modificações prejudiciais no metabolismo (redução da glicogenólise e glicólise hepática) e morfologia dos hepatócitos (dilatação sinusoidal, distorção da arquitetura normal de hepatócitos, perda de disposição em cordas e maior presença de células de Kupffer).

4. DISCUSSÃO

Esta revisão sistemática destacou um estudo que avaliou a ação anti-inflamatória do óleo de copaíba sobre a artrite experimental, o qual demonstrou que ação anti-inflamatória

desse fitoterápico foi parcialmente efetiva em ratos artríticos, pois apesar de ter reduzido o edema da pata, não foi capaz de minimizar as lesões secundárias decorrente de artrite na cauda e nas orelhas (CASTRO GHIZONI et al., 2017). Esse resultado pode ser atribuído ao uso de um modelo clássico de artrite de maior gravidade, denominada de poliartrite, a qual é induzida por altas doses de adjuvante completo de Freund (ARAB; EL-SAWALHI, 2013; BENDELE et al., 1999; BRACHT et al., 2016; DONALDSON; SECKL; MCQUEEN, 1993; PEARSON; WOOD, 1963), tendo em vista que a ação anti-inflamatória do óleo de copaíba já foi comprovada em estudos que utilizaram outros modelos experimentais, tal como demonstrado por Basile et al. (1988), que verificaram que esse óleo-resina inibiu significativamente o edema de pata, assim como reduziu a permeabilidade vascular e a formação de granuloma em ratos Wistar induzidos à artrite por carragenina, portanto, comprovando assim a ação anti-inflamatória desse fitoterápico.

Outros estudos também já comprovaram o potencial anti-inflamatório do óleo de copaíba em ensaios *in vitro* e *in vivo*, entre esses destacam-se alguns realizados em modelo de isquemia de reperfusão, no qual foi comprovado efeitos anti-inflamatórios bem como a redução de lesões em pele de ratos Wistar (DE LIMA SILVA et al., 2009), redução de citocinas pró-inflamatórias em cultura de células (macrófagos) (AMILIA DESTRYANA et al., 2014; GELMINI et al., 2013), em modelo de pleurisia induzida em ratos Wistar (KOBAYASHI et al., 2011a) e em pleurisia induzida por Zy em camundongos Swiss (VEIGA et al., 2007).

A artrite adjuvante em ratos, assim como a artrite reumatoide em humanos, consiste em uma imunopatologia que pode apresentar diferentes graus de lesão, variando entre monoartrite e poliartrite (ARAB; EL-SAWALHI, 2013; BENDELE et al., 1999; DONALDSON; SECKL; MCQUEEN, 1993; PEARSON; WOOD, 1959, 1963). A monoartrite é caracterizada como uma forma de artrite mais leve por apresentar efeitos sistêmicos menores, afetando apenas uma articulação cuja indução é realizada com uma menor dose de adjuvante ($1,0 \text{ mg/mL}^{-1}$ de *Mycobacterium tuberculosis* inativada) (BRACHT et al., 2012). Já a poliartrite, que por sua vez é induzida por altas doses de adjuvante ($5,0 \text{ mg/mL}^{-1}$ de *M. tuberculosis* inativada), que compartilha muitas características da artrite reumatoide em seres humanos, com resposta inflamatória forte e generalizada, afetando múltiplas articulações (cinco ou mais articulações), caquexia e envolvimento sistêmico (ARAB; EL-SAWALHI, 2013; BENDELE et al., 1999; BRACHT et al., 2016, 2012; DONALDSON; SECKL; MCQUEEN, 1993; PEARSON; WOOD, 1959, 1963).

O uso de fitoterápicos utilizados para complementar e auxiliar no tratamento de doenças reumáticas, como a artrite, vem sendo amplamente empregado, principalmente devido aos seus efeitos anti-inflamatórios (DA ROSA; MACHADO, 2007; SINGH; FURST; BHARAT, 2012; SOEKEN; MILLER; ERNST, 2003). Com isso, o número de estudos em relação a essa temática vem aumentando cada vez mais. Dentre as plantas comumente utilizadas para o tratamento de artrite estão *Oenothera biennis* (Óleo de prímula) da família botânica das Onagraceae (AL-OKBI, 2014; CAMERON; GAGNIER; CHRUBASIK, 2011; GELMINI et al., 2013; VASILJEVIC et al., 2016), *Ribes nigrum* L. (óleo de groselha negra) pertencente à família das Grossulariaceae (ARNOLD et al., 2015; LEVENTHAL; BOYCE; ZURIER, 1994), *Borago officinalis* L. (óleo de borragem), planta herbácea da família Boraginaceae (AL-KHAMEES et al., 2011; ASADI-SAMANI; BAHMANI; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014; ZURIER et al., 1996), *Salix* spp. (casca do salgueiro) na família Salicaceae (BIEGERT et al., 2004; BONATERRA et al., 2010; WOOD, 2015), *Tripterygium wilfordii* Hook F. (TwHF), única espécie do gênero monotípico *Tripterygium*, pertencente à família de Celastráceas (CIBERE et al., 2003; JIANG et al., 2017; WANG et al., 2017), *Uncaria tomentosa* (Extrato de unha de gato) da família botânica Rubiaceae (CASTILHOS et al., 2015; MUR et al., 2002) e *Tanacetum parthenium* (Extrato de tanaceto) pertencente à família Asteraceae (PAREEK et al., 2011; PATTRICK; HEPTINSTALL; DOHERTY, 1989).

Da Rosa e Machado (2007) em uma revisão de literatura sobre o uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças reumáticas e Del Grossi Moura et al. (2017) em uma revisão sistemática sobre o tratamento de osteoartrites por plantas medicinais citaram diversos fitoterápicos para o tratamento de doenças reumáticas, contudo o uso do óleo de copaíba não foi incluído, o que corrobora com os achados deste manuscrito.

Os efeitos anti-inflamatórios dos diferentes fitoterápicos usados para o tratamento de doenças reumáticas são atribuídos a diversos componentes químicos, o que varia de acordo com a planta empregada, tais como o ácido gamolênico (semente oleosa da prímula) (AL-OKBI, 2014; CAMERON; GAGNIER; CHRUBASIK, 2011; GELMINI et al., 2013; VASILJEVIC et al., 2016), salicina (casca do salgueiro) (BIEGERT et al., 2004; BONATERRA et al., 2010; WOOD, 2015), triptolideo e o triptolideo (TwHF) (CIBERE et al., 2003; JIANG et al., 2017; WANG et al., 2017), alcalóides oxindólicos (Unha de gato) (CASTILHOS et al., 2015; MUR et al., 2002) e partenolideo (Extrato de tanaceto) (PAREEK et al., 2011; PATTRICK; HEPTINSTALL; DOHERTY, 1989).

O componente do óleo de copaíba responsável pelo efeito anti-inflamatório ainda não foi definitivamente confirmado, mas vários estudos conferem essa atividade principalmente

ao β -cariofileno (CALLEJA et al., 2013; LEANDRO et al., 2012; VEIGA et al., 2007). Igualmente, o mecanismo anti-inflamatório do óleo de copaíba ainda não foi comprovado adequadamente, contudo, Gelmini et al. (2013) analisando a ação dos componentes químicos do óleo de copaíba sob a secreção de citocinas, demonstrou que há uma inibição da translocação do complexo proteico NF- κ B do citossol para o núcleo, resultando na inibição da expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Os efeitos terapêuticos, assim como tóxicos, do óleo de copaíba variam de acordo com a dose empregada. Nos estudos de Castro Ghizoni et al. (2017), ambas as doses (580 mg/kg e 1.150 mg/kg) utilizadas apresentaram-se parcialmente efetivas como um anti-inflamatório, entretanto a dose maior também foi tóxica ao fígado. Esses resultados contradizem estudos anteriores sobre dose tóxica do óleo de copaíba, os quais sugerem que seja superior a 2.000 mg/kg, e que portanto, doses inferiores a essa concentração são seguras para uso terapêutico (BASILE et al., 1988; SACHETTI et al., 2009).

A discrepância dos estudos sobre dose tóxica do óleo de copaíba pode ser justificada pelo fato de que os diferentes autores, ao estimarem a toxicidade aguda (DL₅₀, dose letal mediana) do óleo-resina de copaíba elegeram como critérios de avaliação apenas alterações comportamentais ou óbito dos animais estudados. Em contraste, Castro Ghizoni et al. (2017) apesar de não ter realizado o teste de toxicidade, verificou por análises bioquímicas e histopatológicas, que as doses empregadas modificou a morfologia e o funcionamento dos hepatócitos, e que por esse motivo o considerou tóxicas à essas células.

Sachetti et al. (2009), além de determinar a DL₅₀ em ratos após administração oral do óleo de copaíba, adicionalmente, conduziu uma avaliação preliminar do potencial neurotóxico do óleo-resina nesses animais, o qual testou doses consecutivas de 300 mg/kg e 2000 mg/kg. Nesse estudo, os resultados de toxicidade aguda demonstraram que a administração do óleo-resina de copaíba não causou mortalidade e/ou morbidade até a dose testada de 2000 mg/kg e foi categorizada como "categoria 5", ou seja, toxicidade letal aguda maior que 2000 mg/kg. Além disso, também não foram verificados efeitos neurotóxicos nas doses testadas.

Um teste de toxicidade oral aguda do óleo de copaíba também foi realizado por Teixeira et al. (2017) que seguiu o Guia 425/2008 da Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), no qual a estimativa da DL₅₀ foi baseada usando o método de teste limite (OECD, 2008). Nesse estudo a dose estabelecida foi de 200 mg/kg/dia, que demonstrou ser de baixa toxicidade e efetiva para modulação da resposta inflamatória.

A genotoxicidade do óleo de copaíba também foi analisada nos estudos de Alves et al. (2017), que por meio do teste do micronúcleo do sangue periférico e o ensaio do cometa,

verificou que a dose de 400 mg/kg, causou danos no DNA dos hepatócitos de camundongos Swiss do sexo masculino. Corroborando com os dados sobre o uso de doses mais baixas em relação a dose utilizada por Castro Ghizoni et al. (2017), Basile et al. (1988) estimou o valor DL₅₀ do óleo de copaíba em 379 mg/kg (321- 447) em ratos, como não tóxica e efetiva.

Portanto, apesar de haver estudos que demonstraram as doses entre 200 e 2000 mg/kg como sendo não tóxica, os dados corroboram com a necessidade de que as doses empregadas sejam determinadas com cautela, sendo necessária mais investigações para estipular uma dose segura (CASTRO GHIZONI et al., 2017; SACHETTI et al., 2009).

5. CONCLUSÃO

A presente revisão sistemática detectou a carência de informações experimentais envolvendo a aplicação do óleo essencial de copaíba e sua ação na artrite induzida em ratos. Tais informações são necessárias, pois se trata de um composto amplamente utilizado por populações nativas da Amazônia e, além disso, bem recebida e empregada no primeiro mundo como analgésico, bactericida e anti-inflamatório para uma variedade de sintomas. A validação do óleo de copaíba como tratamento efetivo contra a AR poderia aliviar os pacientes dos danosos efeitos colaterais das drogas atualmente preconizadas pelas agências públicas de saúde.

Agradecimentos

A Universidade Federal do Amazonas e seu Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada pelo apoio institucional aos autores; A FAPEAM pela bolsa de pós-graduação concedida ao primeiro autor.

Divulgação

Este artigo de revisão sistemática é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista Scientia Amazonia detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

6. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2008.
- AGARWAL, R. B.; RANGARI, V. D. Phytochemical investigation and evaluation of anti-inflammatory and anti-arthritic activities of essential oil of *Strobilanthes ixiocephala* Benth. 2003.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Consultas - Arpynflan**. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351594570201236/>>. Acesso em: 4 nov. 2017.
- AI, R. et al. DNA methylome signature in synoviocytes from patients with early rheumatoid arthritis compared to synoviocytes from patients with longstanding rheumatoid arthritis. **Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)**, v. 67, n. 7, p. 1978–1980, 2015.
- AJUEBOR, M. N. et al. Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 3, p. 1685–1691, 1999.
- AL-KHAMEES, W. A. et al. **Status Epilepticus Associated with Borage Oil Ingestion** *Journal of Medical Toxicology*, 2011.
- AL-OKBI, S. Y. Nutraceuticals of anti-inflammatory activity as complementary therapy for rheumatoid arthritis. **Toxicology and Industrial Health**, v. 30, n. 8, p. 738–749, 2014.
- ALAMANOS, Y.; VOULGARI, P. V.; DROSOS, A. A. Incidence and Prevalence of Rheumatoid Arthritis, Based on the 1987 American College of Rheumatology Criteria: A Systematic Review. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 36, n. 3, p. 182–188, 1 dez. 2006.
- ALETAHA, D.; ALASTI, F.; SMOLEN, J. S. Rheumatoid factor, not antibodies against citrullinated proteins, is associated with baseline disease activity in rheumatoid arthritis clinical trials. **Arthritis research & therapy**, v. 17, n. 1, p. 229, 2015.
- ALLARD, S. A.; BAYLISS, M. T.; MAINI, R. N. The synovium-cartilage junction of the normal human knee: implications for joint destruction and repair. **Arthritis & Rheumatism**, v. 33, n. 8, p. 1170–1179, 1990.
- ALVES, J. M. et al. Copaifera multijuga oleoresin and its constituent diterpene (–)-copalic acid: Genotoxicity and chemoprevention study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 819, p. 26–30, 1 jul. 2017.
- AMAYA-AMAYA, J. et al. Rheumatoid arthritis. 18 jul. 2013.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. **AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition**. 2020. ed. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association (AVMA), 2020.
- AMES-SIBIN, A. P. et al. β -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 12, p. 10262–10277, dez. 2018.
- AMILIA DESTRYANA, R. et al. Antioxidant and Anti-inflammation Activities of Ocotea, Copaiba and Blue Cypress Essential Oils in Vitro and in Vivo. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 9, p. 1531–1542, 5 set. 2014.
- AMMON, H. P. T. **Boswellic acids in chronic inflammatory diseases** *Planta Medica*, 2006.
- ANDERSEN, M. L. et al. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. [s.l.] Departamento de Psicobiologia. Escola Paulista de Medicina. Universidade ..., 2004.
- ARAB, H. H.; EL-SAWALHI, M. M. Carvedilol alleviates adjuvant-induced arthritis and subcutaneous air pouch edema: modulation of oxidative stress and inflammatory mediators. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 268, n. 2, p. 241–248, 2013.
- AREND, W. P.; FIRESTEIN, G. S. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 10, p. 573, 2012.
- ARNOLD, E. et al. Inhibition of Cytosolic Phospholipase A2 α (cPLA2 α) by Medicinal Plants in Relation to Their Phenolic Content. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 8, p. 15033–48, 2015.
- ASADI-SAMANI, M.; BAHMANI, M.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. The chemical composition, botanical characteristic and biological activities of *Borago officinalis*: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical**

Medicine, v. 7, n. S1, p. S22–S28, 2014.

ASQUITH, D. L. et al. Animal models of rheumatoid arthritis. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 8, p. 2040–2044, 11 ago. 2009.

AZZA, Z.; OUDGHIRI, M. In vivo anti-inflammatory and antiarthritic activities of aqueous extracts from *Thymelaea hirsuta*. **Pharmacognosy research**, v. 7, n. 2, p. 213, 2015.

BADDELEY, A. J.; GUNDERSEN, H.-J. G.; CRUZ-ORIVE, L. M. Estimation of surface area from vertical sections. **Journal of microscopy**, v. 142, n. 3, p. 259–276, 1986.

BAETEN, D. et al. Macrophages expressing the scavenger receptor CD163: A link between immune alterations of the gut and synovial inflammation in spondyloarthritis. **Journal of Pathology**, v. 196, n. 3, p. 343–350, 1 mar. 2002.

BARLAND, P.; NOVIKOFF, A. B.; HAMERMAN, D. Electron microscopy of the human synovial membrane. **The Journal of cell biology**, v. 14, n. 2, p. 207–220, 1962.

BARTOK, B.; FIRESTEIN, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. **Immunological Reviews**, v. 233, n. 1, p. 233–255, jan. 2010.

BASILE, A. C. et al. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *copaifera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 1, p. 101–109, 1988.

BASSI, G. S. et al. Spinal GABA-B receptor modulates neutrophil recruitment to the knee joint in zymosan-induced arthritis. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 389, n. 8, p. 851–861, 2016.

BENDELE, A. et al. Animal Models of Arthritis: Relevance to Human Disease. **Toxicologic Pathology**, v. 27, n. 1, p. 134–142, 2 jan. 1999.

BENDELE, A. Animal models of rheumatoid arthritis. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 1, n. 4, p. 377–85, jun. 2001.

BENTO, A. F. et al. β -Caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPAR γ pathway. **The American journal of pathology**, v. 178, n. 3, p. 1153–1166, 2011.

BERMAN, A. Y. et al. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. **npj Precision Oncology**, v. 1, n. 1, p. 35, 2017.

BERTAZZOLO, N. et al. Interrelationships between interleukin (IL)-1, IL-6 and IL-8 in synovial fluid of various arthropathies. **Agents and Actions**, v. 41, n. 1–2, p. 90–92, mar. 1994.

BHATTARAM, P.; CHANDRASEKHARAN, U. The joint synovium: A critical determinant of articular cartilage fate in inflammatory joint diseases. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 62, p. 86–93, 1 fev. 2017.

BIEGERT, C. et al. Efficacy and safety of willow bark extract in the treatment of osteoarthritis and rheumatoid arthritis: results of 2 randomized double-blind controlled trials. **The Journal of rheumatology**, v. 31, n. 11, p. 2121–2130, 2004.

BOLON, B. et al. Rodent preclinical models for developing novel antiarthritic molecules: comparative biology and preferred methods for evaluating efficacy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, 2010.

BONATERRA, G. A. et al. Anti-inflammatory effects of the willow bark extract STW 33-I (Proaktiv®) in LPS-activated human monocytes and differentiated macrophages. **Phytomedicine**, v. 17, n. 14, p. 1106–1113, 2010.

BOTTINI, N.; FIRESTEIN, G. S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, n. 1, p. 24–33, 13 jan. 2013.

BRACHT, A. et al. Oxidative changes in the blood and serum albumin differentiate rats with monoarthritis and polyarthritis. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 36, 15 dez. 2016.

BRACHT, L. et al. Effects of simvastatin, atorvastatin, ezetimibe, and ezetimibe+ simvastatin combination on the inflammatory process and on the liver metabolic changes of arthritic rats. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 26, n. 6, p. 722–734, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, I. E. C. **Resolução Normativa nº37 - Diretriz para prática de eutanásia do CONCEA. Diário Oficial da União (DOU)** Brasília-DF, 22 fev. 2018. Disponível em: <<https://www.ceua.ufv.br/wp-content/uploads/2018/03/DIRETRIZ-DA-PRATICA-DE-EUTANASIA-DO-CONCEA-ATUALIZADA1.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 2021

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2014.** Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/ODAF/RENAME2014ed2015.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2018.** Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<http://portalquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/novembro/23/17-0407M-RENAME-2018.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2019.

BRASIL. **Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e dá outras providências.** Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm>. Acesso em: 28 fev. 2019.

BRASIL; MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, I. E C.; CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: fascículo 2: roedores e lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica [recurso eletrônico].** 1º ed. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, 2019. v. 2

BRAUN, J.; RAU, R. An update on methotrexate. **Current opinion in rheumatology**, v. 21, n. 3, p. 216–223, 2009.

BRENNAN, F. M.; MCINNES, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 11, p. 3537–3545, 2008.

BRENNAN, F. R. et al. CD44 expression by leucocytes in rheumatoid arthritis and modulation by specific antibody: Implications for lymphocyte adhesion to endothelial cells and synoviocytes in vitro. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 45, n. 2, p. 213–220, 1 fev. 1997.

BURGER, J. A. et al. Fibroblast-like synoviocytes support B-cell pseudoemperipolesis via a stromal cell-derived factor-1- and CD106 (VCAM-1)-dependent mechanism. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 3, p. 305–315, 1 fev. 2001.

CABRAL, A. R.; LOYA, B. L.; ALARCON-SEGOVIA, D. Bone remodeling and osteophyte formation after remission of rheumatoid arthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 16, n. 11, p. 1421–1427, 1989.

CALLEJA, M. A. et al. The antioxidant effect of β -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 3, p. 394–401, 2013.

CAMERON, M.; GAGNIER, J. J.; CHRUBASIK, S. Herbal therapy for treating rheumatoid arthritis. **Cochrane database of systematic reviews (Online)**, n. 2, p. CD002948, 2011.

CAPLAZI, P. et al. Mouse Models of Rheumatoid Arthritis. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 5, p. 819–826, 10 set. 2015.

CARDOSO, M. et al. Assessment of Zymosan-Induced Leukocyte Influx in a Rat Model using Sulfated Polysaccharides. **Planta Medica**, v. 76, n. 02, p. 113–119, 3 jan. 2010.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos: anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.** [s.l.] Tecmedd, 2004.

CASTAÑEDA-LOPEZ, M. E. et al. Animal Models of Rheumatoid Arthritis. In: **Experimental Animal Models of Human Diseases - An Effective Therapeutic Strategy.** [s.l.] InTech, 2018.

CASTILHOS, L. G. et al. Effect of Uncaria tomentosa extract on purinergic enzyme activities in lymphocytes of rats submitted to experimental adjuvant arthritis model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, 2015.

CASTOR, C. W. The microscopic structure of normal human synovial tissue. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 3, n. 2, p. 140–151, 1960.

CASTRO, C. A. et al. Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, Tween-20, Tween-80, and emulphor-620. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 50, n. 4, p. 521–526, 1 abr. 1995.

CASTRO GHIZONI, C. V. et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Actions of Copaiba Oil Are Related to Liver Cell Modifications in Arthritic Rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 10, p. 3409–3423,

2017.

CAVALIERI, B. 1635. Geometria indivisibilibus continuorum nova quadam ratione promota. **Bologna. First edition Bologna**, v. 1635, 1635.

CHEN, J. et al. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. **Genome medicine**, v. 8, n. 1, p. 43, 2016.

CIBERE, J. et al. A randomized double blind, placebo controlled trial of topical Tripterygium wilfordii in rheumatoid arthritis: reanalysis using logistic regression analysis. **J Rheumatol**, v. 30, n. 3, p. 465–467, 2003.

CIPRIANI, P. et al. Methotrexate in rheumatoid arthritis: optimizing therapy among different formulations. Current and emerging paradigms. **Clinical therapeutics**, v. 36, n. 3, p. 427–435, 2014.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados**. Brasília: [s.n.]. v. 1

CONTE, F. DE P. et al. Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB₄, TNF- α , and CXCL-1. **Journal of leukocyte biology**, v. 84, n. 3, p. 652–660, 2008.

COOPER, N. J. Economic burden of rheumatoid arthritis: a systematic review. **Rheumatology**, v. 39, n. 1, p. 28–33, 2000.

CROFFORD, L. J. Use of NSAIDs in treating patients with arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 15, n. 3, p. S2, 2013.

CROSS, P. C.; MERCER, K. L. **Cell and tissue ultrastructure: a functional perspective**. [s.l.] WH Freeman New York, 1993.

CROWSON, C. S. et al. The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n. 3, p. 633–639, 2011.

CRUZ-ORIVE, L. M. Stereology of single objects. **Journal of microscopy**, v. 186, n. 2, p. 93–107, 1997.

CURTIS, C. L. et al. n-3 Fatty acids specifically modulate catabolic factors involved in articular cartilage degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 2, p. 721–724, 2000.

CURTIS, C. L. et al. Pathologic indicators of degradation and inflammation in human osteoarthritic cartilage are abrogated by exposure to n-3 fatty acids. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 6, p. 1544–1553, jun. 2002.

DA COSTA, O. T. F. et al. Stereological estimation of surface area and barrier thickness of fish gills in vertical sections. **Journal of Microscopy**, v. 225, n. 1, p. 1–9, 2007.

DA ROSA, C.; MACHADO, C. A. Plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças reumáticas: revisão Herbal medications for the treatment of rheumatics disease: a review. **Rev. Bras. Farm**, v. 88, n. 1, 2007.

DAHAM, S. et al. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11808–11829, 2015.

DATE, K. Scanning electron microscope studies on the synovial membrane. **Archivum histologicum japonicum**, v. 42, n. 5, p. 517–531, 1979.

DE AZEVEDO, A. B. C.; FERRAZ, M. B.; CICONELLI, R. M. Indirect costs of rheumatoid arthritis in Brazil. **Value in Health**, v. 11, n. 5, p. 869–877, 2008.

DE BUFFON, G. L. L. Essai d'arithmétique morale. **Euvres philosophiques**, 1777.

DE LIMA SILVA, J. J. et al. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on Ischemia-Reperfusion of Randomized Skin Flaps in Rats. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 33, n. 1, p. 104–109, 4 jan. 2009.

DEHOFF, R. T. Probes, populations, samples, measurements and relations in stereology. **Image Analysis & Stereology**, v. 19, n. 1, p. 1–8, 2011.

DEL GROSSI MOURA, M. et al. **Oral herbal medicines marketed in Brazil for the treatment of osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis** *Phytotherapy Research*, 2017.

DELESSE, M. A. Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. **CR Acad. Sci. Paris**, v. 25, p. 544–545, 1847.

DELRIO, A. N. et al. Distribution and characteristics of synoviocytes in the rabbit knee joint: a scanning/transmission electron microscopic study. **Italian journal of anatomy and embryology= Archivio italiano di anatomia ed embriologia**, v. 104, n. 1, p. 33–45, 1999.

- DELRIO, A. N.; FADDA, M. Ultrastructural characteristics of the human synoviocytes. **Bollettino della Societa italiana di biologia sperimentale**, v. 66, n. 3, p. 209–14, mar. 1990.
- DENG, G.-M. Animal Models in Rheumatoid Arthritis. In: **Encyclopedia of Medical Immunology**. New York, NY: Springer New York, 2014. p. 36–38.
- DESMARCHELIER, C. Neotropics and natural ingredients for pharmaceuticals: why isn't South American biodiversity on the crest of the wave? **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 6, p. 791–799, 2010.
- DI CARLO, F. J.; FIORE, J. V. On the composition of zymosan. **Science**, v. 127, n. 3301, p. 756–757, 1958.
- DI GIOVINE, F. S. et al. Interleukin 1 (IL 1) as a mediator of crystal arthritis. Stimulation of T cell and synovial fibroblast mitogenesis by urate crystal-induced IL 1. **The Journal of Immunology**, v. 138, n. 10, 1987.
- DIEHL, K. et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **Journal of Applied Toxicology: An International Journal**, v. 21, n. 1, p. 15–23, 2001.
- DONALDSON, L. F.; SECKL, J. R.; MCQUEEN, D. S. A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: effects of adjuvant dose. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 49, n. 1–2, p. 5–10, 1993.
- DURO, C. C. et al. Qualitative study of young, adult, and aged Wistar rats temporomandibular synovial membrane employing light, scanning, and transmission electron microscopy. **Microscopy research and technique**, v. 75, n. 11, p. 1522–1527, 2012.
- EDWARDS, J. C. W. **Synovial intimal fibroblasts**. Annals of the Rheumatic Diseases. **Anais...**BMJ Publishing Group, 1995Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7794049/>>. Acesso em: 11 maio. 2021
- EFTEKHARSADAT, B. et al. Effectiveness of Lavendula stoechas essential oil in treatment of mild to moderate carpal tunnel syndrome: a randomized controlled trial. **Journal of Hand Therapy**, v. 31, n. 4, p. 437–442, 2018.
- EGERTON, R. F. **Electron energy-loss spectroscopy in the electron microscope**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2011.
- EGGELMEIJER, F. et al. Bone metabolism in rheumatoid arthritis; relation to disease activity. **Rheumatology**, v. 32, n. 5, p. 387–391, 1993.
- ELMALI, N. et al. Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. **Inflammation**, v. 30, n. 1–2, p. 1–6, 2007.
- FANG, C. et al. Complement-Dependent Enhancement of CD8 + T Cell Immunity to Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection in Decay-Accelerating Factor-Deficient Mice . **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 5, p. 3178–3186, 1 set. 2007.
- FEDERAL, U. Óleo de copaíba (Copaifera sp .): histórico , extração , aplicações industriais e propriedades medicinais. p. 465–472, 2009.
- FEIJÓ, A.; DE MACEDO BRAGA, L. M. G.; PITREZ, P. M. C. **Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos**. [s.l.] EDIPUCRS, 2010.
- FELLOWS, C. R. et al. Adipose, bone marrow and synovial joint-derived mesenchymal stem cells for cartilage repair. **Frontiers in genetics**, v. 7, p. 213, 2016.
- FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (–)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of Cordia verbenacea. **European journal of pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228–236, 2007.
- FERRERO, R.; WILSON, J.; SUTTON, P. Mouse Models of Helicobacter-Induced Gastric Cancer: Use of Cocarcinogens. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 921, p. 157–173, 27 set. 2012.
- FIGUEREDO, C. A. DE; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 381–400, 2014.
- FONSECA, J. E. et al. Macrophage subpopulations in rheumatoid synovium: Reduced CD163 expression in CD4+ T lymphocyte-rich microenvironments. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 5, p. 1210–1216, 2002.
- FRANCISCO, S. G. Uso do óleo de resina de copaíba (Copaifera Officinalis L) em inflamação ginecológica. **Femina**, v. 33, n. 2, p. 89–93, 2005.
- FRASNELLI, M. E. et al. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Res Ther**, v. 7, n. 2, p. R370, 2005.

- GABRIEL, S. E.; MICHAUD, K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. **Arthritis Research & Therapy**, v. 11, n. 3, p. 229, 2009.
- GEGOUT, P. et al. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: Effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life Sciences**, v. 55, n. 17, 1994.
- GEGOUT, P. et al. Zymosan-induced arthritis in rats II. Effects of anti-inflammatory drugs. **Life Sciences**, v. 56, n. 20, p. PL389–PL394, 7 abr. 1995.
- GELMINI, F. et al. GC–MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 440, n. 2, p. 170–178, jan. 2013.
- GERTSCH, J. et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9099–9104, 2008.
- GIBOFISKY, A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. **The American journal of managed care**, v. 18, n. Suppl 13, p. 295–302, 2012.
- GOMES, N. M. et al. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 486–492, 2007.
- GRAABAEK, P. M. Characteristics of the two types of synoviocytes in rat synovial membrane. An ultrastructural study. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 50, n. 6, p. 690–702, jun. 1984.
- GREGERSEN, P. K.; SILVER, J.; WINCHESTER, R. J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 30, n. 11, p. 1205–1213, 1987.
- GRIGOR, C. et al. Effect of a treatment strategy of tight control for rheumatoid arthritis (the TICORA study): a single-blind randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 364, n. 9430, p. 263–269, 2004.
- GUAZELLI, C. F. S. et al. Quercetin attenuates zymosan-induced arthritis in mice. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 102, p. 175–184, 2018.
- GUERRA, G. C. B. et al. Olmesartan Prevented Intra-articular Inflammation Induced by Zymosan in Rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 11, p. 1793–1801, 2016a.
- GUERRA, G. C. B. et al. Olmesartan prevented intra-articular inflammation induced by zymosan in rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 11, p. 1793–1801, 2016b.
- GUERRERO, A. T. G. et al. Involvement of LTB₄ in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE₂. **Journal of leukocyte biology**, v. 83, n. 1, p. 122–130, 2008.
- GUIDELINES, A. C. OF R. S. ON R. A. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 update. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 2, p. 328–346, 2002.
- GUNDERSEN, H. J. G. et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**, v. 96, n. 1–6, p. 379–394, jan. 1988.
- GUNDERSEN, H. J. G.; JENSEN, E. B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **Journal of microscopy**, v. 147, n. 3, p. 229–263, 1987.
- GUNDERSEN, H. J. G.; ØSTERBY, R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or ‘Do more less well!’. **Journal of Microscopy**, v. 121, n. 1, p. 65–73, jan. 1981.
- HADDAD, A. et al. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. 3º ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. **Paleontological statistics software package for education and data analysis.**–**Paleontologia Electronica** 4/1: 1–9, 2001.
- HASHIMOTO, K. et al. LOX-1 deficient mice show resistance to zymosan-induced arthritis. **European journal of histochemistry: EJH**, v. 62, n. 1, 2018.
- HENDERSON, B.; REVELL, P. A.; EDWARDS, J. C. **Synovial lining cell hyperplasia in rheumatoid arthritis: dogma and fact.****Annals of the rheumatic diseases** Ann Rheum Dis, , 1988. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3284489/>>. Acesso em: 11 maio. 2021
- HOLERS, V. M. Autoimmunity to citrullinated proteins and the initiation of rheumatoid arthritis. **Current**

opinion in immunology, v. 25, n. 6, p. 728–735, 2013.

HOWARD, V.; REED, M. **Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy**. [s.l.] Garland Science, 2004.

HUMBY, F. et al. Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. **PLoS medicine**, v. 6, n. 1, p. e1, 2009.

ISHIGURO, N. et al. Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover: analyses of synovial fluid from patients with osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 42, n. 1, p. 129–136, 1999a.

ISHIGURO, N. et al. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and glycosaminoglycans in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 26, n. 1, p. 34–40, 1999b.

IWANAGA, T. et al. Morphology and Functional Roles of Synoviocytes in the Joint. **Archives of Histology and Cytology**, v. 63, n. 1, p. 17–31, 2000.

JENSEN, E. B.; GUNDERSEN, H. J. G. Fundamental stereological formulae based on isotropically orientated probes through fixed points with applications to particle analysis. **Journal of Microscopy**, v. 153, n. 3, p. 249–267, 1989.

Ji, J. et al. Novel benzenediamine derivative FC99 ameliorates zymosan-induced arthritis by inhibiting ROR γ t expression and Th17 cell differentiation. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 46, n. 10, p. 829–836, 2014.

JIANG, Q. et al. Will Chinese external therapy with compound *Tripterygium wilfordii* hook F gel safely control disease activity in patients with rheumatoid arthritis: Design of a double-blinded randomized controlled trial. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, 2017.

JIN, J. H. et al. Anti-allergic activity of sesquiterpenes from the rhizomes of *Cyperus rotundus*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 2, p. 223–228, 2011.

JOOSTEN, L. A. B. et al. IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 9, p. 3298–3303, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 13^a ed. [s.l.: s.n.].

KENNEDY, A. et al. **Macrophages in synovial inflammation** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 10 out. 2011. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 11 maio. 2021

KEY, J. A. Synovial membrane in special Cytology. **New York. (Quoted from Kling.)**, 1928.

KEYSTONE, E. C. et al. Zymosan—Induced Arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 20, n. 7, p. 1396–1401, 1 set. 1977.

KEYSZER, G. et al. Differential expression of cathepsins B and L compared with matrix metalloproteinases and their respective inhibitors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: A parallel investigation by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction . **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 41, n. 8, p. 1378–1387, 1998.

KIENER, H. P. et al. Cadherin 11 promotes invasive behavior of fibroblast-like synoviocytes. **Arthritis & Rheumatism**, v. 60, n. 5, p. 1305–1310, 2009.

KITAS, G. D.; GABRIEL, S. E. Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: state of the art and future perspectives. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 70, n. 1, p. 8–14, 2011.

KOBAYASHI, C. et al. Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 3, p. 306–313, 16 mar. 2011a.

KOBAYASHI, C. et al. Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 3, p. 306–313, 16 mar. 2011b.

KOMEH-NKRUMAH, S. A. et al. Topical dermal application of essential oils attenuates the severity of adjuvant arthritis in Lewis rats. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 1, p. 54–59, 2012.

KREMER, J. R.; MASTRONARDE, D. N.; MCINTOSH, J. R. Computer Visualization of Three-Dimensional Image Data Using IMOD. **Journal of Structural Biology**, v. 116, n. 1, p. 71–76, jan. 1996.

KUBOTA, E. et al. Synovial fluid cytokines and proteinases as markers of temporomandibular joint disease. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 56, n. 2, p. 192–198, 1998.

- LAURINDO, I. M. M. et al. Artrite reumatóide: Diagnóstico e Tratamento. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 44, n. 6, p. 435–442, 2004.
- LEANDRO, L. M. et al. **Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (Copaifera spp.) oleoresins** *Molecules*, 2012.
- LEFÈVRE, S. et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. **Nature medicine**, v. 15, n. 12, p. 1414, 2009.
- LEIGH, R. D.; CAMBRIDGE, G.; EDWARDS, J. C. W. Expression of B cell survival cofactors on synovial fibroblasts. **Br J Rheumatol**, v. 1, p. 110, 1996.
- LEVENTHAL, L. J.; BOYCE, E. G.; ZURIER, R. B. Treatment of rheumatoid arthritis with blackcurrant seed oil. **Rheumatology**, v. 33, n. 9, p. 847–852, 1994.
- LEVÊQUE, D. et al. Pharmacokinetic drug–drug interactions with methotrexate in oncology. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 4, n. 6, p. 743–750, 2011.
- LEWIS, W. H. **Elvin-Lewis. MPF Medical Botany—plants affecting man’s health** John Wiley & Sons, , 1977.
- LI, P. et al. NF-κB Regulates VCAM-1 Expression on Fibroblast-Like Synoviocytes. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 11, p. 5990–5997, 1 jun. 2000.
- LIMA, S. R. M. et al. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 17, n. 9, p. 1048–1053, 2003.
- LINDSLEY, H. B. et al. Proinflammatory Cytokines Enhance Human Synoviocyte Expression of Functional Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1). **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 68, n. 3, p. 311–320, 1 set. 1993.
- LIU, H. et al. Neuroprotective effects of trans-caryophyllene against kainic acid induced seizure activity and oxidative stress in mice. **Neurochemical research**, v. 40, n. 1, p. 118–123, 2015.
- LJUNG, L.; RANTAPÄÄ-DAHLQVIST, S. Abdominal obesity, gender and the risk of rheumatoid arthritis—a nested case–control study. **Arthritis research & therapy**, v. 18, n. 1, p. 277, 2016.
- LLOYD, J. U. **Copaifera officinalis**. [s.l.] Engelhard, 1898.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. [s.l.: s.n.].
- LUCCA, L. G. et al. Determination of β-caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 104, p. 144–148, 2015.
- MACGREGOR, A. J. et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 43, n. 1, p. 30–37, 2000.
- MALEMBA, J. J. et al. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Kinshasa, Democratic Republic of Congo—a population-based study. **Rheumatology**, v. 51, n. 9, p. 1644–1647, 2012.
- MALMSTRÖM, V.; CATRINA, A. I.; KLARESKOG, L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 1, p. 60, 2017.
- MARQUES NETO, JF; GONÇALVES, ET; LANGEN, LF; CUNHA, MF; RADOMINSKI, S; OLIVEIRA, SM; CURY, SE; MEDEIROS, F; SAMPAIO, G. Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatóide do adulto em amostras da população brasileira. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 33, n. 5, p. 169–73, 1993.
- MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREIRA, J. F.; LIMA, H. C. DE. **O gênero *Copaifera* (Leguminosae — Caesalpinioideae) na Amazônia brasileira** *Rodriguésia* Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, , 2008. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/23499872>>. Acesso em: 3 fev. 2018
- MCDONALD, J. N.; LEVICK, J. R. Morphology of surface synoviocytes in situ at normal and raised joint pressure, studied by scanning electron microscopy. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 47, n. 3, p. 232–240, 1988.
- MCILWRAITH, C. W. **Disease processes of synovial membrane, fibrous capsule, ligaments, and articular cartilage**. Proceedings of 47th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. **Anais...**2001

- MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 23, p. 2205–2219, 2011.
- MEGRAJ, K. V. K. et al. Biological activities of some Indian medicinal plants. **Journal of Advanced pharmacy education & research**, v. 1, p. 12–44, 2011.
- MELLER, S. T.; GEBHART, G. F. Intraplantar zymosan as a reliable, quantifiable model of thermal and mechanical hyperalgesia in the rat. **European Journal of Pain**, v. 1, n. 1, p. 43–52, 1 mar. 1997.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - SISTEMA DE INFORMAÇÕES HOSPITALARES DO SUS (SIH/SUS). **Morbidade Hospitalar do SUS - por local de internação - Brasil - Artrite reumatóide e outras poliartropatias inflamatórias**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>>. Acesso em: 3 out. 2017.
- MORALES-DUCRET, J. et al. Alpha 4/beta 1 integrin (VLA-4) ligands in arthritis. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in synovium and on fibroblast-like synoviocytes. **The Journal of Immunology**, v. 149, n. 4, 1992.
- MOTA, L. M. H. DA et al. Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 3, p. 207–219, 2011.
- MOTA, L. M. H. DA; LAURINDO, I. M. M.; SANTOS NETO, L. L. DOS. Artrite reumatoide inicial: conceitos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 2, p. 227–229, 2010.
- MOUDGIL, K. D.; KIM, P.; BRAHN, E. Advances in rheumatoid arthritis animal models. **Current rheumatology reports**, v. 13, n. 5, p. 456–63, out. 2011.
- MUR, E. et al. Randomized double blind trial of an extract from the pentacyclic alkaloid-chemotype of *Uncaria tomentosa* for the treatment of rheumatoid arthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 29, n. 4, p. 678–81, 2002.
- MURASHIGE, N. et al. Normal structure and morphological effects of a corticosteroid on the peripatellar synovial membrane of the rat. **Kaibogaku zasshi. Journal of anatomy**, v. 74, n. 2, p. 183–189, 1999.
- NEVES, S. M. P. et al. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Instituto de Química/Universidade de São Paulo (FCF-IQ/USP), 2013.
- NGO, S. T.; STEYN, F. J.; MCCOMBE, P. A. Gender differences in autoimmune disease. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 347–369, 2014.
- NICOL, S.; FOSTER, J.; KAWAGUCHI, S. The fishery for Antarctic krill - recent developments. **Fish and Fisheries**, v. 13, n. 1, p. 30–40, 2012.
- NIO, J. et al. Three-dimensional Ultrastructure of Synoviocytes in the Knee Joint of Rabbits and Morphological Changes in Osteoarthritis Model. **Archives of Histology and Cytology**, v. 65, n. 2, p. 189–200, 2002.
- NISSEN, S. E. et al. Cardiovascular safety of celecoxib, naproxen, or ibuprofen for arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 375, p. 2519–2529, 2016.
- NOZAKI, Y. et al. Species difference in the inhibitory effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the uptake of methotrexate by human kidney slices. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 322, n. 3, p. 1162–1170, 2007.
- OECD. **Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure**. [s.l.] OECD Publishing, 2008.
- OLIVEIRA, F. M. DE; LYRA, I. N.; ESTEVES, G. S. G. Avaliação microbiológica e físico-química de iogurtes de morango industrializados e comercializados no município de Linhares–ES. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 2, p. 147–155, 2013.
- OLIVER, S. J.; BRAHN, E. Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective. **The Journal of rheumatology. Supplement**, v. 44, p. 56–60, 1996.
- OLSEN, N. J.; STEIN, C. M. New Drugs for Rheumatoid Arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 21, p. 2167–2179, 20 maio 2004.
- ORIVE, L.-M. C. On the estimation of particle number. **Journal of Microscopy**, v. 120, n. 1, p. 15–27, set. 1980.
- PAIVA, A. A. D. O. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Lobophora variegata* on zymosan-induced arthritis in rats. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 9, p. 1241–1250,

set. 2011a.

PAIVA, A. A. D. O. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Lobophora variegata* on zymosan-induced arthritis in rats. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 9, p. 1241–1250, 1 set. 2011b.

PAIVA, L. A. . et al. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 1, p. 51–56, jul. 2004.

PAREEK, A. et al. Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): A systematic review. **Pharmacognosy reviews**, v. 5, n. 9, p. 103–10, jan. 2011.

PARTSCH, G. et al. Highly increased levels of tumor necrosis factor-alpha and other proinflammatory cytokines in psoriatic arthritis synovial fluid. **The Journal of rheumatology**, v. 24, n. 3, p. 518–523, 1997.

PATRICK, M.; HEPTINSTALL, S.; DOHERTY, M. Feverfew in rheumatoid arthritis: a double blind, placebo controlled study. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 48, n. 7, p. 547–9, 1989.

PAUL, S. et al. Assessment of anti-inflammatory and anti-arthritic properties of *Acmella uliginosa* (Sw.) Cass. based on experiments in arthritic rat models and qualitative gas chromatography-mass spectrometry analyses. **Journal of intercultural ethnopharmacology**, v. 5, n. 3, p. 257, 2016.

PEARSON, C. M.; WOOD, F. D. Studies of polyarthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant. I. General clinical and pathologic characteristics and some modifying factors. **Arthritis & Rheumatology**, v. 2, n. 5, p. 440–459, 1959.

PEARSON, C. M.; WOOD, F. D. Studies of arthritis and other lesions induced in rats by the injection of mycobacterial adjuvant: VII. Pathologic details of the arthritis and spondylitis. **The American journal of pathology**, v. 42, n. 1, p. 73, 1963.

PENIDO, C. et al. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. **Inflammation Research**, v. 55, n. 11, p. 457–464, nov. 2006.

PENNYCOOK, S. J.; NELLIST, P. D. **Scanning transmission electron microscopy: imaging and analysis**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2011.

PHILIPPE, L. et al. MiR-20a regulates ASK1 expression and TLR4-dependent cytokine release in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 72, n. 6, p. 1071–1079, 2013.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465–472, 2009.

PILLEMER, L. A.; ECKER, E. E. Anticomplementary factor in fresh yeast. **J Biol Chem**, v. 137, n. 1, p. 139–142, 1941.

PINTO, L. G. et al. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. **Pain**, v. 148, n. 2, p. 247–256, 2010.

RAMOS, M. et al. Enfermedades autoinmunes sistémicas y reumatológicas. **1ª**, 2005.

RAMOS, M. F. DE S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por 'spray-drying': estudo de estabilidade e avaliação farmacológica** Universidade de São Paulo, , 2006.

RASBAND, W. S. **ImageJ 1997–2007. US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA**, 2008.

REDLICH, K.; SMOLEN, J. S. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. **Nature reviews Drug discovery**, v. 11, n. 3, p. 234, 2012.

REED, M. G.; HOWARD, C. V.; DE YANÉS, G. S. One-Stop Stereology: the estimation of 3D parameters using Isotropic Rulers. **Journal of microscopy**, v. 239, n. 1, p. 54–65, 2010.

RIBEL-MADSEN, S. et al. A Synoviocyte Model for Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis: Response to Ibuprofen, Betamethasone, and Ginger Extract—A Cross-Sectional In Vitro Study . **Arthritis**, v. 2012, p. 1–9, 31 dez. 2012.

RIZZO, L. V.; CAMARGO, L. F. A. Pesquisa clínica no Brasil. **Einstein (São Paulo)**, v. 11, n. 1, p. vii–viii, mar. 2013.

ROCHA, F. A. C. DA et al. Efeito de inibidores da sintase de óxido nítrico na dor inflamatória articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 4, p. 206–217,

2003.

ROCHA, F. A. C. et al. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflammation Research**, v. 48, n. 9, p. 485–490, 1999.

RODRIGUES, A. G.; SANTOS, M. G. DOS; AMARAL, A. C. F. Políticas públicas em plantas medicinais e fitoterápicos. **Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de assistência farmacêutica. Fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos. Brasília:(DF): MS**, p. 9–28, 2006.

ROSA, I. et al. Morphological evidence of telocytes in human synovium. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

ROSAS, E. C. et al. Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 490–498, 2015a.

ROSAS, E. C. et al. Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 490–498, 8 out. 2015b.

ROSE, H. Electron Microscopy. **Optik**, v. 39, n. 4, p. 416–436, 1974.

ROSIWAL, A. Ueber geometrische Gesteinsanalysen. **Verh. KK Geol. Reichsanst Wien**, p. 143–175, 1898.

SACHETTI, C. G. et al. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 937–941, 2009.

SAFAYHI, H. et al. Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 261, n. 3, p. 1143–6, 1992.

SALLIOT, C.; VAN DER HEIJDE, D. Long term safety of methotrexate monotherapy in rheumatoid arthritis patients: a systematic literature research. **Annals of the rheumatic diseases**, 2008.

SANTOS, A. O. et al. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 204–208, 2008.

SASTRY, S. V.; NYSHADHAM, J. R.; FIX, J. A. Recent technological advances in oral drug delivery—a review. **Pharmaceutical science & technology today**, v. 3, n. 4, p. 138–145, 2000.

SATO, E. I. et al. Estudo da prevalência da artrite reumatóide em população de origem japonesa em Moji das Cruzes, São Paulo. **Rev. bras. reumatol**, p. 133–6, 1990.

SCHEIMAN, J. M. NSAID-induced gastrointestinal injury: A focused update for clinicians. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 50, n. 1, p. 5–10, 2016.

SCHETT, G. **Erosive arthritis** *Arthritis Research and Therapy*, 2007.

SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. J. **Rheumatoid arthritis**. *The Lancet*. **Anais...Elsevier B.V.**, 25 set. 2010

SENNA, E. R. et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **The Journal of Rheumatology**, v. 31, n. 3, p. 594–597, 2004.

SHEALY, D. J. et al. Anti-TNF-alpha antibody allows healing of joint damage in polyarthritic transgenic mice. **Arthritis research**, v. 4, n. 5, p. R7, 2002.

SHIKICHI, M. et al. Three-dimensional ultrastructure of synoviocytes in the horse joint as revealed by the scanning electron microscope. **Archives of histology and cytology**, v. 62, n. 3, p. 219–229, 1999.

SHIKICHI, M. Three-dimensional Ultrastructure of Synoviocytes in the Horse Joint. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 55–56, 2000.

SHIOZAWA, S. et al. Pathogenesis of joint destruction in rheumatoid arthritis. **Archivum immunologiae et therapiiae experimentalis**, v. 59, n. 2, p. 89–95, 2011.

SILVA, E. DE A. Avaliação química e farmacológica do óleo destilado de copaiba (*Copaifera* spp.-*Leguminosae*/*Caesalpinoideae*) e aplicações biotecnológicas. 2019.

SILVA JÚNIOR, F. S.; ROCHA, F. A. C. Artrite induzida por Zymosan em ratos—Mecanismos envolvidos na hipernocicepção e finalise da cartilagem articular. **Acta Reum. Port**, v. 31, p. 143–149, 2006.

SINGH, J. A. et al. Immunohistochemistry of normal human knee synovium: A quantitative study. **Annals of**

the Rheumatic Diseases, v. 63, n. 7, p. 785–790, jul. 2004a.

SINGH, J. A. et al. Immunohistochemistry of normal human knee synovium: A quantitative study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 63, n. 7, p. 785–790, jul. 2004b.

SINGH, J.; FURST, D.; BHARAT, A. 2012 Update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. **Arthritis Care & Research**, v. 64, n. 5, p. 625–39, 2012.

SMITH, M. D. et al. Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. 4, p. 303–307, 1 abr. 2003.

SMITH, M. D. Suppl 1: the normal synovium. **The open rheumatology journal**, v. 5, p. 100, 2011.

SMITH, M. D.; WECHALEKAR, M. D. The synovium. In: **Rheumatology**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 27–32.

SMOLEN, J. S. et al. Validity and reliability of the twenty-eight-joint count for the assessment of rheumatoid arthritis activity. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 38, n. 1, p. 38–43, 1995.

SMOLEN, J. S. et al. **New therapies for treatment of rheumatoid arthritis** *Lancet*, 2007.

SMOLEN, J. S. et al. Proposal for a new nomenclature of disease-modifying antirheumatic drugs. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 73, n. 1, p. 3–5, 2014a.

SMOLEN, J. S. et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 73, n. 3, p. 492–509, 23 mar. 2014b.

SMOLEN, J. S. et al. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 75, n. 1, p. 3–15, 2016.

SMOLEN, J. S. et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 76, n. 6, p. 960–977, 2017.

SMOLEN, J. S. et al. Rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 18001, 8 fev. 2018.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 388, n. 10055, p. 2023–2038, 22 out. 2016.

SOEKEN, K. L.; MILLER, S. A.; ERNST, E. **Herbal medicines for the treatment of rheumatoid arthritis: A systematic review** *Rheumatology*, 2003.

STAHL, E. A. et al. Bayesian inference analyses of the polygenic architecture of rheumatoid arthritis. **Nature genetics**, v. 44, n. 5, p. 483, 2012.

STANCZYK, J. et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n. 4, p. 1001–1009, 2008.

STEINER, G. Auto-antibodies and autoreactive T-cells in rheumatoid arthritis. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 32, n. 1, p. 23, 2007.

STEVENS, C. R.; MAPP, P. I.; REVELL, P. A. A monoclonal antibody (Mab 67) marks type B synoviocytes. **Rheumatology International**, v. 10, n. 3, p. 103–106, maio 1990.

STOLT, P. et al. Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 64, n. 4, p. 582–586, 2005.

STREHL, C. et al. Defining conditions where long-term glucocorticoid treatment has an acceptably low level of harm to facilitate implementation of existing recommendations: viewpoints from an EULAR task force. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 75, n. 6, p. 952–957, 2016.

STRICKLEY, R. G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. **Pharmaceutical research**, v. 21, n. 2, p. 201–230, 2004.

SWAAK, A. J. et al. Interleukin-6 (IL-6) in synovial fluid and serum of patients with rheumatic diseases. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 17, n. 6, p. 469–474, 1988.

TANIA PINHEIRO, M. et al. **ACTA SCIENTIFIC MEDICAL SCIENCES Evaluation of the Anti-Inflammatory Activity of the Oil from the Pequi (Caryocar brasiliensis Camb) in Mice**. [s.l.: s.n.].

- Disponível em: <<https://www.actascientific.com/ASMS/pdf/ASMS-02-0115.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2019.
- TANNER, M. R. et al. KCa1.1 channels regulate b1-integrin function and cell adhesion in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **FASEB Journal**, v. 31, n. 8, p. 3309–3320, 1 ago. 2017.
- TAPPIN, M. R. R. et al. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 236–240, 2004.
- TARAFDER, S.; LEE, C. H. Synovial Joint. In: **In Situ Tissue Regeneration**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 253–273.
- TAYLOR, P. R. et al. The β -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. **The Journal of immunology**, v. 169, n. 7, p. 3876–3882, 2002.
- TEIXEIRA, F. B. et al. Copaiba oil-resin (*Copaifera reticulata* Ducke) modulates the inflammation in a model of injury to rats' tongues. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 313, 14 jun. 2017.
- THOMSON, E. Quantitative microscopic analysis. **The Journal of Geology**, v. 38, n. 3, p. 193–222, 1930.
- THYSS, A. et al. Clinical and pharmacokinetic evidence of a life-threatening interaction between methotrexate and ketoprofen. **The Lancet**, v. 327, n. 8475, p. 256–258, 1986.
- TOBÓN, G. J.; YOUINOU, P.; SARAUX, A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, v. 35, n. 1, p. 10–14, 2010.
- TRYNKA, G. et al. Chromatin marks identify critical cell types for fine mapping complex trait variants. **Nature genetics**, v. 45, n. 2, p. 124, 2013.
- TURCOTTE, C. et al. The CB 2 receptor and its role as a regulator of inflammation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 23, p. 4449–4470, 2016.
- UHLIG, T.; MOE, R. H.; KVIEN, T. K. The Burden of Disease in Rheumatoid Arthritis. **PharmacoEconomics**, v. 32, n. 9, p. 841–851, 25 set. 2014.
- UNDERHILL, D. M. Macrophage recognition of zymosan particles. **Journal of endotoxin research**, v. 9, n. 3, p. 176–180, 2003.
- UTSUNOMIYA, I.; ITO, M.; OH-ISHI, S. Generation of inflammatory cytokines in zymosan-induced pleurisy in rats: TNF induces IL-6 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in vivo. **Cytokine**, v. 10, n. 12, p. 956–963, 1998.
- VASCONCELOS, C. P. P. DE. **Pré-condicionamento e tratamento com misturas de óleos de ômega-3, 6 e 9 sobre a inflamação e a reabsorção óssea na doença periodontal experimental**, 29 abr. 2013. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/26332>>. Acesso em: 3 fev. 2018
- VASILJEVIC, D. et al. Evaluation of the effects of different supplementation on oxidative status in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 35, p. 1909–1915, 2016.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273–286, maio 2002.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, jun. 2005.
- VEIGA, V. F. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 248–254, jun. 2007.
- VESPERINI, V. et al. Association of tobacco exposure and reduction of radiographic progression in early rheumatoid arthritis: results from a French multicenter cohort. **Arthritis care & research**, v. 65, n. 12, p. 1899–1906, 2013.
- VIJAYALAXMI, A. et al. Anti-arthritic and anti inflammatory activity of beta caryophyllene against Freund's complete adjuvant induced arthritis in wistar rats. **Journal of Bone Reports & Recommendations**, v. 1, n. 29, p. 1–10, 2015.
- VILELA, C. A. A.; ARTUR, P. O. Secagem do açafrão (*Curcuma longa* L.) em diferentes cortes geométricos TT - Drying of *Curcuma longa* L. in different shapes. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 28, n. 2, p. 387–394, 2008.
- VOLMAN, T. J. H.; HENDRIKS, T.; GORIS, R. J. A. Zymosan-induced generalized inflammation: experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome. **Shock (Augusta, Ga.)**,

v. 23, n. 4, p. 291–7, abr. 2005.

WALAKOVITS, L. A. et al. Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 35, n. 1, p. 35–42, 1992.

WANG, X. et al. Treatment of rheumatoid arthritis with combination of methotrexate and Tripterygium wilfordii: A meta-analysis. **Life Sciences**, v. 171, p. 45–50, 2017.

WEIBEL, E. R. **Stereological Methods: Theoretical Foundations. Vol. 2.** [s.l.] Academic Press, London, 1980.

WEINBLATT, M. E.; KURITZKY, L. Rapid rheumatoid arthritis: primary care initiative for improved diagnosis and outcomes. **Journal of Family Practice**, v. 56, n. 4, p. S1–S1, 2007.

WEST, M. J. Introduction to stereology. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2012, n. 8, p. pdb.top070623, 1 ago. 2012.

WIJEKOON, H. M. S. et al. Anti-arthritic effect of pentosan polysulfate in rats with collagen-induced arthritis. **Research in veterinary science**, v. 122, p. 179–185, 2019.

WINEY, M. et al. Conventional transmission electron microscopy. **Molecular biology of the cell**, v. 25, n. 3, p. 319–323, 2014.

WOOD, J. N. From plant extract to molecular panacea: a commentary on Stone (1763) “An account of the success of the bark of the willow in the cure of the agues”. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 370, n. 1666, p. 20140317, 19 abr. 2015.

WRIGHT, H. L.; MOOTS, R. J.; EDWARDS, S. W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 10, p. 593–601, 2014.

WYSOCKI, G. P. Scanning electron microscopy of synovial membranes. **Arch Path**, v. 93, p. 172–177, 1972.

YANG, C. S.; WANG, Z. Y. **Tea and cancer** **Journal of the National Cancer Institute**, 1993.

ZIFF, M. Relation of cellular infiltration of rheumatoid synovial membrane to its immune response. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 17, n. 3, p. 313–319, 1974.

ZURIER, R. B. et al. Gamma-linolenic acid treatment of rheumatoid arthritis. A randomized, placebo-controlled trial. **Arthritis and rheumatism**, v. 39, n. 11, p. 1808–1817, 1996.

Capítulo 2

O efeito do óleo de copaíba (Copaifera spp.) sobre a morfologia das articulações de camundongos na artrite aguda induzida por Zymosan

RESUMO

A ação do óleo de copaíba como um agente anti-inflamatório é amplamente difundida na literatura, principalmente em modelos animais. Contudo os seus efeitos especificamente sobre as alterações em articulações artríticas, tais como a hiperplasia dos sinoviócitos, infiltração de células imunes e invasão tecidual necessitam serem elucidadas. **Objetivo:** Investigar o efeito do óleo de copaíba (*Copaifera* spp.) sobre a morfologia da articulação interfalangeana proximal (IFP) em camundongos na inflamação aguda induzida por Zymosan (Zy). **Materiais e métodos:** Trinta e seis camundongos BALB/c, fêmeas, foram divididos em seis grupos ($n=6$). Desses, quatro grupos foram submetidos à artrite induzida por Zymosan (AZy), ao inocular 25 μ L da solução (500 μ g) na pata esquerda, por via s.c. Aos outros dois grupos foram aplicados salina na pata. Os grupos também distinguiram-se pelo tratamento orogástrico (o.g.) (gavagem) prévio (30 minutos antes da indução), sendo os grupos “Cop300 e Cop600” administrados óleo de copaíba nas concentrações de 300 g/kg e 600 g/kg, respectivamente, o grupo “Diclo” com fármaco padrão (diclofenaco a 100 mg/kg) (Diclo) e o “Artrítico” com solução salina. Ainda, aos dois grupos não induzidos à AZy, “Controle” e “CCop”, foram administrados salina e óleo de copaíba a 300 mg/kg (CCop), respectivamente. Durante o período de experimentação os animais foram avaliados quanto ao peso corpóreo e volume da pata (por paquímetro digital). Findado o período de 96 horas (após inoculação de Zy ou salina), os animais foram eutanasiados e então suas patas e tecidos foram removidos para processamento e estudo histomorfológico e estereológico das articulações interfalangeana proximal (IFP) e de seus componentes (cápsula, sinóvia, espaço sinovial, cartilagem e osso). Sobre o estudo estereológico, foram avaliados o volume absoluto, pelos princípios de Cavalieri e Delesse, e área superficial, por Buffon. Ainda, os resultados estereológicos foram integrados em análise multivariada para estabelecer o papel do óleo de copaíba na artrite experimental induzida na articulação IFP. **Resultados:** A AZy desenvolveu alterações-chaves na pata, causando inchaço da pata. Além disso, também houve alterações características de articulações artríticas, como o aumento do volume total da articulação IFP e de alguns componentes tais como a membrana sinovial, que ao exame histomorfológico demonstrou-se hiperplásica, resultando também no aumento da área superficial. O grupo artrítico também demonstrou alterações como redução do volume da cartilagem e do osso periarticular, que foram evidenciadas ao exame microscópico por perda de tecido cartilaginoso e ósseo, respectivamente. O óleo de copaíba, em ambas as concentrações analisadas, demonstrou-se eficaz em conter o edema de pata nas primeiras horas (1h e 3h) do processo inflamatório. Contudo, essa capacidade foi reduzindo ao longo do tempo e cessou após 48h, retomando às 96 h apenas na concentração de 600mg/kg. Sobre as alterações morfológicas e morfométricas, o óleo de copaíba demonstrou resultados satisfatórios, tendo em vista que foi similar ao controle e/ou fármaco padrão na maioria das variáveis analisadas, sendo capaz de manter o volume e área superficial da articulação e seus componentes próximos a esses grupos. **Conclusão:** O óleo de copaíba demonstrou-se promissor em conter o edema de pata, porém a dose e período de tratamento devem ser reavaliadas para melhores resultados, ainda esse produto também demonstrou-se eficaz em preservar a morfologia e morfometria da articulação sinovial e dos seus componentes, sendo uma alternativa terapêutica para articulações artríticas, cujos mecanismos de ação devem ser investigados.

Palavras-chaves: Zymosan, estereologia, morfologia, articulação, modelo animal, artrite.

ABSTRACT

The action of copaiba oil as an anti-inflammatory agent is widely disseminated in the literature, mainly in animal models. However, its effects specifically on changes in arthritic joints, such as synoviocyte hyperplasia, immune cell infiltration and tissue invasion need to be elucidated. **Objective:** To investigate the effect of copaiba oil (*Copaifera* spp.) on the morphology of the proximal interphalangeal joint (PIF) in mice in acute inflammation induced by Zymosan (Zy). **Materials and methods:** Thirty-six female BALB/c mice were divided into six groups (n=6). Four of these were induced to experimental arthritis by Zymosan (AZy), by inoculating 25 μ L of the solution in the left paw, via the s.c. route. The other two groups were given saline in the paw. The groups were also distinguished by previous orogastric treatment (og) (gavage) (30 minutes before induction), with the groups "Cop300 and Cop600" being administered copaiba oil at concentrations of 300 g/kg and 600 g/kg, respectively, the "Dichlo" group with standard drug (100 mg/kg diclofenac) (Dichlo) and the "Arthritic" with saline solution. Furthermore, the two groups not induced to AZy, "Control" and "CCop", were administered saline and copaiba oil at 300 mg/kg (CCop), respectively. During the experimentation period, the animals were evaluated for body weight and paw volume (by digital caliper). After the 96-hour period (after Zy or saline inoculation), the animals were euthanized and then their paws and tissues were removed for processing and histomorphological and stereological study of the proximal interphalangeal joints (PFI) and their components (capsule, synovium, synovial space, cartilage and bone). Regarding the stereological study, the absolute volume was evaluated, according to the principles of Cavalieri and Delesse, and the surface area, by Buffon. Furthermore, the stereological results were integrated into multivariate analysis to establish the role of copaiba oil in experimental arthritis induced in the IFP joint. **Results:** AZy developed key changes in the paw, causing paw swelling. In addition, there were also changes characteristic of arthritic joints, such as the increase in the total volume of the PIP joint and in some components such as the synovial membrane, which, on histomorphological examination, showed to be hyperplastic, also resulting in an increase in the surface area. The arthritic group also showed changes such as a reduction in the volume of cartilage and periarticular bone, which were evidenced on microscopic examination by loss of cartilage and bone tissue, respectively. Copaiba oil, at both concentrations analyzed, proved to be effective in containing paw edema in the first hours (1 and 3 hours) of the inflammatory process. However, this capacity was reduced over time and ceased after 48 hours, returning at 96 hours only at the concentration of 600mg/kg. Regarding morphological and morphometric changes, copaiba oil showed satisfactory results, considering that it was similar to the control and/or standard drug in most of the analyzed variables, being able to maintain the volume and surface area of the joint and its components close to these groups. **Conclusion:** Copaiba oil proved to be promising in containing paw edema, but the dose and period of treatment should be re-evaluated for better results, yet this product also proved to be effective in preserving the morphology and morphometry of the synovial joint and its components, being a therapeutic alternative for arthritic joints, whose mechanisms of action must be investigated.

Keywords: Zymosan, stereology, morphology, joint, animal model, arthritis.

1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica de natureza auto-imune que afeta pequenas e grandes articulações, incluindo mãos e pés, ombros, joelhos e tornozelos (MOTA; LAURINDO; SANTOS NETO, 2010). A longo prazo torna-se uma doença incapacitante, por aumentar a sensibilidade a dor nas articulações devido ao processo inflamatório intenso e destruição óssea (COOPER, 2000; SMOLEN et al., 2018).

Diversos mecanismos estão envolvidos na iniciação e progressão da doença, das quais destaca-se a membrana sinovial que desempenha papel-chave, que após proliferar (hiperplasia) tornar-se fonte de citocinas e proteases capazes de perpetuar o processo inflamatório e a destruição óssea (AI et al., 2015; BARTOK; FIRESTEIN, 2010; BOTTINI; FIRESTEIN, 2013; SMOLEN et al., 2018). Além disso, também estão envolvidos na fisiopatologia da artrite, células imunes, tais como os linfócitos T, B, macrófagos, fibroblastos, além de citocinas pró-inflamatórias e a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*), que atuam como mediadores da lesão tecidual.

Modelos animais de artrite experimental têm sido amplamente utilizados para otimizar as pesquisas e compreender a patogênese da AR, assim como investigar novas opções terapêuticas e seus mecanismos de ação (ASQUITH et al., 2009; BENDELE, 2001; CASTAÑEDA-LOPEZ et al., 2018; MOUDGIL; KIM; BRAHN, 2011). Entre os diversos modelos disponíveis atualmente, destaca-se a artrite induzida por Zymosan (AZy), por apresentar um bom custo-benefício, ter suas ações inflamatórias comprovadas e por compartilhar várias características comuns com a AR clínica, tanto no aspecto macroscópico como microscópico (KEYSTONE et al., 1977).

As opções terapêuticas disponíveis para AR apesar de não resultarem em cura, são eficazes em tornar a doença com baixa atividade ou até mesmo promover a remissão da mesma, impedindo a progressão do dano às articulações (SMOLEN et al., 2014b, 2016). Entretanto, nem todos os indivíduos são responsivos ao tratamento farmacológico, ou ainda, apresentam inúmeros efeitos colaterais, motivo pelos quais cientistas estão em busca de novas terapias farmacológicas (LAURINDO et al., 2004; SMOLEN et al., 2018).

Dentre os possíveis alvos farmacológicos, destacam-se os fitoterápicos ou substâncias naturais, em especial o óleo de copaíba (CARVALHO, 2004), o qual é amplamente utilizado na medicina popular e já tem o seu potencial anti-inflamatória relatado em diversos estudos (AMILIA DESTRYANA et al., 2014; BASILE et al., 1988; GELMINI et al., 2013;

KOBAYASHI et al., 2011b; MARTINS-DA-SILVA; PEREIRA; LIMA, 2008; VEIGA et al., 2007).

O óleo de copaíba consiste em uma oleorresina extraída do tronco de leguminosas do gênero *Copaifera* (LLOYD, 1898), abundante na Amazônia brasileira e seu óleo é comercializado mundialmente (FRANCISCO, 2005), sendo utilizado para vários fins terapêuticos, especialmente como anti-inflamatório (ALVES et al., 2017; AMES-SIBIN et al., 2018; AMILIA DESTRYANA et al., 2014; TANIA PINHEIRO et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2017; VEIGA et al., 2007; VIJAYALAXMI et al., 2015), além de outras propriedades (AMILIA DESTRYANA et al., 2014; BASILE et al., 1988; DE LIMA SILVA et al., 2009; GELMINI et al., 2013; KOBAYASHI et al., 2011a; MARTINS-DA-SILVA; PEREIRA; LIMA, 2008; VEIGA et al., 2007). Sobre sua composição química, consiste em uma mistura de sesquiterpenos e diterpenos. O β -cariofileno (sesquiterpeno) é o composto principal no óleo da maioria das espécies de *Copaifera*, ao qual é atribuído a maior atividade anti-inflamatória (DESMARCHELIER, 2010; GOMES et al., 2007; LEANDRO et al., 2012; VEIGA et al., 2007). Propriedades antioxidantes também foram investigadas, especialmente as da espécie *C. langsdorffii* Desf. (DE LIMA SILVA et al., 2009), que mostrou atividade antioxidante *in vitro* e também em ratos com estresse oxidativo intestinal e cutâneo induzida por isquemia / reperfusão, em que o tratamento de ratos com este óleo foi capaz de melhorar vários parâmetros oxidativos, como a atividade da catalase e os níveis de lipoperoxídeos e glutatona (GELMINI et al., 2013).

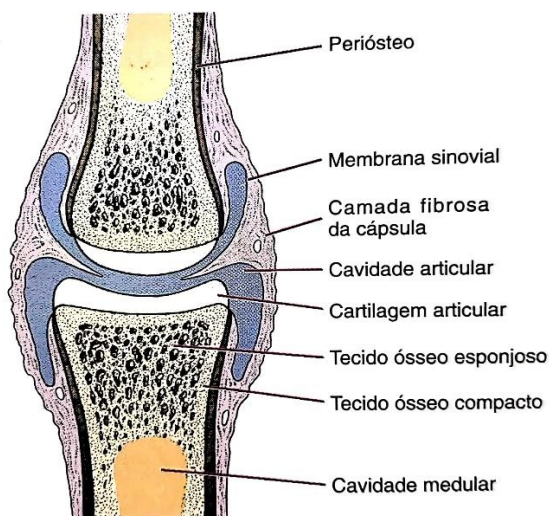
Com isso, considerando que a imunopatologia experimental AZy compartilha muitas características da AR humana e que as propriedades anti-inflamatórias do óleo de copaíba já foram extensivamente relatadas em estudos que demonstraram a sua eficácia *in vitro* e *in vivo*, pela sua capacidade de inibir a inflamação aguda em ratos e camundongos (AMILIA DESTRYANA et al., 2014; BASILE et al., 1988; KOBAYASHI et al., 2011a; VEIGA et al., 2007) e que, até o momento nenhum estudo avaliou se o óleo de copaíba é capaz de agir sobre os mecanismos que envolvem a dinâmica do processo anti-inflamatório na arquitetura das células imunes e sinoviócitos. O presente estudo foi planejado para investigar a ação do óleo de copaíba, extraído da *Copaifera* spp, administrado oralmente, sobre a morfologia estrutural e ultraestrutural de articulações sinoviais, a qual destacam-se a articulação interfalangeana proximal (IFP) e metatarsofalangeana (MTF) em camundongos Balbc/c na AZy, modelo agudo de inflamação.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Articulação sinovial (Diartroses)

As articulações sinoviais ou diartroses correspondem as articulações presentes, em grande parte, nas extremidades do corpo, dotados de grande mobilidade, consistindo em uma **cápsula articular** que liga as extremidades ósseas, a qual delimita uma cavidade fechada (**cavidade articular**). Essa cápsula é formada por duas camadas, uma externa, a **camada fibrosa**, e uma interna, a **camada** ou **membrana sinovial** (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017) (Fig. 1).

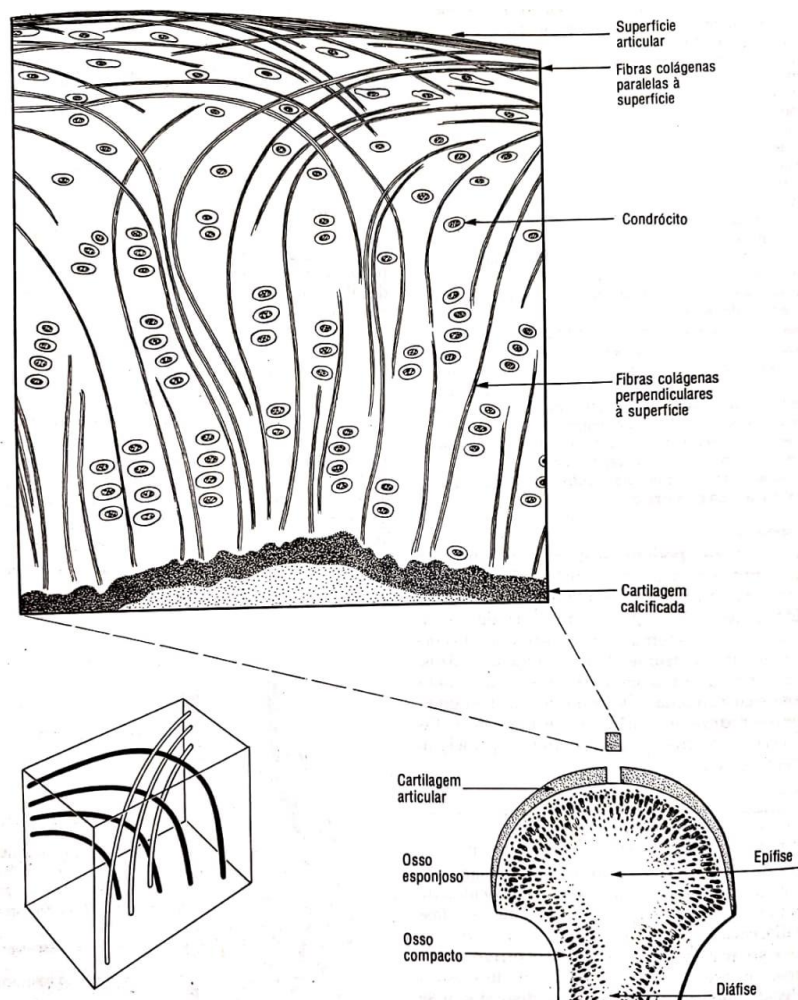
Figura 1 - Desenho esquemático de uma diartrose (articulação sinovial).



1. A capsula é formada por duas camadas, cujos limites são imprecisos: a camada fibrosa, externa, e a camada sinovial (membrana sinovial), situada internamente. Esta última reveste o espaço sinovial (ou cavidade articular), exceto as áreas cartilaginosas. **Fonte:** Junqueira; Carneiro, 2017.

A cavidade articular contém um líquido viscoso, incolor e transparente, o **líquido sinovial**, que ocupa o espaço sinovial e é formado na membrana sinovial, cuja principal função é possibilitar o deslizamento das superfícies articulares, as quais são revestidas por cartilagem hialina, sem pericôndrio (TARAFDER; LEE, 2016) (Fig. 2).

Figura 2 – Cartilagem hialina, sem pericôndrio.



1. As superfícies articulares das articulações sinoviais são recobertas por cartilagem hialina, sem pericôndrio. **a)** fibras colágenas seguem um trajeto que primeiro é perpendicular e depois é paralelo à superfície articular. Os condrócitos mais profundamente situados são globosos e se dispõem em filas alongadas e irregulares. Os mais superficiais são mais achatados e não formam grupos. **b)** Diagrama representando três dimensões do trajeto das fibras colágenas nesta cartilagem.

2. **Fonte:** Junqueira; Carneiro, 2017.

A camada externa da cápsula articular (camada fibrosa) é constituída por um tecido conjuntivo denso, contínuo ao periósteo do osso, já a camada interna (membrana sinovial), é formada por células que cobrem todas as superfícies articulares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

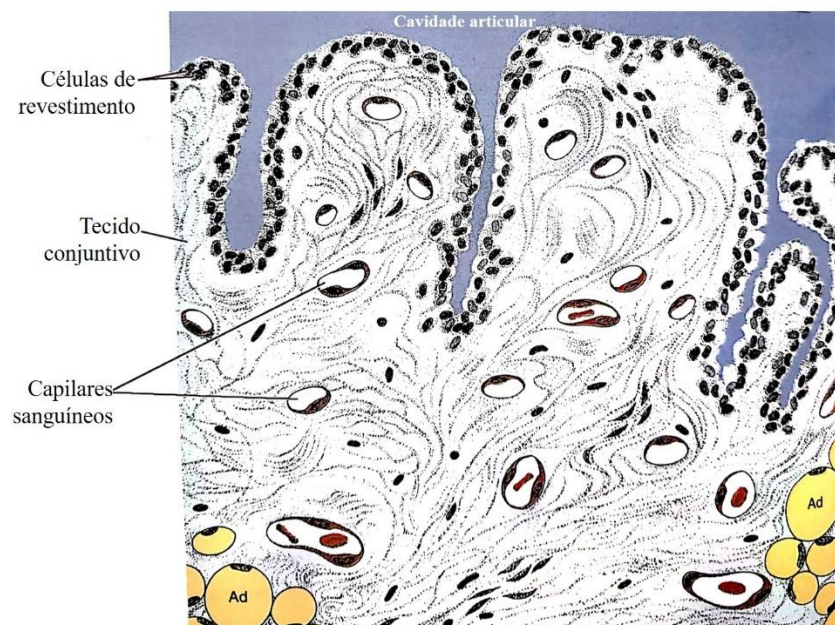
2.1.1 Membrana sinovial

A membrana sinovial (também designada de *sinovium* ou sinóvia) é uma estrutura bastante delicada, anatomicamente dividida em camada superficial (íntima sinovial), em contato com o espaço sinovial e a camada subjacente (subíntima) (JUNQUEIRA;

CARNEIRO, 2017; SMITH; WECHALEKAR, 2015). A íntima sinovial desempenha importantes papéis na homeostase das articulações, produzindo fluido lubrificante (líquido sinovial) que possibilita que as superfícies da cartilagem funcionem em um ambiente de baixa fricção e, fornecendo nutrientes para a cartilagem, já que esta não possui seu próprio suprimento de sangue (avascular) (SMOLEN et al., 2018).

A estrutura histológica da membrana sinovial corresponde a duas ou três camadas de células sinoviais de natureza conjuntiva (que pode ser frouxo, denso ou adiposo, conforme a região) cuja disposição lembra um epitélio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; SMITH, 2011). A membrana basal entre o revestimento e o tecido conjuntivo subjacente está ausente, resultando numa membrana sinovial vazada, o que possibilita um trânsito de células e proteínas relativamente livre no líquido sinovial (BOTTINI; FIRESTEIN, 2013; CASTOR, 1960). Essa camada é pregueada e suas dobras penetram, às vezes por considerável distância, no interior do espaço sinovial (Fig. 3).

Figura 3 – Figura esquemática da estrutura histológica da membrana sinovial



1. O revestimento é constituído por células de natureza conjuntiva, cuja disposição lembra um epitélio. Não existe lâmina basal entre o revestimento e o tecido conjuntivo subjacente. Esse tecido é ricamente vascularizado em contém células adiposas (Ad) que, em certas regiões, predominam sobre os outros tipos celulares (membrana sinovial adiposa)

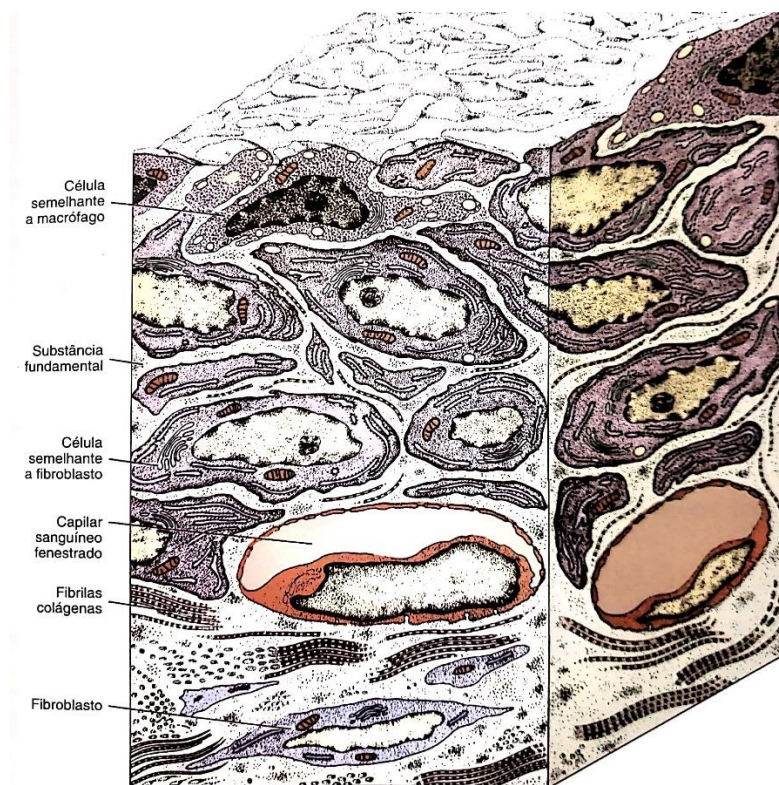
2. **Fonte:** Junqueira; Carneiro, 2017

A membrana sinovial é ricamente vascularizada, composta por células adiposas (Ad) que, em certas regiões, predominam sobre os outros tipos celulares (membrana sinovial adiposa). As células da camada sinovial são de origem mesenquimatosas e entre elas existe

pequena quantidade de substância fundamental amorfa do tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017) .

Diferentes tipos celulares compõem a membrana sinovial: **sinoviócitos semelhantes a fibroblastos** (SSF; ou, sinoviócitos do tipo B), que ocupam a camada mais superficial da membrana sinovial, denominada íntima sinovial e os **sinoviócitos semelhantes a macrófagos** (SSM; ou sinoviócitos do tipo A), que por sua vez localizam-se na camada subjacente (subíntima sinovial), que também é composta por fibroblastos, adipócitos, vasos sanguíneos e células imunes dispersas (BOTTINI; FIRESTEIN, 2013; CASTOR, 1960; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; SMOLEN et al., 2018) (Fig. 4).

Figura 4 – Representação tridimensional da ultraestrutura da membrana sinovial.



1. Os sinoviócitos semelhantes a macrófagos (SSM ou tipo A) e a fibroblastos (SSF ou tipo B) são separados por pequenas quantidades de substância fundamental do tecido conjuntivo, que desse modo, fica em contato com o líquido sinovial. Não existe lâmina basal entre o revestimento e o tecido conjuntivo. Os capilares sanguíneos do conjuntivo são fenestrados (célula endotelial com poro), o que facilita as trocas entre o sangue o líquido sinovial.

2. **Fonte:** Junqueira; Carneiro, 2017

Os sinoviócitos tipo A desenvolvem microvilos na sua superfície celular e podem fagocitar ativamente resíduos celulares que podem estar presentes no espaço sinovial (GRAABAEK, 1982, 1985). Já o tipo B, consiste em células próprias que variam em forma, sendo comumente caracterizadas por processos citoplasmáticos ramificados, que se estendem

em direção ao espaço sinovial, capazes de secretar colágeno, fibronectina, ácido hialurônico e outros proteoglicanos no interstício e no espaço sinovial (IWANAGA et al., 2000) (IWANAGA et al., 2000). Observações ultraestruturais (MET, *microscopia eletrônica de transmissão*) mostraram que os sinoviócitos tipo B são semelhantes às células dendríticas, mas com retículo endoplasmático rugoso (REr) em seu citoplasma, o que os distingue dos fibroblastos que ocupam a subíntima (EDWARDS, 1995). Além disso, essas células frequentemente exibem uma natureza e arranjo semelhantes ao epitélio, desenvolvendo dispositivos de junção entre as células sinoviais. Contudo, elas diferem das células epiteliais autênticas por apresentar uma lâmina basal fragmentada (IWANAGA et al., 2000; SMITH; WECHALEKAR, 2015).

2.1.1.1 Sinoviócitos tipo B

Os **sinoviócitos do tipo B**, também designados como sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (SSF) ou fibroblastos sinoviais são células que revestem a membrana sinovial das articulações sinoviais (Fig. 5). Essas células estão envolvidas na produção de fluido sinovial e alguns componentes da matriz extracelular (MEC), assegurando a integridade estrutural e possibilitando a dinâmica das articulações (BOTTINI; FIRESTEIN, 2013). Essas células estão distribuídas em uma a duas camadas de células da íntima da sinovial saudável e estão interligadas aos sinoviócitos do tipo B, sendo separados apenas por pequenas quantidades de substância fundamental do tecido conjuntivo, ficando em contato com o líquido sinovial (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Ultraestruturalmente, o sinoviócito tipo B difere do tipo A em relação a quase todas as organelas celulares. Sendo que o tipo A apresenta características de uma célula macrofágica absorptiva, marcado principalmente por um aparato vacuolar bem desenvolvido, um aparelho de Golgi moderado, mitocôndrias pálidas maiores, retículo endoplasmático contendo poucos ribossomos, apresentando cisternas estreitas e um núcleo rico em heterocromatina (BOTTINI; FIRESTEIN, 2013; CASTOR, 1960). Já os tipos B, demonstram características de uma célula secretora, o que é atribuído aos grânulos citoplasmáticos existentes. Além disso, essas células apresentam retículo endoplasmático rugoso extensivamente desenvolvido, com cisternas largas, um grande aparelho de Golgi, cavéolas superficiais, mitocôndrias densas menores, um núcleo rico em eucromatina, vesículas e vacúolos invariavelmente localizados nos grandes processos celulares e muitas dessas células mostraram um cílio solitário (GRAABAEK, 1984). Morfologicamente, os tipo B apresentam um corpo celular e uma a duas projeções

celulares grandes que atingem o espaço sinovial (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Ainda, os sinoviócitos tipo B expressam proteínas da MEC, como a vimentina, colágeno tipo IV e V, moléculas de adesão (integrinas da classe α e β), receptores de integrinas (molécula de adesão intracelular 1) e marcadores de superfície (glicoproteína de membrana Thy-1). Além disso, também expressam a enzima UDP-glicose-desidrogenase, necessária para a síntese de ácido hialurônico, e fator de aceleração de decaimento do complemento (CD55) (BOTTINI; FIRESTEIN, 2013).

2.2 Artrite reumatoide (AR)

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica de natureza auto-imune que afeta principalmente as articulações (SMOLEN et al., 2018), ocasionando processo inflamatório intenso das membranas sinoviais (sinovite) e estruturas articulares que podem levar à destruição óssea, resultando em comprometimento das funções, por promover dor e deformidades principalmente nas articulações periféricas, como as das mãos e dos pés, o que faz com que a AR se torne economicamente relevante, uma vez que estas incapacidades interferem significativamente nas atividades profissionais dos pacientes (COOPER, 2000; SMOLEN et al., 2018).

As taxas de prevalência relatadas para essa doença é de 0,5-1% em indivíduos brancos (TOBÓN; YOUINOU; SARAUX, 2010), mas varia entre 0,6-0,9% (em indivíduos negros da República Democrática do Congo) e 5-6% (em nativos americanos) (MALEMBA et al., 2012). As mulheres são predominantemente afetadas (três a quatro vezes a mais que os homens), sendo 50 anos de idade o pico da incidência (CROWSON et al., 2011; NGO; STEYN; MCCOMBE, 2014). Em 2004, um estudo estimou em 0,46% a taxa de prevalência de AR para a população brasileira (SENNA et al., 2004).

2.1 Patogênese na Artrite reumatoide

Vários mecanismos estão envolvidos na iniciação e progressão da AR (SMOLEN et al., 2018). Iniciando em um estágio de alto risco ou suscetibilidade que baseia-se em fatores de riscos genéticos (por exemplo, HLA-DRB1 e modificações epigenéticas) e não genéticos (tabagismo, microbiota, sexo feminino, dieta ocidental, obesidade e fatores étnicos), os quais contribuem para que a doença atinja um limiar acima do qual a AR é desencadeada (CHEN et al., 2016; GREGERSEN; SILVER; WINCHESTER, 1987; LJUNG; RANTAPÄÄ-

DAHLQVIST, 2016; MACGREGOR et al., 2000; NGO; STEYN; MCCOMBE, 2014; STAHL et al., 2012; STOLT et al., 2005; TRYNKA et al., 2013; VESPERINI et al., 2013).

Em seguida, a doença prossegue para um estágio pré-clínico (AR pré-clínica), que envolve a iniciação e propagação de autoimunidade contra à imunoglobulina G (IgG) e proteínas citrulinadas, sendo mediada por autoanticorpos, como o fator reumatoide (FR) e anticorpos anti-proteínas citrulinadas (ACPAs), respectivamente, os quais podem ser detectados anos antes do início da sinovite subclínica e sintomas clínicos (ALETAHA; ALASTI; SMOLEN, 2015; HOLERS, 2013; MALMSTRÖM; CATRINA; KLARESKOG, 2017).

A presença de autoanticorpos, juntamente com a formação de complexos imunes, ativação do complemento e insulto microvascular desencadeiam a AR inicial, caracterizada por inflamação sinovial (sinovite clínica), na qual ocorre o aumento da permeabilidade vascular e influxo de células inflamatórias na sinóvia, principalmente células mononucleares, como linfócitos T CD4⁺ e macrófagos, além da infiltração de células estromais ativas, que são fontes proeminentes de citocinas pró-inflamatórias e enzimas degradantes da matriz e colágeno, que a longo prazo, contribuem para a destruição articular (AREND; FIRESTEIN, 2012; STEINER, 2007).

Em seguida, a doença avança para a AR estabelecida, que é marcada pela propagação da autoimunidade e formação de tecido sinovial hiperplásico capaz de invadir e destruir a superfície articular, na qual o aumento do número de macrófagos e fibroblastos contribuem para a perpetuação da resposta sinovial inflamatória destrutiva (AI et al., 2015; SMOLEN et al., 2018).

2.3.1.1 Patogênese da AR mediada pela membrana sinovial

A membrana sinovial desempenha papel-chave para o desenvolvimento e progressão da AR, na qual ocorre a expansão do número de ambos os sinoviócitos (hiperplasia), os quais tornam-se fonte proeminente de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, proteases e fatores pró-angiogênicos, além da capacidade reduzida de sofrerem apoptose (BARTOK; FIRESTEIN, 2010; BOTTINI; FIRESTEIN, 2013; MCINNES; SCHETT, 2011).

Na sinóvia reumatoide, os sinoviócitos A secretam uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral (TNF), entre outros. Já os tipos B, apesar de também serem fonte de citocinas, como a IL-6, apresentam como principal característica pró-inflamatória a produção de quantidades excessivas de enzimas degradantes

da matriz no revestimento intimal da sinóvia, tais como as metaloproteinases da matriz (MMPs) (BARTOK; FIRESTEIN, 2010). Em adição, os tipo B também produzem mediadores de pequenas moléculas, como prostaglandinas e leucotrienos, além de expressarem padrões específicos de microRNAs, os quais contribuem para o seu fenótipo ativado (PHILIPPE et al., 2013; STANCZYK et al., 2008).

Uma outra característica proeminente da sinóvia reumatoide é o seu potencial invasivo e destrutivo, denominado *pannus* reumatoide hiperplásico, que pode potencialmente migrar para articulações adjacentes, causando danos à cartilagem e tecido ósseo, a qual é definida como um sinal cardinal da AR (BOTTINI; FIRESTEIN, 2013; KEYSZER et al., 1998; LEFÈVRE et al., 2009).

Os mecanismos envolvidos no dano à cartilagem e ao tecido ósseo são diversos, entretanto os sinoviócitos tipo B são considerados o tipo celular destrutivo dominante, por produzir proteases, como as MMPs colagenases e estromelinas (KEYSZER et al., 1998; KIENER et al., 2009). Assim, os sinoviócitos tipo B na AR desempenham um fenótipo agressivo, capaz de destruir a matriz local, além de apresentarem uma sinalização de citocinas, adesão e migração celular mais proeminente, quando comparados aos tipo B de indivíduos sem AR (AI et al., 2015). Em adição, outras células também contribuem para o dano articular através da liberação de citocinas e MMPs, como os macrófagos, os neutrófilos (particularmente no espaço do líquido sinovial) e os mastócitos (KIENER et al., 2009).

Outro mecanismo que contribui para uma sinóvia inflamatória é a infiltração difusa de células imunes adaptativas na subíntima sinovial, composta principalmente por linfócitos T CD4⁺ de memória, e linfócitos B maduros que podem formar centros germinativos ectópicos, onde proliferam e produzem auto-anticorpos (HUMBY et al., 2009; MCINNES; SCHETT, 2011; SMOLEN et al., 2018; ZIFF, 1974). Além disso, linfócitos T juntamente com macrófagos e sinoviócitos tipo B no revestimento sinovial contribuem com a diferenciação e ativação de osteoclastos (células de reabsorção óssea), por secretarem fatores de adesão, como por exemplo RANK (ligando ativador do receptor do fator nuclear- κ B) ou citocinas (TNF, IL-6 e IL-1) que ativam tais células, resultando na erosão óssea, pois os osteoclastos produzem proteases, como a catepsina K, que é capaz de degradar a matriz óssea mineralizada (REDLICH; SMOLEN, 2012; SCHETT, 2007).

Em conjunto, ambos os sinoviócitos de fenótipos agressivos juntamente com a infiltração de células presentes no subíntima sinovial desempenham diferentes mecanismos inflamatórios que contribuem para uma sinóvia inflamatória e destrutiva (SMOLEN et al., 2018).

2.3 Modelos experimentais de artrite

Os modelos animais de artrite experimental têm sido amplamente utilizados em estudos para compreensão da patogênese da AR, bem como contribuíram para avanços importantes no tratamento para essa doença (ASQUITH et al., 2009; BENDELE, 2001; CASTAÑEDA-LOPEZ et al., 2018; MOUDGIL; KIM; BRAHN, 2011). Nesse contexto, existem uma variedade de modelos experimentais, que no geral, apresentam similaridade histológica com a sinovite da AR humana, mecanismos imunológicos na fisiopatologia, além de resposta terapêutica similar à observada na AR (SILVA JR; ROCHA, 2006). Entretanto, atualmente, nenhum dos modelos atingem todos os requisitos para ser considerado ideal para o estudo da AR, porém alguns tem sido padronizados e representam uma ferramenta importante na compreensão dos mecanismo de lesão, progressão e opções terapêuticas (OLIVER; BRAHN, 1996; SILVA JÚNIOR; ROCHA, 2006).

Entre os modelos experimentais que induzem a AR, destaca-se a AZy em ratos e camundongos, que caracteriza-se como um modelo de baixo custo de aquisição e manutenção, fácil manuseio, elevada resistência à infecção e ao trauma cirúrgico e com excelente sistema de homeostasia, além da semelhança com a espécie humana (GEGOUT et al., 1995; KEYSTONE et al., 1977; ROCHA et al., 1999; SILVA JÚNIOR; ROCHA, 2006; VOLMAN; HENDRIKS; GORIS, 2005).

2.3.1 Artrite induzida por Zymosan (AZy)

O Zy é um polissacarídeo presente na parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, constituído por unidades repetidas de glicose conectadas por ligações β -1,3-glicosídicas (ASQUITH et al., 2009; DI CARLO; FIORE, 1958), sendo amplamente empregado em estudos farmacológicos, por ser capaz de ativar macrófagos e induzir mediadores inflamatórios. Nesse contexto, destaca-se o uso frequente na indução de processo inflamatório quando injetado na articulação de ratos, camundongos e coelhos, resultando em proliferação subaguda e persistente da membrana sinovial e da cartilagem das articulações, o que corresponde aos principais achados da AR (KEYSTONE et al. 1977; GADÓ; GLICGER, 1991; GEGOUT et al., 1995; ROCHA et al., 1999).

A dinâmica da AZy inicia-se ao inocular por via intra-articular (i.a.) ou subcutânea (s.c.) uma suspensão dessa substância, o que promove uma sinovite erosiva grave (SILVA JÚNIOR; ROCHA, 2006). Esse modelo de artrite experimental é categorizado como um

modelo bifásico, por desenvolver uma resposta de fase inicial (< 7 dias) e outra tardia (> 25 dias) definidos como fase aguda e crônica, respectivamente (FRASNELLI et al., 2005; SILVA JÚNIOR; ROCHA, 2006).

Na fase aguda, o pico da doença ocorre por volta do 3º dia após a inoculação, em que são observados o aumento da permeabilidade vascular e migração celular. Por volta do 7º dia ocorre uma redução do processo inflamatório, mas com recidiva a partir de 14 dias, na qual é observada a formação de células gigantes (FRASNELLI et al., 2005; ROCHA et al., 1999; SILVA JÚNIOR; ROCHA, 2006). Na fase crônica, até 28 dias após a injeção do Zy, é observada a extensão e progressão da sinovite (sinovite crônica), com intensa proliferação linfomonocitária na sinóvia, lembrando o *pannus* reumatoide, que leva à lise da cartilagem articular e do osso subcondral (ROCHA et al., 1999; SILVA JÚNIOR; ROCHA, 2006).

Em suma, a fase aguda da AZy é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, edema e influxo de células inflamatórias para o espaço sinovial. Já na fase crônica, ocorre a degradação da cartilagem articular e do osso subcondral. Essa artrite também produz hipernocicepção, reação inflamatória intensa, caracterizada por extensa sinovite, com migração de células inflamatórias de fase aguda e cronificação com a proliferação linfomonocitária (GEGOUT et al., 1994; ROCHA et al., 1999).

Os mecanismos envolvidos na atividade pró-inflamatória associada à injeção do Zy deve-se, inicialmente, à ativação do complemento e liberação de enzimas lisossomais a partir de células inflamatórias do infiltrado celular (SILVA JÚNIOR; ROCHA, 2006). Além disso, a participação da imunidade adquirida também desenvolve papel importante na fisiopatologia da AZy, em que observa-se a capacidade dos receptores de selectina-1 presentes nos macrófagos monócitos, neutrófilos, células dendríticas e células T do baço reconhecerem o Zy (WILLMENT, 2003). Além do reconhecimento do Zy por receptores de selectina-1, o Zy também interage com o receptor tipo *toll-like 2* (TLR2, *Toll-like receptors*), presente na superfície celular de macrófagos, o que resulta na ativação do fator NF-kB, que por sua vez estimula a produção de citocinas inflamatórias e a expressão de substâncias co-inflamatórias, mobilização do araquidonato, fosforilação de proteínas e ativação do complemento via alternativa (FRASNELLI et al., 2005; TAYLOR et al., 2002).

Como todo modelo animal, a AZy apresenta limitações, sendo um modelo de natureza monoartrítica, ou seja, desenvolve processo inflamatório apenas no sítio de inoculação, impossibilitando analisar efeitos sistêmicos da doença. Além disso, para a indução é necessário possuir habilidade técnica para uma injeção i.a. ou s.c. em camundongos (ASQUITH et al., 2009).

2.4 Opções terapêuticas para a artrite reumatoide

Atualmente ainda não existe tratamento que resolva a doença, estando disponível apenas o uso de paliativos, os quais promovem a remissão ou, pelo menos, a baixa atividade da doença, impedindo a progressão do dano das articulações, otimizando o funcionamento físico, o trabalho e a participação social farmacológica (SMOLEN et al., 2017, 2018). Além disso, apesar dos grandes avanços, nem todos os pacientes respondem à terapia farmacológica (ALETAHA; ALASTI; SMOLEN, 2015; CASTAÑEDA-LOPEZ et al., 2018; SMOLEN et al., 2017, 2018).

A estratégia de tratamento atual para AR envolve a utilização de fármacos capazes de interferir com o processo inflamatório, como os glicocorticoides e Drogas Antirreumáticas Modificadoras de Doença (DMARDs, *disease-modifying antirheumatic drug*), entre os quais os DMARDs sintéticos (isto é, pequenos medicamentos químicos) e DMARDs biológicos (isto é, anticorpos monoclonais ou, menos frequentemente, construções de receptores) (GRIGOR et al., 2004; SMOLEN et al., 2017, 2018).

Outra opção terapêutica consiste no uso de agentes sintomáticos, como os medicamentos para dor, como os Anti-inflamatórios não Esteroidais (AINEs), que apesar de não interferirem nos mecanismos que levam ao dano das articulações, atuam melhorando os sinais e sintomas, aliviando dor e inchaço, os quais agem inibindo a síntese de prostaglandinas, substância que exerce uma variedade de efeitos sobre os vasos sanguíneos, terminações nervosas e células envolvidas na inflamação (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016).

Os efeitos adversos associados aos DMARDs, aos glicocorticoides e aos AINEs impendem o seu uso a longo prazo, sendo administrados por um período limitado até que estes tenham exercido seu potencial farmacológico completo (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016). Entre os diversos efeitos colaterais, destacam-se aqueles associados aos AINEs convencionais como o ibuprofeno, o naproxeno e o diclofenaco, os quais são frequentemente associados a alterações gastrintestinais, tendo em vista sua atuação na via das ciclooxigenase 1 (COX 1), enzimas que são constitutivamente expressas no sistema gastrointestinal, que atuam na rota metabólica convertendo o ácido hialurônico em prostaglandinas, portanto, capazes de afetar a coagulação quando administrados em quantidades maiores durante um período mais longo (NISSEN et al., 2016; SCHEIMAN,

2016). Além disso, todos os AINEs influenciam na circulação sanguínea renal e podem acarretar em problemas cardiovasculares (NISSEN et al., 2016).

Entre os efeitos adversos relacionados aos glicocorticoides, principalmente ao uso prolongado, destacam-se a atrofia da pele, osteoporose, tolerância à glicose diminuída, hipertensão arterial, catarata e maior risco de infecção (STREHL et al., 2016). Já as DMARDs, como o metratexato (MTX), apresentam como principais implicações alterações dermatológicas (estomatite e alopecia), gastrointestinais (náuseas e vômitos), hematológico (leucopenia, anemia macrocítica e trombocitopenia), entre outros (BRAUN; RAU, 2009).

Tantos efeitos adversos relacionados as opções terapêuticas para AR levaram a crescente busca por alternativas que ofereçam eficácia e menos riscos à saúde, dentre as quais destacam-se compostos bioativos extraídos de plantas medicinais e fitoterápicos (LORENZI; MATOS, 2002; MEGRAJ et al., 2011).

2.4.1 Tratamento alternativo para AR

Desde 2006, o governo federal aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, possibilitando que a população brasileira tenha acesso ao uso racional e seguro de plantas medicinais e fitoterápicos, com base científica e não apenas no credo popular (BRASIL, 2006; RODRIGUES; SANTOS; AMARAL, 2006; SATO et al., 1990). O SUS oferta à população, 12 medicamentos fitoterápicos, que constam na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) e são indicados, por exemplo, para uso ginecológico, tratamento de queimaduras, auxiliares terapêuticos de gastrite e úlcera, além de medicamentos com indicação para artrite e osteoartrite (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2018).

Entre os fitoterápicos para o tratamento de artrite disponibilizados pelo SUS consta a unha-de-gato (*Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roem. & Schult.), apresentado em cápsula, comprimido ou gel, indicado como um tratamento coadjuvante nos casos de artrites e osteoartrites. Além deste, outros tratamentos com efeitos anti-inflamatórios disponíveis são aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), garra-do-diabo (*Harpagophytum procumbens*) e salgueiro (*Salix alba* L.) (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2015, 2018).

Além dessas, várias outras plantas com potencial medicinal para o tratamento de doenças inflamatórias têm emergido, tal como o óleo de copaíba, amplamente utilizado na medicina popular por apresentar não apenas ação anti-inflamatória, mas também analgésicas, bactericidas e cicatrizantes (AMILIA DESTRYANA et al., 2014; BASILE et al., 1988;

GELMINI et al., 2013; KOBAYASHI et al., 2011b; MARTINS-DA-SILVA; PEREIRA; LIMA, 2008; VEIGA et al., 2007).

2.4.1.1 Óleo de Copaíba

O gênero *Copaifera*, da família *Leguminosae*, sub-família *Caesalpinoideae*, abrange mais de 72 espécies descritas, distribuídas na América Latina e África Ocidental. O Brasil alberga 16 espécies, as quais são encontradas na região Amazônica, Sudeste e Centro-Oeste. Entre as espécies mais abundantes no norte do Amazonas estão a *Copaifera officinalis* L., a *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne, sendo suas espécies conhecidas como copaibeira ou pau-de-óleo (FEDERAL, 2009; MARTINS-DA-SILVA; PEREIRA; LIMA, 2008).

A incisão no tronco das árvores fornece um óleo-resina (óleo de copaíba), de coloração amarela a marrom, amplamente utilizado na indústria como vernizes e lacas, na restauração de pinturas antigas e como fixador de odor em fragrâncias e como aromatizante em alimentos (FEDERAL, 2009; MARTINS-DA-SILVA; PEREIRA; LIMA, 2008; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Na medicina popular, especialmente na Amazônia brasileira, tem sido tradicionalmente utilizado como agente curativo e anti-inflamatório (AMES-SIBIN et al., 2018; FRANCISCO, 2005), além de anti-séptico (RAMOS, 2006; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005), antitumoral (LIMA et al., 2003), para o tratamento de bronquites e doenças de pele (LEWIS, 1977), anti-nociceptivo (KOBAYASHI et al., 2011b; PAIVA et al., 2004; VEIGA et al., 2007), antimicrobiano (SANTOS et al., 2008), na cicatrização de feridas e atividades anti-úlceras (PAIVA et al., 2004).

Apesar do composto bruto ser amplamente utilizado, uma corrida para o isolamento do princípio ativo tem dominado as pesquisas, sendo o β -cariofileno o componente promissor, que destacar-se por sua atividade anti-inflamatória (AMES-SIBIN et al., 2018; FERNANDES et al., 2007; LUCCA et al., 2015; TAPPIN et al., 2004), além de possuir efeito neuroprotetor, antidepressivo (LIU et al., 2015), antialérgico (JIN et al., 2011), antioxidante (CALLEJA et al., 2013) e antitumoral (DAHAM et al., 2015).

Os efeitos anti-inflamatórios do β -cariofileno já foram observados em alguns modelos experimentais, como um modelo de artrite induzida por carreginina, no qual a copaíba inibiu o edema de pata e a produção de citocinas pró-inflamatórias (FERNANDES et al., 2007). E

em outro estudo sobre colite induzida por sulfato de dextrana, no qual atenuou a inflamação intestinal em camundongos (BENTO et al., 2011).

Com isso, apesar de já haver amplos estudos, poucos têm investigado os efeitos do óleo de copaíba especificamente sobre a AR (AMES-SIBIN et al., 2018; CASTRO GHIZONI et al., 2017), principalmente, sobre a compreensão dos mecanismos que envolvem a dinâmica do processo anti-inflamatório na arquitetura das células imunes e sinoviócitos no decorrer da doença e do tratamento.

2.5 Ferramentas da Estereologia

A maioria das estruturas de interesse no campo das ciências biológicas, como tecidos e órgãos, são tridimensionais (3D), entretanto para serem observadas geralmente são obtidas seções desses materiais para a geração de imagens bidimensionais (2D), o que resulta na perda de informações, pois estruturas sólidas tornam-se perfis, volumes aparecem como áreas, superfícies tornam-se linhas, traços lineares tornam-se pontos e objetos tornam-se um número imprevisível de perfis seccionais. Entretanto, por meio de amostragem e medição das características estruturais presentes nas seções é possível obter informações em 3D sobre quantidade desses parâmetros estruturais (WEST, 2012).

Dessa forma, a estereologia é um método que permite estimar a quantidade de estruturas geométricas 3D a partir de observações feitas em seções 2D, possibilitando inferir medidas de características estruturais como volume, superfície, comprimento e número de objetos, as quais podem ser usadas para fazer afirmações quantitativas sobre função, que são úteis em estudos comparativos e experimentais de tecidos e órgãos (DEHOFF, 2011; GUNDERSEN et al., 1988; ORIVE, 1980; WEIBEL, 1980; WEST, 2012).

Para a aplicação de métodos estereológicos, inicialmente é necessário realizar o seccionamento do material de interesse de forma a obter amostras (seções) representativas de toda a estrutura. Para tal, emprega-se um tipo de amostragem conhecida como SURS (*systematic uniform random sampling*) que faz com que a primeira seção obtida seja escolhida por acaso e esse efeito é passado para as demais seções, impedindo assim a interferência do pesquisador na escolha das seções do estudo. Em seguida, as contagens são obtidas pela imposição de sondas (ou grids) estereológicos sobre as seções, permitindo que eventos em imagens ou seções sejam classificadas e contadas por meio dos sistemas teste (WEST, 2012). Muitas quantidades podem ser estimadas pela contagem de surpreendentemente poucos eventos (100-200 por espécime).

A interação entre grids e características estruturais do material de interesse resulta em eventos que podem ser aplicados a equações matemáticas, as quais geram informações sobre a estrutura de interesse (DEHOFF, 2011; JENSEN; GUNDERSEN, 1989), como o volume total (CAVALIERI, 1635), densidade de volume (DELESSE, 1847), área superficial (DE BUFFON, 1777), comprimento total (ROSIWAL, 1898) e pontos na região de interesse (THOMSON, 1930), entre outros. Como é possível perceber, a base matemática para a estereologia, fundada há quase 60 anos atrás, é muito antiga e remonta há aproximadamente 400 anos atrás. Hoje, a estereologia é o padrão ouro para a quantificação morfológica porque garante precisão e acurácia nas análises.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do óleo de copaíba (*Copaifera* spp.) sobre a morfologia da articulação interfalangeana proximal em camundongos BALB/c na inflamação aguda induzida por Zy.

3.2 Objetivos específicos

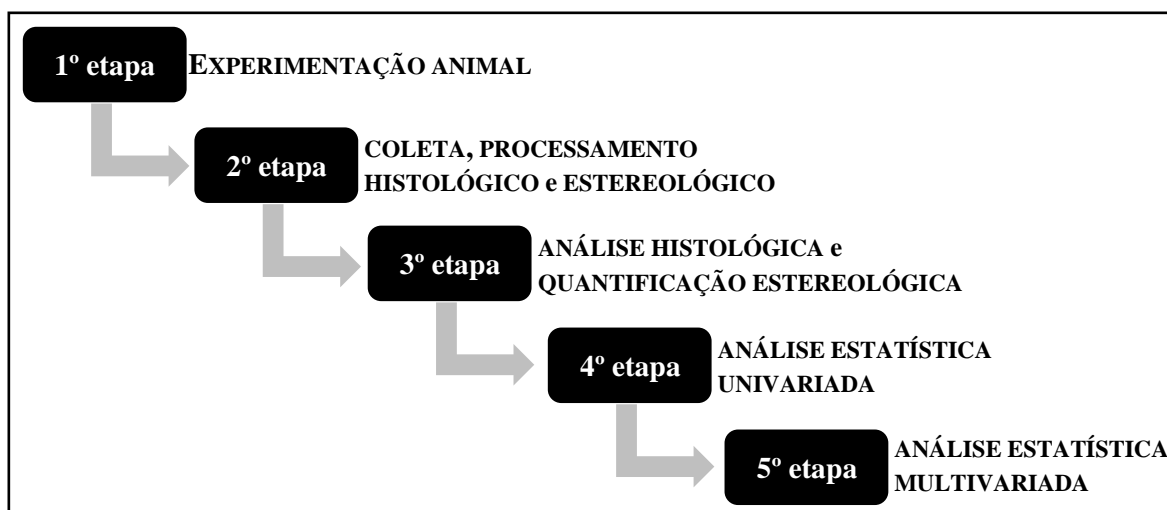
- i. Determinar o volume da pata traseira de camundongos frente aos diferentes tratamentos.
- ii. Descrever a histomorfologia das articulações induzidas à inflamação por Zy.
- iii. Determinar o volume absoluto da articulação interfalangeana proximal (IFP).
- iv. Estimar o volume absoluto dos componentes da articulação interfalangeana proximal (IFP) (cápsula, sinóvia, espaço sinovial, cartilagem e osso) frente aos diferentes tratamentos.
- v. Estimar a área superficial da cartilagem da articulação interfalangeana proximal (IFP) frente aos diferentes tratamentos.
- vi. Integrar os resultados estereológicos em análise multivariada para estabelecer o papel do óleo de copaíba na artrite experimental induzida na articulação interfalangeana proximal (IFP).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo e etapas do estudo

Trata-se de um estudo de experimentação animal, cuja intervenção experimental fora a AZy e a intervenção farmacológica experimental o uso oral de Óleo de Copaíba. Para comparação foram designados dois grupos, um que não recebeu nenhum tipo de intervenção experimental (Controle) e outro, com tratamento convencional (Diclofenaco a 100 mg/kg). Após a experimentação animal, as amostras obtidas (peso corpóreo, volume da pata e articulações) foram processadas e analisadas de acordo com as respectivas técnicas metodológicas, que incluíram análise macroscópica, microscópica histologia e estereologia, respectivamente (Fig. 5).

Figura 5 – Etapas do estudo



Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos no Biotério do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (Biotério/INPA), Laboratório de Morfologia Quantitativa do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas (LAMIQ/UFAM) e Laboratório Temático de Microscopia Eletrônica do INPA (LTME/INPA). Estiveram envolvidos, ainda, o Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM (LABCF/UFAM).

4.2 Substâncias utilizadas

As substâncias utilizadas nesse estudo compreenderam solução salina, veículo, diclofenaco, óleo de copaíba e Zy, cuja finalidade do uso e modo de preparo são descritas a seguir.

4.2.1 Solução salina fisiológica

O soro fisiológico é uma solução salina, isotônica em relação aos líquidos corporais, estéril e com aplicação em medicina. Contém 0,9% de NaCl (cloreto de sódio) em massa, dissolvidos em água destilada, ou seja, em 100mL de solução aquosa encontram-se presentes 0,9g do sal. Desta forma, a cada 100mL de soro fisiológico, 0,354g de Na⁺ (sódio) e 0,546g de Cl⁻ (cloro) estarão contidos, em um pH igual a 6,0.

No presente estudo, foram utilizadas ampolas de solução fisiológica a 0,9% do fabricante Farmace, contendo 10mL cada, cuja finalidade de uso foi o preparo de substâncias para administração oral (veículo) e por via s.c. (salina ou suspensão de Zy), conforme descrito em outros estudos (PAIVA et al., 2011a; ROCHA et al., 2003; WIJEKOON et al., 2019).

4.2.2 Veículo para administração oral de substâncias

A seleção do veículo é uma consideração importante em todas as investigações com animais. Os próprios veículos devem oferecer exposição ideal, mas não devem influenciar os resultados obtidos para o composto sob investigação e, como tal, devem ser biologicamente inertes, não têm efeito sobre as propriedades biofísicas do composto e não têm efeitos tóxicos (DIEHL et al., 2001) . Entre os diversos veículos utilizados, o uso do polissorbato-80 (Tween 80), foi considerado, pois é um dos agentes amplamente empregados para solubilizar soluções aquosas contendo moléculas moderadamente hidrofóbicas (CASTRO et al., 1995; SASTRY; NYSHADHAM; FIX, 2000; STRICKLEY, 2004), o que condiz com as substâncias solubilizadas no presente estudo.

Para o preparo do veículo, o Tween 80 a 1% foi misturado com solução salina, na proporção de 1:10, por exemplo, 10 µL de Tween a 1% em 190 µL de salina. O veículo foi administrado ao grupo controle e utilizado no preparo de soluções, como o óleo de copaíba destilado e diclofenaco.

4.2.3 Óleo de copaíba destilado

O óleo de copaíba da espécie *Copaifera* spp. foi fornecido pelo Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), já processado (destilado) e com os dados sobre sua caracterização físico-química publicada anteriormente (SILVA, 2019), como segue: aspecto líquido, fino, odor característico e de coloração variante entre o amarelo-claro, com 0,8942 g/mL de densidade, 10,7 cPS de viscosidade e pH entre 6,0 – 7,0. E composição química: δ -Elemeno (0.61%), α -Cubebeno (1.67%), α -Copaeno (10.8%), β -Elemeno (1.26%), β -Cariofileno (40.7%), (E)- α -Bergamoteno (8.02%), α -Humuleno (5.29%), α -Amorpheno (2.51%), Germacreno D (1.52%), Ledeno (0.71%), δ -Cadineno (0.60%), β -Bisaboleno (2.87%), α -Cadineno (1.31%) e Cariofileno óxido (13.6%).

Para o preparo, o óleo de copaíba destilado foi solubilizado em veículo, de forma que duas concentrações distintas fossem alcançadas, 300 e 600 mg por kg de peso corpóreo dos animais, as quais foram definidas baseadas em estudos previamente publicados (CASTRO GHIZONI et al., 2017; SACHETTI et al., 2009), que possibilitaram inferir uma dose anti-inflamatória efetiva e não tóxica. Para isso, inicialmente determinou-se a dose por animal, baseado no seu peso corporal e concentração do óleo, por exemplo, um animal cujo peso era de 0,02 kg (20 g), a dose administrada foi de 6 mg ou 1,2 mg, para concentrações de 300 ou 600mg/kg, respectivamente.

Em seguida, todas as doses foram somadas e solubilizadas em 1mL veículo, de forma a obter apenas uma solução-mãe de copaíba+veículo, da qual foi retirada o volume ideal para cada animal, em relação ao seu peso e dose, que foi administrada por via orogástrica (o.g.) (gavagem).

As soluções foram administradas aos grupos que receberam o tratamento experimental (grupos “Copaíba 300” e “Copaíba 600”), por gavagem, 30 minutos antes da aplicação s.c. de Zy.

4.2.4 Diclofenaco

Entre os tratamentos convencionais empregados no estudo de AZy, optou-se por utilizar o diclofenaco oral, na concentração de 100 mg/kg, por ser amplamente empregado para esse fim em diversos estudos (AZZA; OUDGHIRI, 2015; CARDOSO et al., 2010; GUERRA et al., 2016a; PAIVA et al., 2011a; ROSAS et al., 2015a). Para isso, utilizou-se

diclofenaco comercial em gotas na concentração de 15 mg/mL. Para isso, inicialmente determinou-se a dose por animal, baseado no seu peso corpóreo, por exemplo, um animal cujo peso era de 0,02 kg (20 g) a dose administrada foi de 2 mg.

Após determinar a dose para cada animal, definiu-se o volume de diclofenaco que conteria a dose desejada, para isso, tendo em vista que a concentração de diclofenaco comercial estava a 15mg/mL, para um animal cuja concentração de 100 mg/kg é encontrada e 2 mg de diclofenaco, o volume ideal é de 0,133 mL (133 µL). Em seguida, todos os volumes foram diluídos em veículo, de forma que o volume final de todos ficassem em 0,2 mL (200 µL).

A solução foi administrada ao grupo de animais que receberam tratamento padrão (grupo “Diclo”), por gavagem, 30 minutos antes da aplicação s.c. de Zy.

4.2.5 Zymosan (Zy)

Zymosan A® do fabricante Sigma Aldrich foi adquirido comercialmente para ser utilizado como um indutor de artrite experimental (AZy), tendo em vista que sua aplicação é bem descrita na literatura para esse fim (CARDOSO et al., 2010; FRASNELLI et al., 2005; GEGOUT et al., 1994; GUERRA et al., 2016a; KEYSTONE et al., 1977; ROCHA et al., 1999; SILVA JÚNIOR; ROCHA, 2006; VOLMAN; HENDRIKS; GORIS, 2005).

O produto, em estado liofilizado, foi preparado de acordo com as instruções do fabricante e seguindo protocolos previamente descritos (PILLEMER; ECKER, 1941). Para isso, inicialmente preparou-se Cloreto de Sódio (NaCl) a 0,15 M e realizou-se o cálculo para determinar a concentração necessária. Em seguida, pesou-se 50 g de Zy em balança analítica. Então, realizou-se a suspensão do Zy em 2,5 mL de NaCl e procedeu-se com a esterilização, que consistiu em deixar a suspensão por uma hora em banho-maria contendo água fervente, depois centrifugou-se por 30 minutos a 4000 rpm, e então descartou-se o sobrenadante. Por fim, o resíduo foi suspenso uniformemente no diluente de escolha à concentração desejada, ou seja, em 2,5 mL de solução salina. Essas suspensões podem ser mantidas a 0-4 ° C durante pelo menos um mês, se não estiverem contaminadas.

A concentração de Zy para indução de artrite foi previamente definida baseada na literatura, sendo utilizada a concentração de 0,5mg (500 µg) por sítio de inoculação (PENIDO et al., 2006; ROCHA et al., 1999; ROSAS et al., 2015a). Como a suspensão foi preparada na concentração de 50g de Zy em 2,5mL solução salina, a concentração desejada (0,5 mg) foi obtida com a aplicação de 0,025 mL (25 µL) da suspensão por sítio.

A aplicação da suspensão foi realizada por via s.c. em dois sítios anatômicos, na articulação do joelho e no coxim, sempre no lado esquerdo, após 30 minutos da administração o.g. de salina, diclofenaco ou óleo de copaíba.

4.3 Etapas do projeto e técnicas empregadas

4.3.1 Experimentação animal

Trinta e seis camundongos da linhagem Balb/C (*Mus musculus*), fêmeas, com 8 semanas de idade, pesando, em média, 22g, foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada a 20-22°C, com ciclo de claro-escuro a cada 12 horas e com acesso *ad libitum* a comida e a água. Os animais foram alojados em gaiolas convencionais (seis camundongos por gaiola).

Todos os procedimentos seguiram as diretrizes do Conselho Brasileiro para o Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (CEUA-INPA), sob o protocolo 048/2016 (ANEXO II).

Os camundongos foram submetidos a diferentes técnicas experimentais: randomização e marcação prévia, pesagem, determinação do diâmetro da pata, administração o.g. de substâncias (gavagem), administração s.c de substâncias, anestesia, eutanásia, remoção de órgãos e tecidos e destinação final da carcaça.

4.3.1.1 Caracterização dos grupos experimentais

Os animais foram randomizados em seis grupos ($n= 6$ por grupo) que distinguiram entre si quanto a intervenção experimental (AZy), combinados ou não à intervenção farmacológica – tratamento padrão (diclofenaco) ou óleo de copaíba – conforme detalhado na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização dos grupos experimentais

Grupos	Intervenção Experimental (AZy)		Intervenção Farmacológica		
	Não	Sim	Não	Sim	Substância utilizada
i	Controle	X		X	-----
ii	Artrítico		X	X	-----
iii	Diclofenaco		X	X	Diclofenaco a 100 mg/Kg
iv	Copaíba 300		X	X	Óleo de Copaíba 300 mg/kg
v	Copaíba 600		X	X	Óleo de Copaíba 600 mg/kg
vi	CCop	X		X	Óleo de Copaíba 300 mg/kg

1. Intervenção experimental (Artrite induzida por Zymosan, AZy): aplicação subcutânea (s.c.) de Zy em pata traseira. Intervenção farmacológica: sem intervenção (administração de veículo), diclofenaco na concentração de 100 mg/kg, óleo de copaíba nas concentrações de 300 mg/kg ou 600 mg/kg.

Os animais dos grupos Controle (i) e CCop (vi) não foram submetidos à intervenção experimental, recebendo, por via o.g., apenas o veículo e óleo de copaíba a 300 mg/kg, respectivamente. Os grupos Artríticos (ii), Diclofenaco (iii), Copaíba 300 (iv) e Copaíba 600 (v) foram induzidos à artrite e receberam veículo, diclofenaco 100 mg/kg, óleo de copaíba a 300 mg/kg e 600 mg/kg, respectivamente.

4.3.1.2 Cronologia da experimentação animal

O período de experimentação animal ocorreu durante 96 horas, a contar da aplicação s.c. de Zy, momento definido como “tempo 0” (Tabela 2). Tendo esse tempo como marco, os demais foram nomeados de acordo com o tempo que antecedeu ou decorreu o procedimento, em minutos ou horas, por exemplo, 30 minutos antes (-30’) e uma hora após (1h), respectivamente. Vale ressaltar que os parâmetros antropométricos iniciais (peso e diâmetro da pata inicial) foram verificados momentos antes das intervenções experimentais.

Tabela 2 – Caracterização da cronologia experimental

Tempos experimentais	Tempo em relação a injeção s.c. de salina ou Zy (precedido ou decorrido)	Procedimento
Tempo -30'	30 minutos antes	Aferições iniciais: - Pesagem dos animais (Peso inicial) - Medida do diâmetro da pata (Diâmetro inicial) Administração o.g. de veículo, diclofenaco ou óleo de copaíba.
Tempo 0	Marco “0”	Aplicação s.c. de Zy
Tempo 1	1 hora decorrida	- Medida do diâmetro da pata (Diâmetro no tempo 1)
Tempo 2	3 horas decorridas	- Medida do diâmetro da pata (Diâmetro tempo 2)
Tempo 3	6 horas decorridas	- Medida do diâmetro da pata (Diâmetro tempo 3)
Tempo 4	24 horas (1 dia) decorridas	- Medida do diâmetro da pata (Diâmetro tempo 4)
Tempo 5	48 horas (2 dias) decorridas	- Medida do diâmetro da pata (Diâmetro tempo 5)
Tempo 6	72 horas (3 dias) decorridas	- Medida do diâmetro da pata (Diâmetro tempo 6)
Tempo 7	96 horas (4 dias) decorridas	- Pesagem dos animais (Peso final) - Medida do diâmetro da pata (Diâmetro em 96h) - Eutanásia e remoção de órgãos e tecidos

1. Cronologia da experimentação animal e procedimentos realizados antes (-30') e após (1h, 3h, 6h, 24h, 48h, 72h e 96h) a aplicação s.c. de Zy ou salina (marco 0).

2. **s.c.**, via subcutânea; **Zy**, solução de zymosan a 500µg (25 µL); **o.g.**, via orogástrica (gavagem)

Portanto, em todos os grupos, 30 minutos antes da aplicação s.c. de Zy (tempo 0), os animais receberam por via o.g. soluções (veículo, diclofenaco ou óleo de copaíba) e ao decorrer das 96 horas os animais foram submetidos a diferentes técnicas experimentais, tais como pesagem, determinação do diâmetro da pata, administração o.g. de substâncias (gavagem), administração s.c. de substâncias, anestesia, eutanásia, remoção de órgãos e tecidos e destinação final da carcaça, conforme descrita a seguir.

4.3.1.3 Pesagem dos animais

A pesagem dos animais vivos foi realizada utilizando balança eletrônica, com capacidade de 5010g e precisão de 1g. O procedimento foi realizado em dois momentos, sendo o primeiro realizado momentos antes de iniciar as intervenções experimentais, sendo

definido como peso corpóreo inicial e o outro após 96 horas de experimento (peso corpóreo final) para cada animal.

O peso corpóreo inicial dos animais foi obtido como média. Para avaliar o peso em relação ao início e fim do experimento foi determinado o delta peso corpóreo (Δ peso), que consiste na diferença entre o peso médio inicial e o final, expressado em gramas (g) e dado pela equação:

$$\Delta\text{peso corpóreo} = \text{peso final} - \text{peso inicial}$$

4.3.1.4 Gavagem

A administração de substância foi realizada por via o.g. (gavagem), que consiste em introduzir substâncias pela boca e então depositadas diretamente no estômago (BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, 2019). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações técnicas para administração de substâncias a animais (ANDERSEN et al., 2004; FEIJÓ; DE MACEDO BRAGA; PITREZ, 2010). Para isso, utilizou-se uma cânula de gavagem acoplada a uma seringa contendo substâncias. O procedimento inicial consistiu em conter manualmente o animal, de modo que a cabeça ficasse totalmente imobilizada e voltada para cima. Em seguida, a cânula foi introduzida na posição lateral da boca de forma delicada e contínua, deslizando-a para o interior da cavidade oral, por cima da língua do animal. Com isso, o animal manifestou o reflexo de deglutição, o que permitiu que a cânula deslizesse facilmente, passando da faringe para o esôfago sem nenhuma resistência. Uma vez que a cânula estivesse posicionada corretamente, a substância foi administrada lentamente de forma que não houvesse refluxo. Findando o procedimento, a cânula fora removida lentamente, seguindo a mesma curvatura na qual foi introduzida. O volume administrado não ultrapassou os limites indicados, que é de 1 mL de solução para cada 100 g de peso corporal.

Figura 6 – Ilustração esquemática do procedimento de gavagem intragástrica.



Fonte: retirado de Ferrero; Wilson; Sutton, 2012.

4.3.1.5 Indução da artrite experimental

Aos animais dos grupos submetidos à intervenção experimental (AZy) foram administrados, por via s.c., uma solução de Zy (Sigma, St. Louis, MO, EUA), na concentração de 0,5 mg (500 µg) em um volume final de 0,025 mL (25 µL) de solução salina estéril, aplicados no joelho e pata traseira esquerda, para o desenvolvimento de artrite experimental, conforme descrito previamente por Penido et al. (2006). Os animais controles receberam injeção s.c. de um volume igual de solução salina estéril. Além disso, nas patas traseiras e joelhos direito de todos os animais foram inoculados com 25 µL salina por via s.c.

4.3.1.6 Avaliação da inflamação da pata

A inflamação da pata foi quantificada com base no inchaço da pata e na alteração histológica. O edema da pata traseira foi medido por paquímetro digital (A & D Company Ltd., Tóquio, Japão), calculando a área da seção transversal (em mm²) da pata (TANIA PINHEIRO et al., 2018), medido antes da inoculação s.c. de Zy ou salina, definido como diâmetro inicial da pata (D_{pata}^i) e em diferentes tempos após a inoculação (Tabela 2), sendo designados como diâmetro no tempo 1 (D_{pata}^{T1}), tempo 2 (D_{pata}^{T2}), tempo 3 (D_{pata}^{T3}), tempo 4 (D_{pata}^{T4}), tempo 5 (D_{pata}^{T5}), tempo 6 (D_{pata}^{T6}) e no tempo 7 (D_{pata}^{T7}).

Os resultados foram expressos como a média ± DP da diferença entre o ao diâmetro inicial e nos diferentes tempos após administração de Zy ou Salina (Δ diâmetro das patas, em mm) (BASSI et al., 2016; BRACHT et al., 2012; ROSAS et al., 2015b), dado pela equação:

$$\Delta \text{ diâmetro das patas} = D_{pata}^f - D_{pata}^i$$

Em que, D_{pata}^i refere-se ao diâmetro da pata inicial (antes de qualquer intervenção) e D_{pata}^f ao diâmetro da pata obtido em diferentes tempos após a inoculação de Zy.

4.3.1.7 Eutanásia e remoção de órgãos e tecidos

Ao final da experimentação, sucedeu-se o procedimento de eutanásia por deslocamento cervical manual, com os animais sob anestesia geral, seguindo protocolos previamente descritos (AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2020;

NEVES et al., 2013). O procedimento foi realizado por operadores treinados, seguindo todas as recomendações preconizadas, sempre observando os princípios éticos para garantir o bem-estar dos animais, assegurando ausência de desconforto e dor, tendo em vista que a lesão da medula espinhal gera inconsciência imediata, cessando rapidamente a vida do animal (BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, 2018; CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2012).

Para realizar o procedimento, inicialmente os animais foram colocados individualmente em caixa transparente hermeticamente fechada, com algodão embebido em isoflurano, para obter sedação. Em seguida, procedeu-se com a anestesia geral, sendo aplicada por via intra-peritoneal (i.p) uma associação de cetamina (82 mg/kg) com cloridrato de xilazina (5,75 mg/kg), tendo em vista que quando combinados agem como anestésico e miorelaxante de ação central, respectivamente. De acordo com o Guia Brasileiro de Boas práticas para a eutanásia em animais (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2012), a cetamina não deve ser utilizada como o único método, mesmo em associações com outras substâncias, devendo haver um segundo método que venha a causar a morte do animal.

Posteriormente, aguardou-se os animais entrarem em estado de analgesia e inconsciência, o que foi confirmado pela identificação de indicadores que caracterizam a morte (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2012), e então realizou-se o procedimento de eutanásia, posicionando o animal em mesa cirúrgica em posição ventral, e então o executor com uma das mãos, posicionou um bastão na região cervical cranial (base do crânio), pressionando-o, e com a outra mão, tracionou a base da cauda para causar a separação das vértebras cervicais em relação ao crânio. Após a realização do procedimento, verificou-se se de fato o pescoço havia deslocado pela palpação da vértebra. Em seguida procedeu-se cirurgicamente com a remoção de órgãos e tecidos e imediata fixação (descrito a seguir). Por fim, as carcaças dos animais foram acondicionadas em saco branco leitoso com o símbolo de resíduo de risco biológico, e imediatamente transportadas até o Biotério do INPA para receber a destinação final.

Ressalta-se que a seleção do método para eutanásia baseou-se em protocolos pré-estabelecidos para espécie animal envolvida, idade do animal, meios de contenção disponíveis, habilidade dos executores, número de animais a serem mortos e no objetivo do protocolo. E que apesar de não haver estudos suficientes para questões de humanização, a eutanásia por deslocamento cervical é uma técnica amplamente empregada em pequenos animais de laboratório, sendo considerada eficiente e segura, quando bem realizada, além de

ser considerada adequada por causar inconsciência imediata, seguida de morte. Entretanto, como não é recomendado para causar a morte em grande número de animais, diferentes executores estiveram envolvidos no procedimento.

4.3.2 Coleta dos tecidos e processamento histológico

Os membros posteriores dos animais (direito e esquerdo) foram removidos *en bloc* e mantidos em solução de glutaraldeído a 2,5% (GTA 2,5%) diluído em tampão fosfato de sódio a 0,1 M em pH 7,3 a 4°C por no mínimo 48 h. Em seguida, os membros foram dissecados do tegumento com o auxílio de um estereomicroscópio (Leica EZ4D Digital System, Alemanha) e a articulação interfalangeana proximal (IFP) separada e mantida na solução fixadora para as análises posteriores. Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Microscopia Quantitativa (LaMiq/ICB/UFAM).

Após o período de fixação, o material foi submetido à etapa de descalcificação em ácido fórmico a 10%, ficando em imersão por 1 a 2 dias. Uma vez completado a descalcificação, o 3º dígito da pata traseira esquerda foi removido de forma que incluísse a articulações IFP destinada à análise estereológica.

Em seguida, o 3º dígito foi submetido a etapas de desidratação em concentrações crescentes de etanol (70 e 96%), pré-infiltrado em uma mistura de etanol 96% com solução de resina plástica de hidroxietil-metacrilato (Technovit 7100, Külzer-Heraues, Alemanha) para completar a infiltração dos tecidos. No dia seguinte, as amostras foram depositadas em moldes individuais de teflon Histobloc (Külzer-Heraues, Alemanha) (1 articulação/molde) e incluídos em resina plástica + solução polimerizadora. Os moldes foram mantidos em estufa a 37° C por 24h. Após total polimerização, cada bloco foi rotacionado de forma aleatória, uniforme e sistemática (SURS) para a obtenção de seções verticais (BADDELEY; GUNDERSEN; CRUZ-ORIVE, 1986). Brevemente, o dígito foi colocado em posição vertical no bloco, com falange distal em posição superior e metatarso em posição inferior, sendo posicionada sobre um círculo impresso com a distribuição de ângulos em 360°. Um ângulo SURS foi amostrado e a direção selecionada foi marcada na superfície do bloco. Essa estratégia permitiu obter cortes da articulação IFP em direções variadas, aumentando a robustez da análise de áreas superficiais (DA COSTA et al., 2007; GUNDERSEN; JENSEN, 1987).

Em seguida, os blocos foram observados em estereomicroscópio (Leica EZ4D Digital System, Alemanha) e marcados com pincel de ponta fina quanto ao início e fim da região

articular separando-a da região dermal. As marcas serviram de orientação para a microtomia posterior (micrótomo Leica RM 2145, Alemanha). Com a ajuda de um estereomicroscópio equipado com uma lente micrometrada o comprimento total projetado (Lt) de cada articulação IFP no interior do bloco de resina foi medido perpendicularmente ao plano do seccionamento, isto é, na direção em que o bloco avançou durante a microtomia. Assim, $Lt = SOMA L1+L2+.....+Ln$. Lt foi dividido pelo número de seções seriais desejadas (n). Neste estudo, o número de oito a 10 seções por articulação IFP foi estabelecido como satisfatório. Seções seriais de 5 µm foram obtidas a cada avanço na navalha sobre o bloco de resina no micrótomo, o que equivaleu ao avanço de 50 µm a cada seção obtida. As seções foram fixadas em lâmina, marcadas e identificadas quanto a sua sequência de corte e então coradas com fucsina básica e azul de toluidina 0,5%, sendo este último um corante metacromático. Brevemente, as seções foram mergulhadas rapidamente em fucsina, secas em chapa aquecedora e coradas por 1 min em azul de toluidina. A fucsina básica foi preparada como segue: 0,25 g de fucsina, 20mL etanol 96° GL à 60° C, 80mL de água destilada; e o azul de toluidina: 0,5g borato de sódio, 0,12g azul de toluidina e água destilada q.s.p.

4.3.3 Análise estereológica

Para as análises estereológicas foi utilizado um microscópio com sistema de captura de imagens (Leica EZ4D Digital System, Alemanha). As contagens estereológicas foram executadas através do programa Imod versão 4.7/módulo stereology (KREMER; MASTRONARDE; MCINTOSH, 1996). O software de análise de imagens ImageJ (RASBAND, 2008) foi utilizado para a amostragem sistemática uniforme ao acaso dos campos de vista analisados, SURS (*systematic uniforme random sampling*). Ambos os softwares permitem a sobreposição de sistemas teste de contagem (grids) sobre as fotomicrografias e todo o processo de contagem se concentra na identificação das estruturas que são tocadas ou interceptadas pelos eventos que compõem os grids (pontos ou curvas).

4.3.3.1 Determinação do volume da articulação e seus componentes (Princípio de Cavalieri)

As seções seriais digitalizadas foram analisadas para a determinação do volume total das articulações, seguindo o princípio de Cavalieri (1635), viabilizado por meio do software Imod versão 4.7/módulo *stereology*, que possibilitou sobrepor em cada seção um sistema teste de contagem (grids), permitindo contar os pontos que tocavam as respectivas estruturas

(categorias) de interesse (KREMER; MASTRONARDE; MCINTOSH, 1996). Esta técnica está fundamentada em robusta análise matemática, é de aplicação simples e extremamente eficiente (REED; HOWARD; DE YANÉS, 2010). O volume da articulação IFP abrangeu os limites entre as cápsulas laterais e mediais e os limites do osso esponjoso. Ao término da contagem, o somatório de pontos para cada material foi obtido e então aplicado a seguinte equação:

$$V (mm^3) = \sum_{i=1}^m P_i \times T \times a/p$$

Onde, V é o volume absoluto do órgão, $\sum_{i=1}^n P_i$ é o número total de pontos sobre cada órgão, a/p é a área representada por cada ponto e T é a distância entre cada seção. Um coeficiente de erro de 5% e desvio de 15% foram considerados aceitáveis (GUNDERSEN et al., 1988; GUNDERSEN; ØSTERBY, 1981). Visto que as contagens nas seções seriais de uma articulação representam eventos dependentes, a variância foi calculada por equações apropriadas (GUNDERSEN; JENSEN, 1987; GUNDERSEN; ØSTERBY, 1981).

4.3.3.2 Determinação do volume dos componentes internos da articulação IFP (Princípio de Delesse)

A porcentagem de cada componente dentro da articulação IFP foi obtido pelo princípio de Delesse (densidade de volume). Um aumento de 200 foi empregado em campos de vista selecionados aleatoriamente. Os componentes foram quantificados pela contagem de pontos e o resultado expresso em porcentagem conforme:

$$V_v (\text{componente, espaço de referência}) = \frac{\sum_{i=1}^m P_{\text{comp}}}{\sum_{i=1}^m P_{\text{ref}}}$$

Onde V_v é a densidade de volume de determinado componente (cápsula articular, membrana sinovial, espaço sinovial cartilagem hialina e osso) e P_{ref} é a somatória de pontos que tocam o espaço de referência (região articular) (REED; HOWARD; DE YANÉS, 2010). Os dados percentuais (V_v) foram transformados em absolutos ao serem multiplicados pelo volume de Cavalieri da articulação IFP:

$$V_{\text{absoluto}} = V_{\text{Cavalieri}} \times V_v$$

4.3.3.3 Determinação da área superficial na cartilagem e membrana sinovial (Princípio de Buffon)

A área superficial (S) da cartilagem e membrana sinovial também foi estimada. Essa técnica também é conhecida como densidade de superfície e consiste em sobrepor a imagem com sistemas teste contendo linhas/curvas (arcos) cicloides longas (REED; HOWARD; DE YANÉS, 2010). Para cartilagem duas regiões distintas foram determinadas: superfície articular (S CA) e superfície calcificada (S CC). Para tal, foram sobrepostas as imagens os arcos cicloides. Cada interseção das linhas dos arcos com a borda de uma superfície específica foi contada. Os dados de interseções foram usados para a determinação da relação superfície-volume (Sv) estimada de acordo com Weibel (1980) usando a equação:

$$Sv = \frac{2 \cdot \sum_{i=1}^n Ii}{l/p \cdot \sum_{i=1}^n Pi}$$

Onde: Ii é o número de interseções entre as linhas teste e as superfícies; l/p é o comprimento da linha teste e Pi é o somatório de pontos que tocam a região de interesse. A área superficial total foi obtida ao multiplicar-se Sv pelo volume de Cavalieri:

$$S \text{ absoluto} = VCavalieri \times Sv$$

4.3.4 Análise estatística

O programa estatístico Prisma (GraphPad Software, Inc., CA, USA) foi usado para a análise estatística e gráfica deste estudo. Os dados foram testados quanto à sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e analisados por meio de ANOVA (análise de variância one-way e two-way). Nos casos em que houve diferença entre os grupos, o paramétrico de múltiplas comparações de Tukey foi utilizado para comparar os valores médios entre os grupos testados. O limite de confiança estabelecido para os testes foi de 5%.

Os dados estereológicos foram avaliados para cada animal e a estimativa da variância foi determinada usando o coeficiente de erro (C.E.) conforme descrito por Cruz-Orive (1997). As 10 variáveis estereológicas foram analisadas por meio de análise de componentes principais (PCA, *Principal Component Analysis*) para explorar a relação entre essas variáveis e os tratamentos e para identificar as variáveis com maior influência no presente modelo experimental. A análise de PCA foi realizada usando o programa PAST-Paleontological Statistics, versão 3.14 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

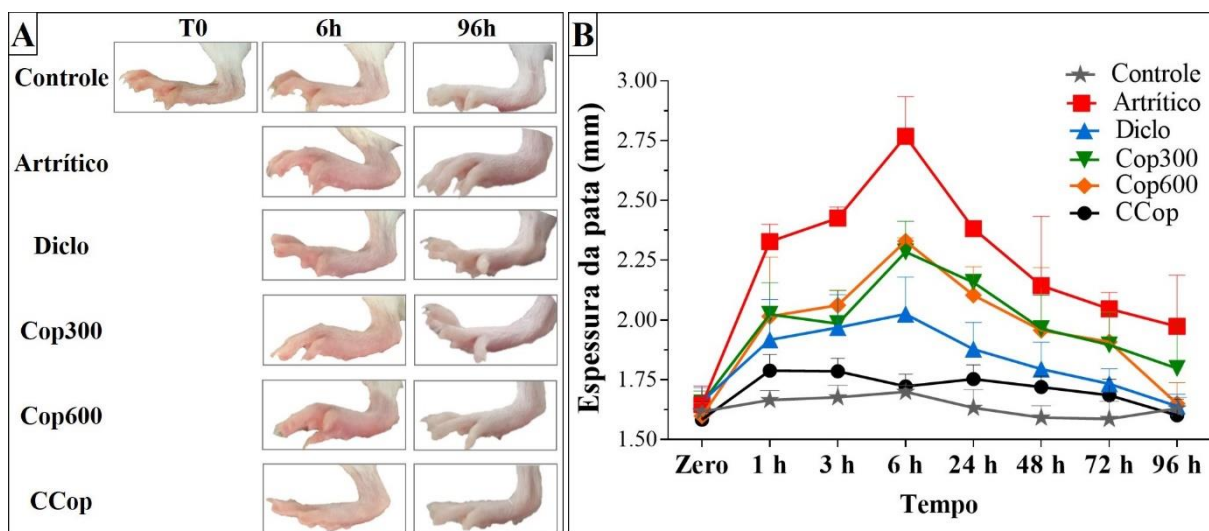
5. RESULTADOS

5.1 Desenvolvimento da inflamação aguda

5.1.1 Espessura da pata

Durante o experimento, o primeiro sinal de inflamação das articulações foi tipicamente avaliado por inchaço (edema) da pata, que nos animais que receberam apenas aplicação s.c. de salina (Controle e CCop) apresentaram espessura constante, em contraste com os demais, nos quais foram inoculados Zy, sendo observado nesses grupos evidências macroscópicas de inchaço (Fig. 7a) e aumento da espessura das patas, elevando-se logo após 1 hora da inoculação, com aumentos gradativo durante todo o período, sendo o pico às 6 h e a redução às 96 h (Fig. 7b).

Figura 7 – Avaliação da espessura da pata dos animais antes e após aplicação s.c. de Zy ou salina



1. (a) Fotografias representativa das patas traseiras esquerdas de Balb/c antes (T0) e após (6h e 96h) aplicação s.c. de Zy ou salina, de acordo com o grupo experimental; (b) Gráfico demonstrando a cinética da espessura da pata, em mm, durante o período de experimentação.

2. T0, tempo 0 (inicial); **Controle**, sem intervenções; **Artrítico**, artrítico não tratado; **Diclo**, artrítico tratado com diclofenaco a 100 mg/kg; **Cop300** e **Cop600**, artríticos tratados com óleo de copaíba nas doses de 300 e 600 mg/kg, respectivamente; **CCo**, não artrítico, tratado com óleo de copaíba a 300 mg/kg.

Em relação a dinâmica do edema, verificou-se que na primeira hora após injeção (1h), o grupo artrítico não tratado demonstrou uma elevação significativa em relação aos demais ($P < 0,05$) (Fig. 8). Já sobre os grupos artríticos tratados (Diclo, Cop300 e Cop600), essa elevação foi significativamente menor, quando comparado ao Artrítico. Inclusive nas primeiras horas (1h e 3h) após a indução, tais grupos não foram diferentes entre si.

Assim sendo, pode-se inferir que nas primeiras horas após a aplicação s.c. do Zy (1h e 3h) na pata de Balb/c o diclofenaco a 100 mg/kg e o óleo de copaíba em ambas as concentrações (300 e 600 mg/kg) agem igualmente sobre o edema, contendo o inchaço da pata.

Às 6 horas todos os grupos que receberam injeção s.c. de Zy tiveram aumento do volume da pata, sendo o maior observado no grupo artrítico não tratado (Artrítico), estando 68,1% mais elevado quando comparado ao volume inicial (Tabela 3). Já os animais tratados com fármaco padrão (Diclo) e com copaíba (Cop300 e Cop600), apesar de também terem atingido o pico às 6 horas, foram menores quando comparado ao grupo Artrítico. Nesse estágio houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os grupos artríticos tratados (Diclo, Cop300 e Cop600) e os grupos Controle e Artrítico (Fig. 8).

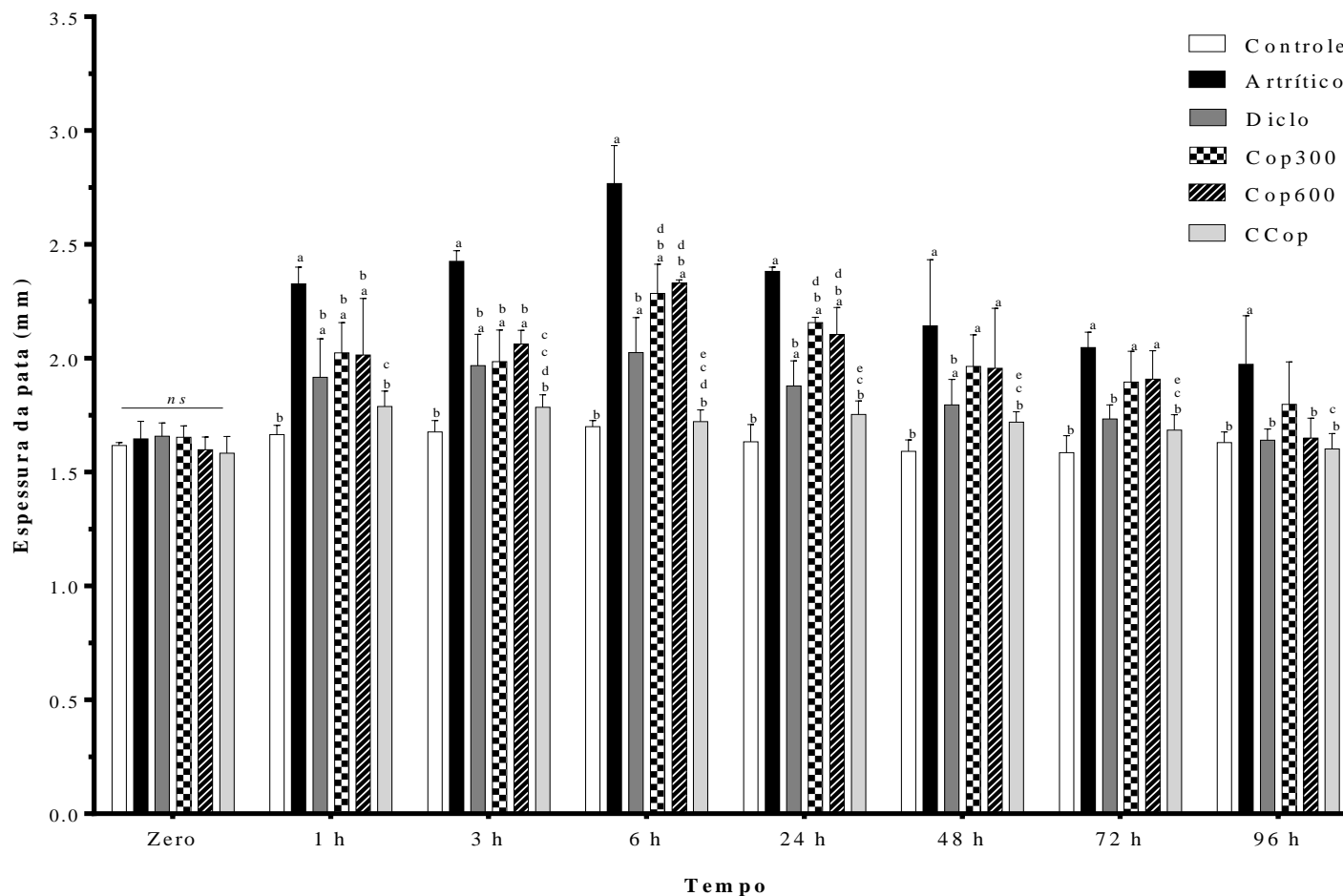
Tabela 3 – Espessura da pata (mm) dos animais após 6 e 96 horas da inoculação de Zy.

	Grupos					
	Controle	Artrítico	Diclo	Cop300	Cop600	CCo
+ 6 horas	1,70±0,03 (5,2%)	2,77 ± 0,17 (68,1%)	2,03 ± 0,15 (22,1%)	2,29 ± 0,13 (38,2%)	2,33 ± 0,01 (45,8%)	1,72 ± 0,05 (8,8%)
+ 96 horas	1,63 ± 0,05 (0,8%)	1,97 ± 0,21 (19,8%)	1,64 ± 0,05 (0,8%)	1,80 ± 0,19 (8,7%)	1,65 ± 0,09 (3,2%)	1,60 ± 0,07 (1,0%)

1. O volume médio das patas no tempo inicial foi de $1,63 \pm 0,05$ mm; Δ volume das patas = volume no tempo +6h (ou +96h) – volume inicial (-30'), expressado em mm e %; Os dados são média \pm o desvio padrão de quatro a seis animais.
2. **Controle**, sem intervenções; **Artrítico**, artrítico não tratado; **Diclo**, artrítico tratado com diclofenaco (100 mg/kg); **CCo**, não artrítico, tratado com óleo de copaíba a 300 mg/kg; **Cop300** e **Cop600**, artríticos tratados com óleo de copaíba nas doses de 300 e 600 mg/kg, respectivamente.

Em conjunto, os resultados demonstraram que o pico do edema ocorreu às 6 horas da aplicação s.c. de Zy, sendo significativamente maior no grupo não tratado. Ressalta-se ainda, que o inchaço nos grupos Diclo, Cop300 e Cop600 foi mais controlado, quando comparado ao Artrítico, porém nenhum foi eficaz em retomar a espessura das patas aos níveis basais (controle). Vale ressaltar que nesse estágio, os grupos tratados com copaíba além de terem sido diferentes estatisticamente dos grupos Controle e Artrítico, também diferiram do Diclo, fato que denota que o óleo de copaíba foi capaz de conter o edema nesse estágio, mas não de forma tão eficiente quanto ao tratamento padrão.

Figura 8 – Espessura da pata, em mm, de Balb/c após 96h da inoculação s.c. de Zy ou salina, de acordo com o tempo e grupo experimental



1. Gráfico demonstrando a espessura das patas dos animais (em mm) durante o período de experimentação (96 horas), antes e após a inoculação de Zymosan ou Salina.
2. **Zero**, tempo inicial; **1h**, **3h**, **6h**, **24h**, **48h**, **72h** e **96h**, tempos decorridos da inoculação de Zy ou Salina; **Controle**, sem intervenções; **Artrítico**, artrítico não tratado; **Diclo**, artrítico tratado com diclofenaco a 100 mg/kg; **Cop300** e **Cop600**, artríticos tratados com óleo de copaíba nas doses de 300 e 600 mg/kg, respectivamente; **CCo**, não artrítico, tratado com óleo de copaíba a 300 mg/kg.
3. Letras sobrescritas no gráfico indicam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$): diferença quando comparado ao grupo ^aControle, ^bArtrítico, ^cCop300, ^dDiclo, ^eCop600.

No decorrer da cinética do edema (24h em diante) observou-se uma redução gradativa da espessura da pata dos animais artríticos. Sobressai de importância às 96 horas, em que se observou a redução da espessura das patas em todos os grupos, em que o Controle, o Diclo e o Cop600 praticamente retornaram aos níveis basais (iniciais). Cabe destacar, que nesse estágio, o grupo Controle não apresentou diferença estatística significativa em relação à praticamente todos os grupos, exceto ao Artrítico, que por sua vez, foi diferente quase em sua totalidade, mas não do Cop300.

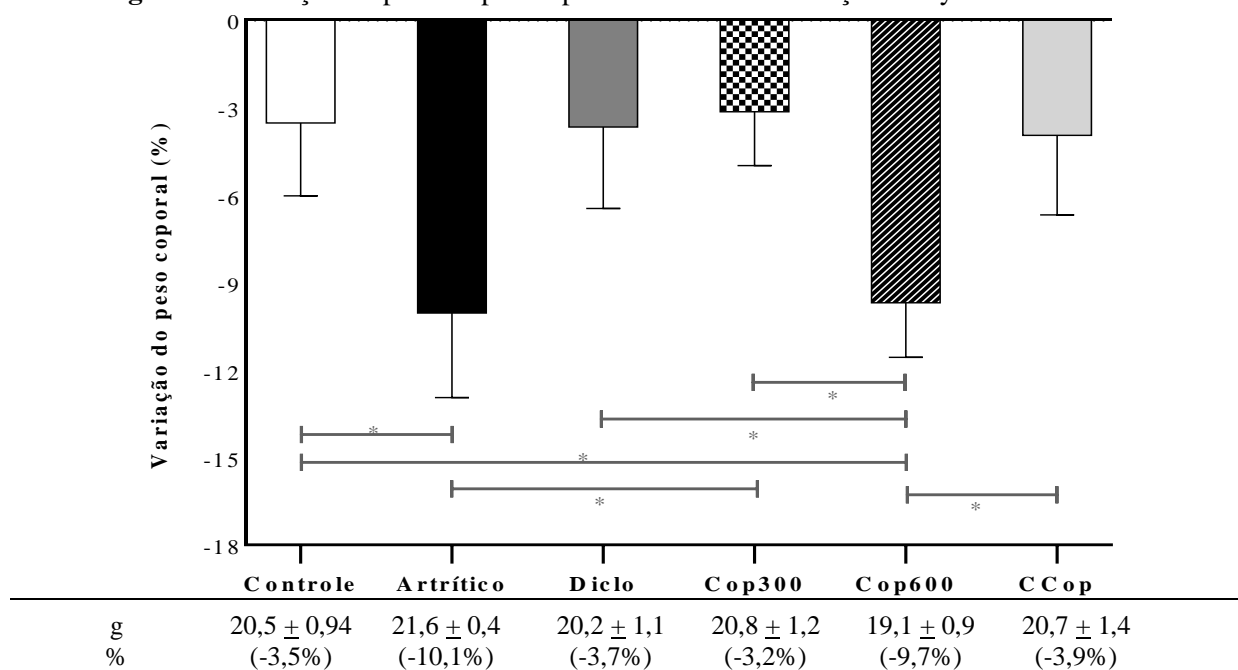
Com isso, infere-se que o diclofenaco a 100 mg/kg e a copaíba a 600 mg/kg, quando administrado por via oral, 30 minutos antes da inoculação s.c. de Zy em patas de Balb/c, apresentaram a mesma eficácia na contenção do inchaço da pata após 96h da injeção. Em contrapartida, nesse estágio a copaíba a 300 mg/kg não foi capaz de atingir o mesmo efeito, sugerindo que essa dose é eficiente apenas nas primeiras horas da reação inflamatória.

Em conjunto, os dados demonstraram que as patas dos animais inoculados com Zy incharam logo nas primeiras horas e atingiram a espessura máxima em 6 horas após a indução, principalmente no grupo não tratado (Artrítico). O diclofenaco e o óleo de copaíba a 300 e 600 mg/kg foram capazes de conter o inchaço da pata no decorrer de 96 horas. Entretanto, às 6 h essa eficácia foi mais importante para o grupo Diclo, mesmo que não tenha retomado aos níveis basais (iniciais). E, às 96 h, tanto o diclofenaco como a copaíba 600 foram capazes de retomar a espessura da pata aos níveis basais.

5.1.2 Peso corporal

O peso corporal foi monitorado antes da aplicação de Zy ou salina e após 96h de experimentação. O peso médio inicial dos animais foi de $21,5 \pm 1,4$ g. Todos os grupos apresentaram redução de peso corporal ao final, entretanto a perda estatisticamente significativa, quando comparadas ao grupo Controle, foi observada apenas nos animais artríticos não tratados (grupo Artrítico) e tratados com copaíba a 600 mg/kg (Cop600), com -10,1% e -9,7%, respectivamente, em relação ao peso inicial (Fig. 9).

Figura 9 - Variação do peso corporal após 96 horas da inoculação de Zymosan ou Salina.



1. O peso corporal médio dos animais no tempo inicial (-30') foi de 21,5±1,4g; Δpeso corpóreo = peso no tempo final – peso inicial, expressado em %. Na tabela, peso final expressado em g e %.

2. **Controle**, sem intervenções; **Artrítico**, artrítico não tratado; **Diclo**, artrítico tratado com diclofenaco (100 mg/kg); **CCo**, não artrítico, tratado com óleo de copaíba a 300 mg/kg; **Cop300** e **Cop600**, artríticos tratados com óleo de copaíba nas doses de 300 e 600 mg/kg, respectivamente.

3. Os dados são média ± o desvio padrão de quatro a seis animais. Diferença estatística quando P < 0,05 (*), P < 0,01 (**), P < 0,001 (***) e P < 0,0001 (****).

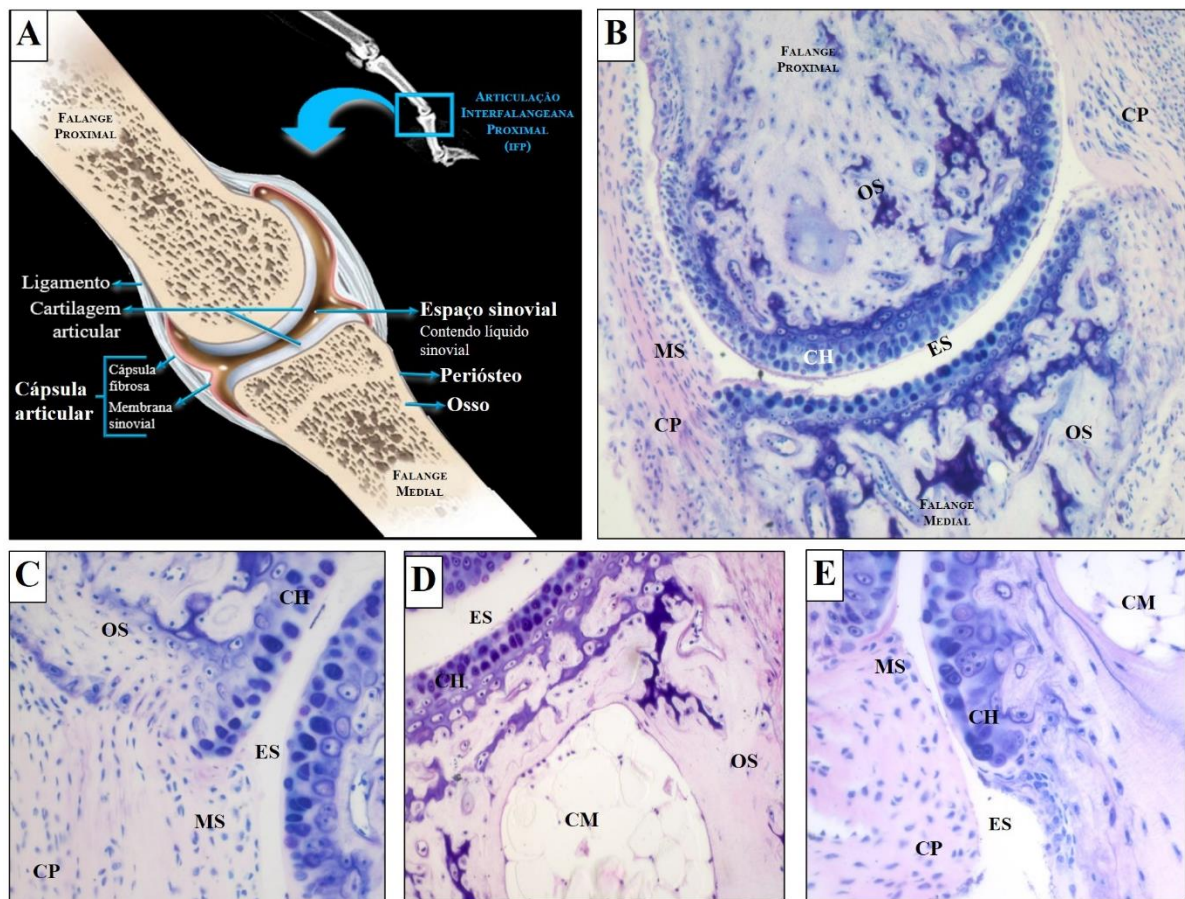
O percentual de perda de peso dos animais do grupo Controle, Diclo, Cop300 e CCo foram próximos, com -3,5%, -3,7%, -3,2% e -3,9%, respectivamente, não demonstrando diferença estatística entre eles. Já o grupo Artrítico foi significativamente ($P \leq 0,05$) diferente do Controle e do Cop300. O grupo Cop600 apresentou diferença à praticamente todos os grupos, exceto ao Artrítico.

Diante do exposto, os dados demonstram que a indução de artrite por injeção s.c. de Zy em pata de Balb/c induz a perda de peso nos animais, sendo mais proeminentes nos animais não tratados. E ainda, que o tratamento com diclofenaco e óleo de copaíba a 300mg/kg preservam o peso. Entretanto, o óleo de copaíba a 600mg/kg não apresentou a mesma eficiência.

5.2 Histomorfologia da articulação interfalangeana proximal (IFP)

Ao exame histológico, foram observadas articulações com características morfológicas normais (Fig. 10) e outras com alterações, que incluíram a membrana sinovial (Fig. 11), osso (Fig. 12) e cartilagem hialina (Fig. 13 e 14).

Figura 10 - Articulação IFP com características histomorfológicas normais.

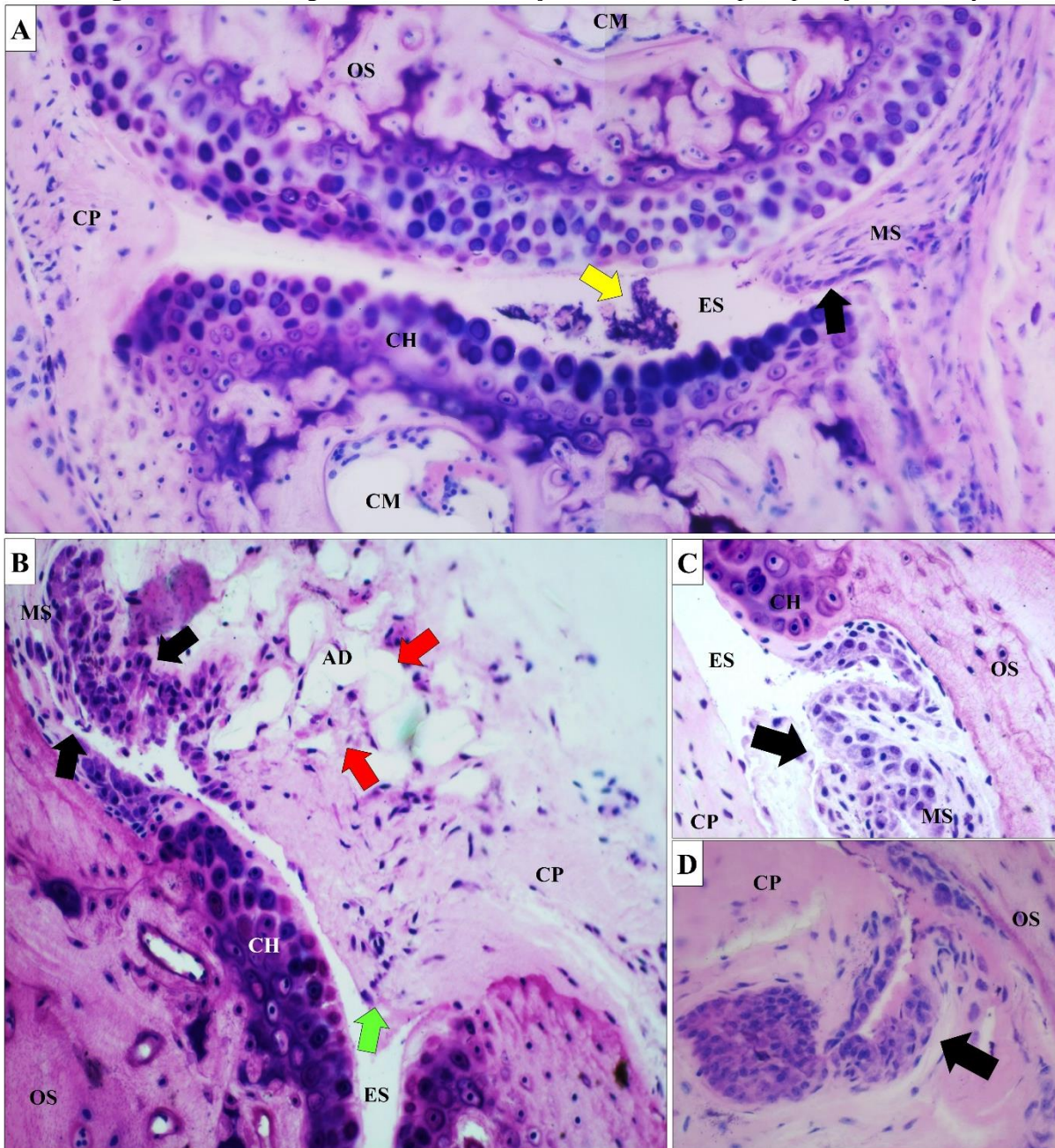


1. Articulação interfalangeana proximal (IFP) apresentando características morfológicas normais; (a) Figura esquemática da articulação sinovial, com identificação dos componentes articulares; (b-e) Fotomicrografias representativas das articulações IFP de camundongos Balb/c apresentando características histomorfológicas normais, observadas em seções histológicas, corada com toluidina e fucsina.

2. Espaço entre as seções: 50 μ m. Aumento de 100x (a) e 200x (b-e). IFP, interfalangeana proximal; FP, falange proximal; FM, falange medial; CP, cápsula articular; MS, membrana sinovial; OS, osso; CA, cartilagem articular.

Entre as alterações histomorfológicas que envolveram a membrana sinovial destacam-se a hiperplasia e hipertrofia dos sinoviócitos e infiltração de *pannus* inflamatório no espaço sinovial (Fig. 11a), agregados de fibrina no espaço sinovial (Fig. 11a), densos infiltrados de células inflamatórias na sinóvia periarticular (Fig. 11b,c,d).

Figura 11 – Morfologia da MS em articulação IFP de Balb/c após aplicação s.c. de Zy



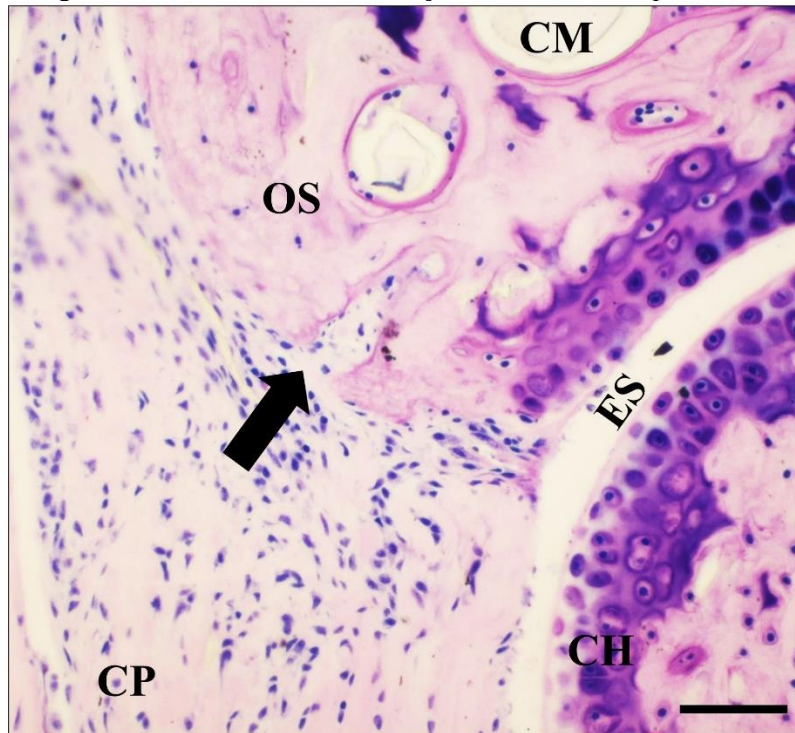
1. Fotomicrografias representativas de seções histológicas de articulação IFP de camundongos Balb/c após 96 horas da aplicação s.c. de Zy, destacando a proliferação e hiperplasia sinovial com infiltração do ES (seta preta) e agregados de fibrina (seta amarela) (200x) (a); MS hiperplásica (seta preta), com inúmeros adipócitos (setas vermelhas) (200x) (b); sinoviócitos hipertróficos e hiperplásicos com infiltrado de células imunes (seta preta) (400x) (c); MS hiperplásica e hipertrófica (seta preta) (400x) (d).

2. CP, cápsula articular; CA, cartilagem hialina. ES, espaço sinovial; MS, membrana sinovial; OS, osso; CM, cavidade medular; VS, vasos sanguíneos.

Alterações na remodelação óssea também foram observadas no presente estudo, no qual verificou-se perda óssea (osteólise) profunda na região periarticular à área afetada (Fig. 12). Além disso, também houve crescimento de pannus, formado por tecido fibrovascular associado a células inflamatórias, a partir do ângulo capsular ao longo da superfície periosteal, que avançou para o ES, invadiu a área erodida do osso e instalou-se sobre a superfície da

cartilagem articular, levando a uma agregação avascular de células sinoviais nesses locais, contribuindo para a lesão da cartilagem.

Figura 12 – Morfologia da erosão óssea em articulação IFP de Balb/c após 96h da injeção s.c. de Zy

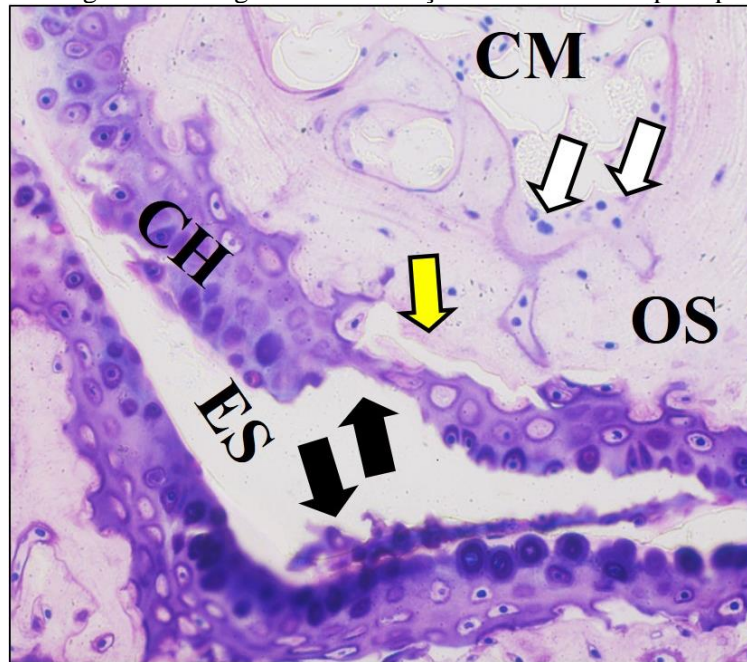


1. Fotomicrografia representativa demonstrando destruição óssea (osteólise) e invasão de pannus (seta amarela), que percorre a superfície periosteal (tracejado amarelo), avançando para o espaço sinovial e superfície da cartilagem articular (setas pretas).

2. CP, cápsula articular; CH, cartilagem hialina. ES, espaço sinovial; MS, membrana sinovial; OS, osso; CM, cavidade medular. Barra = 50 µm.

Com a progressão, as áreas de osteólise peri e subcartilaginosa, obliteraram a junção do osso e da cartilagem, tornando-a minada, erodida, levantada e finalmente perdida (Fig. 13). Além da perda óssea, também foram observadas áreas de neoformação óssea predominantemente periosteal, que inclui a formação de exostoses cartilaginosas (Fig. 14)

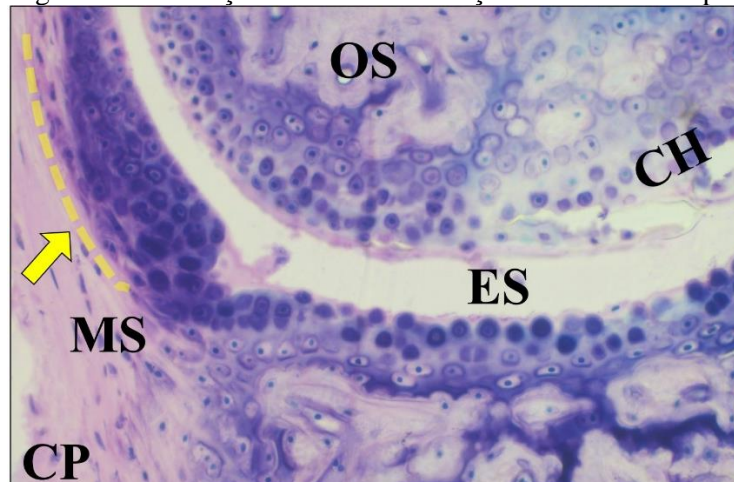
Figura 13 – Morfologia da cartilagem em articulação IFP de Balb/c após aplicação s.c. de Zy



1. Fotomicrografia representativa demonstrando articulação IFP de camundongos, após 96 h da aplicação s.c. de Zy, com destruição óssea (seta amarela) e da cartilagem (setas pretas) e infiltrado de células imunes na CM (setas brancas). Aumento = 200 x

2. CP, cápsula articular; CA, cartilagem articular. ES, espaço sinovial; OS, osso; CM, cavidade medular.

Figura 14 – Morfologia da remodelação óssea em articulação IFP de Balb/c após injeção s.c. de Zy



1. Fotomicrografia representativa demonstrando remodelação óssea, com formação de exostose cartilaginosa (seta amarela), em substituição a membrana sinovial (tracejado amarelo).

2. CP, cápsula articular; CH, cartilagem hialina. ES, espaço sinovial; MS, membrana sinovial; OS, osso; CM, cavidade medular.

5.3 Estereologia da articulação IFP

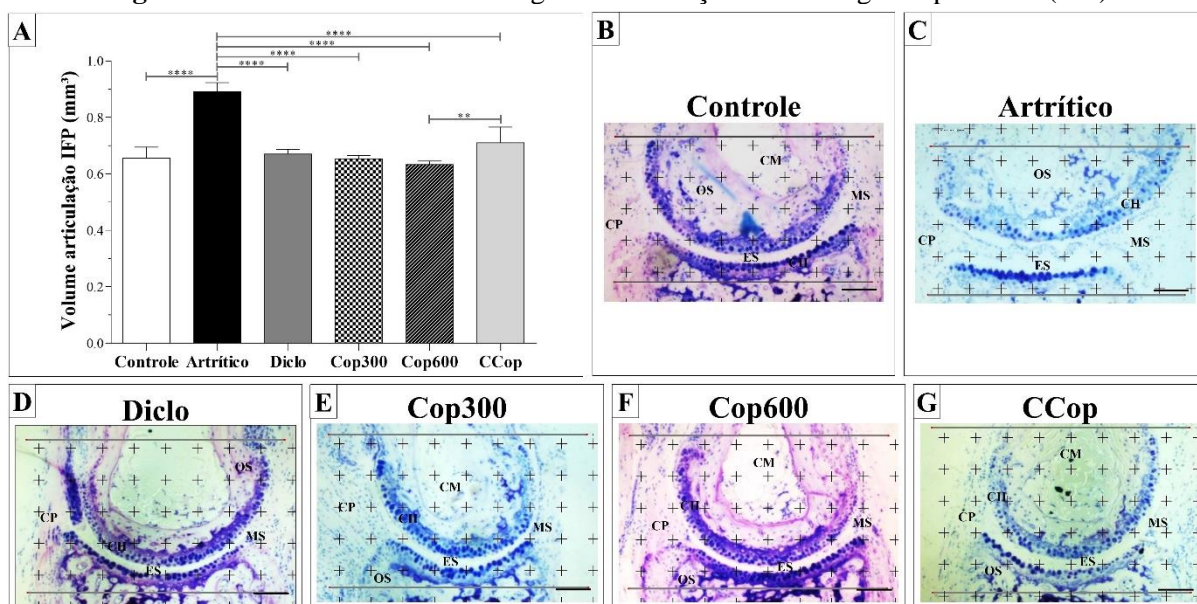
Por meio de ferramentas estereológicas (HOWARD; REED, 2004), foram determinados o volume total da articulação interfalangeana proximal (IFP) (Fig. 15) dos camundongos Balb/c após 96 horas da aplicação de Zy ou Salina, tratados ou não, e dos seus respectivos componentes estruturais, como cápsula articular (Fig. 16), membrana sinovial

(Fig. 17), espaço sinovial (Fig. 18), cartilagem articular (Fig. 19) e tecido ósseo (Fig. 20). Além disso, também foi determinada a área superficial da cartilagem (total, articular e calcificada) (Fig. 22) e da membrana sinovial (Fig. 23) (DE BUFFON, 1777).

5.3.1 Volume total da articulação interfalangeana proximal (IFP)

O volume da articulação IFP dos animais artríticos não tratados (Artrítico) foi, em média, 34% maior em relação aos outros grupos, apresentando diferença estatística significativa ($P < 0,0001$) entre estes (Fig. 15a). Os grupos Diclo, Cop300 e Cop600 não foram diferentes quando comparados ao grupo Controle, entretanto o grupo CCop diferiu do Cop600 ($P \leq 0,01$).

Figura 15 – Volume e histomorfologia da articulação interfalangeana proximal (IFP)



1. Gráfico demonstrando o volume da IFP (em mm^3) da pata esquerda traseira de Balb/c após 96h da injeção s.c. de Zy ou salina, tratados ou não (de acordo com o grupo experimental) (a); Fotomicrografias representativas de seções histológicas das articulações IFP sob grid de pontos (+) e delimitação de área de contagem (□) de acordo com o grupo experimental (b-g). Observar que as articulações IFP dos grupos Artrítico (b) e CCop (g) ultrapassam a delimitação da área de contagem; Barra = 260 μm .

2. **Controle**, sem intervenções; **Artrítico**, artrítico não tratado; **Diclo**, artrítico tratado com diclofenaco a 100 mg/kg; **Cop300** e **Cop600**, artríticos tratados com óleo de copaíba a 300 mg/kg e 600 mg/kg, respectivamente; **CCop**, não artrítico, tratado com copaíba a 300 mg/kg; **CP**, cápsula articular; **CH**, cartilagem hialina. **ES**, espaço sinovial; **MS**, membrana sinovial; **OS**, osso; **CM**, cavidade medular; **ME**, músculo esquelético.

3. Diferença estatística quando $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***) e $P \leq 0,0001$ (****).

Ao exame estereológico, observou-se que para o grupo Controle, a área pré-definida para contagem dos componentes da articulação sinovial englobava toda articulação, incluindo a cartilagem e osso periarticular. Já no grupo Artrítico e CCop, observa-se que os componentes ultrapassavam área delimitada, aumentando a área de contagem e

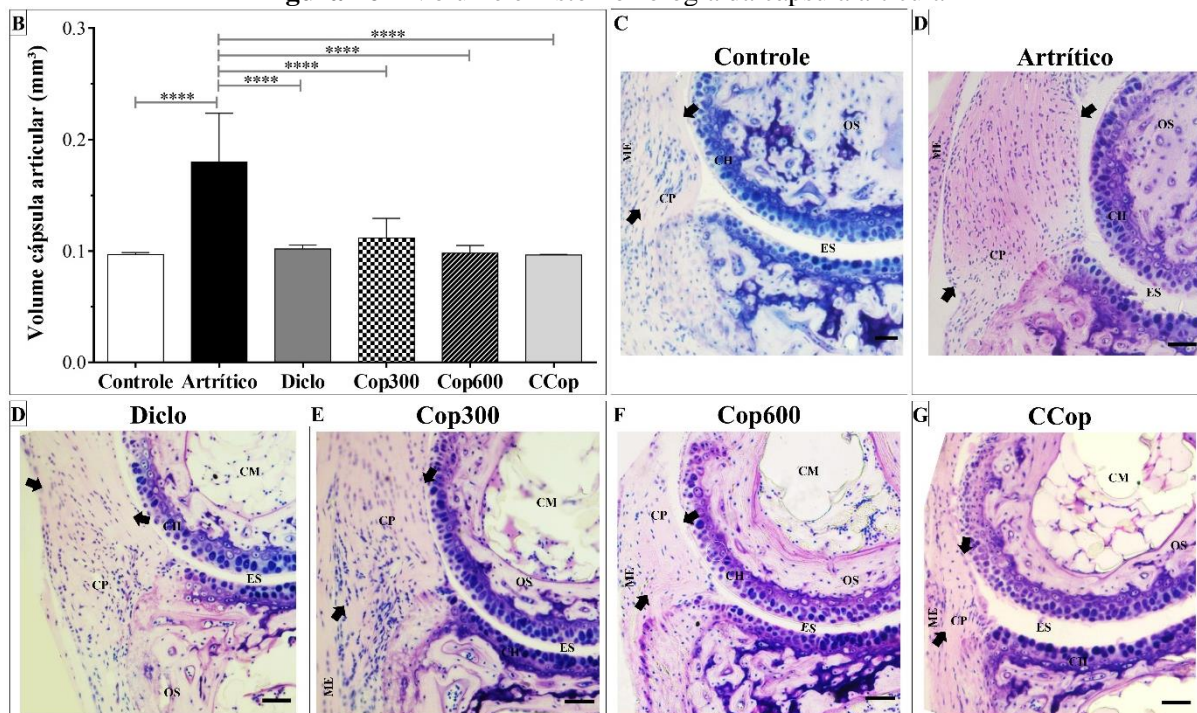
consequentemente o volume. Apesar do grupo CCop apresentar-se maior em relação ao Controle (Fig. 16a), este não foi considerado estatisticamente significativo.

Em conjunto, infere-se que o Zy promoveu o aumento do volume da articulação IFP da pata traseira de camundongos Balb/c após 96 horas da sua aplicação s.c. Além disso, verificou-se que os tratamentos com diclofenaco a 100 mg/kg e óleo de copaíba a 300 e 600 mg/kg foram capazes de manter o volume articular, tendo em vista que os níveis permaneceram próximos ao Controle. Por fim, demonstrou-se que o óleo de copaíba *per si* não influenciou no volume, que apesar de maior em relação ao controle, não apresentou diferença estatística.

5.3.2 Volume da cápsula articular

O volume da cápsula articular (CP) dos animais artríticos foi aproximadamente 79% maior em relação aos demais grupos, demonstrando diferença estatística significativa entre estes ($P \leq 0,0001$) (Fig. 16a). O espessamento da cápsula no grupo Artrítico em comparação aos demais grupos foi visivelmente observado em seções histológicas e quantificados por métodos estereológicos (Fig. 16b-g). Os demais grupos não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

Figura 16 – Volume e histomorfologia da cápsula articular



1. Gráfico demonstrando o volume da CP (em mm³) da articulação IFP da pata esquerda traseira de Balb/c após 96h da injeção SC de Zy ou salina, tratados ou não (de acordo com o grupo experimental) (a); Fotomicrografias representativas de seções histológicas das articulações IFP destacando a CA (➔) dos grupos Controle (b), que

apresentou características morfológicas normais; Artrítico (**b**), com espessamento da CA; Diclo (**d**), Cop300 (**e**), Cop600 (**f**) e CCop (**g**), normais; Barra = 50 μ m.

2. **Controle**, sem intervenções; **Artrítico**, artrítico não tratado; **Diclo**, artrítico tratado com diclofenaco a 100 mg/kg; **Cop300** e **Cop600**, artríticos tratados com óleo de copaíba a 300 mg/kg e 600 mg/kg, respectivamente; **CCop**, não artrítico, tratado com copaíba a 300 mg/kg; **CP**, cápsula articular; **CH**, cartilagem hialina. **ES**, espaço sinovial; **MS**, membrana sinovial; **OS**, osso; **CM**, cavidade medular; **ME**, músculo esquelético; **seta preta** (➡), cápsula articular.

3. Diferença estatística quando $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***) e $P \leq 0,0001$ (****).

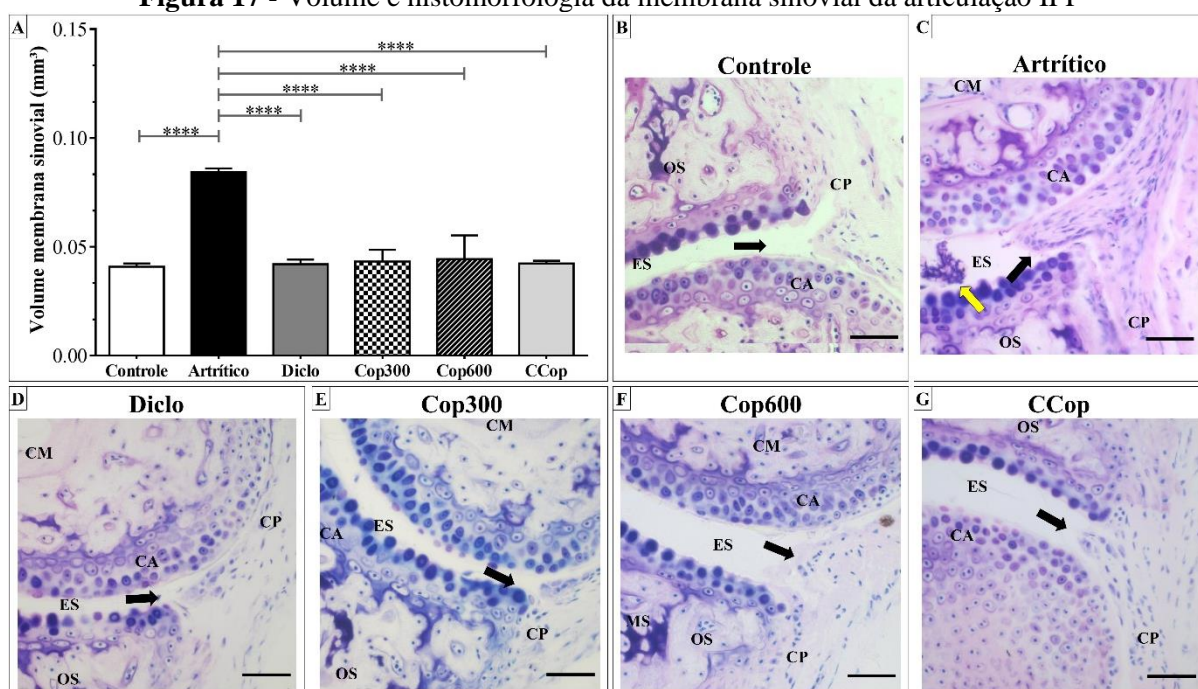
A figura 17 (b-g) representa a morfologia das seções histológicas de articulação dos camundongos Balb/c. Os animais do grupo Controle demonstraram uma estrutura morfológica normal (setas pretas), o que é evidente quando comparado ao grupo Artrítico, que demonstrou um espessamento da cartilagem articular (setas pretas na figura 17c). Os demais grupos, não demonstram significância estatística em relação ao volume da cápsula, apesar de visualmente diferentes quando comparado ao grupo controle.

Em conjunto, os dados demonstram que o Zy promove o aumento da cápsula articular da articulação IFP após 96 horas da sua aplicação s.c. na pata de camundongos Balb/c. Ainda, observou-se que os tratamentos com diclofenaco a 100 mg/kg e com óleo de copaíba a 300 e 600 mg/kg são eficazes em manter o volume e morfologia da cápsula quando administrado 30 minutos antes da aplicação de Zy, tendo em vista que não foi diferente do controle e apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao Artrítico não tratado. Ainda, sobre o óleo de copaíba administrado na ausência de um indutor de inflamação, verifica-se que este também não apresenta efeito no volume da cápsula articular.

5.3.3 Volume da membrana sinovial

O volume da membrana sinovial do grupo Artrítico foi, em média, 98% maior em relação aos demais grupos, demonstrando diferença estatística significativa entre eles ($P < 0,0001$) (Fig. 17a). Os demais grupos não apresentaram diferença entre si.

Figura 17 - Volume e histomorfologia da membrana sinovial da articulação IFP



1. Gráfico demonstrando o volume da MS (em mm³) em articulação IFP da pata esquerda traseira de Balb/c após 96h da injeção SC de Zy ou salina, tratados ou não (de acordo com o grupo experimental) (a); Fotomicrografias representativas de seções histológicas das articulações IFP destacando a MS (➡) dos grupos Controle (b), que apresentou características morfológicas normais; Artrítico (b), hiperplásica, com infiltração do ES e presença de fibrina (➡); Diclo (d), Cop300 (e), Cop600 (f) e CCop (g), normais; Barra = 50 μm.

2. **Controle**, sem intervenções; **Artrítico**, artrítico não tratado; **Diclo**, artrítico tratado com diclofenaco a 100 mg/kg; **Cop300** e **Cop600**, artríticos tratados com óleo de copaíba a 300 mg/kg e 600 mg/kg, respectivamente; **CCop**, não artrítico, tratado com copaíba a 300 mg/kg. **CP**, cápsula articular; **CH**, cartilagem hialina. **ES**, espaço sinovial; **MS**, membrana sinovial; **OS**, osso; **CM**, cavidade medular; **ME**, músculo esquelético; **seta preta** (➡), membrana sinovial; **seta amarela** (➡), fibrina.

3. Diferença estatística quando $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***) e $P \leq 0,0001$ (****).

A hiperplasia sinovial foi evidente no grupo Artrítico, que além de proliferar, também tornou-se hipertrófica além de invadir o espaço sinovial (Fig. 18c), resultando assim no aumento do seu volume. Os demais grupos que receberam injeção s.c. de Zy também demonstraram alteração histomorfológica da MS, apresentando discreta hipertrofia das células sinoviais, entretanto essa diferença não foi capaz de aumentar a contagem da estrutura de forma significativa.

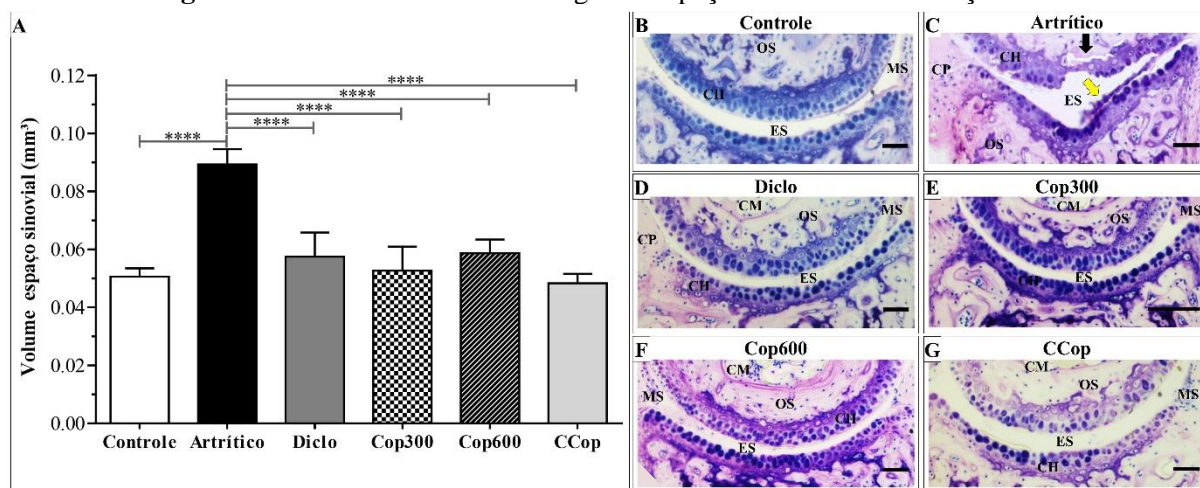
Diante do exposto, verificou-se que o modelo de AZy foi capaz de modificar o volume e a morfologia da MS de articulação IFP após 96 horas da sua aplicação s.c. em camundongos Balb/c. No que tange os efeitos do óleo de copaíba, observou-se que este foi capaz de preservar a membrana sinovial, em ambas as doses utilizadas (300 e 600 mg/kg), mantendo o volume da MS próximo aos níveis do controle e a morfologia normal, mesmo observando uma discreta hipertrofia das células sinoviais, tendo em vista que essa modificação foi observada eventualmente e em raras seções, e que portanto não modificou o volume

significativamente quando comparado ao controle. Salienta-se ainda que o uso do óleo de copaíba *per si* não influencia o volume e a morfologia da MS.

5.3.4 Volume do espaço sinovial

O volume do espaço sinovial do grupo Artrítico foi, em média, 68% maior em relação aos demais grupos, demonstrando diferença estatística significativa (Fig. 18a). Os demais grupos não demonstraram diferença entre si.

Figura 18 - Volume e histomorfologia do espaço sinovial da articulação IFP



1. Gráfico demonstrando o volume do ES (em mm³) da articulação IFP da pata esquerda traseira de Balb/c após 96h da injeção SC de Zy ou salina, tratados ou não (de acordo com o grupo experimental) (a); Fotomicrografias representativas de seções histológicas das articulações demonstrando ES dos grupos Controle (b), que apresentou características morfológicas normais; Artrítico (b), com aumento do ES, osteólise (➔) e perda da cartilagem (➡); Diclo (d), Cop300 (e), Cop600 (f) e CCop (g), normais; Barra = 50 µm.

2. **Controle**, sem intervenções; **Artrítico**, artrítico não tratado; **Diclo**, artrítico tratado com diclofenaco a 100 mg/kg; **Cop300** e **Cop600**, artríticos tratados com óleo de copaíba a 300 mg/kg e 600 mg/kg, respectivamente; **CCop**, não artrítico, tratado com copaíba a 300 mg/kg. **CP**, cápsula articular; **CH**, cartilagem hialina. **ES**, espaço sinovial; **MS**, membrana sinovial; **OS**, osso; **CM**, cavidade medular; **ME**, músculo esquelético; **seta preta**, membrana sinovial; **seta amarela**, fibrina.

3. Diferença estatística quando $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***) e $P \leq 0,0001$ (****).

Ao realizar a análise morfológica observou-se que o grupo Artrítico apresentou perda da cartilagem, além de depressão óssea, acarretando o aumento de contagem de pontos no ES. Acerca dos demais grupos (Diclo, Cop300, Cop600 e CCop, apesar de ao exame microscópico o ES apresenta-se distinto, não foram estatisticamente significantes em relação ao grupo Controle.

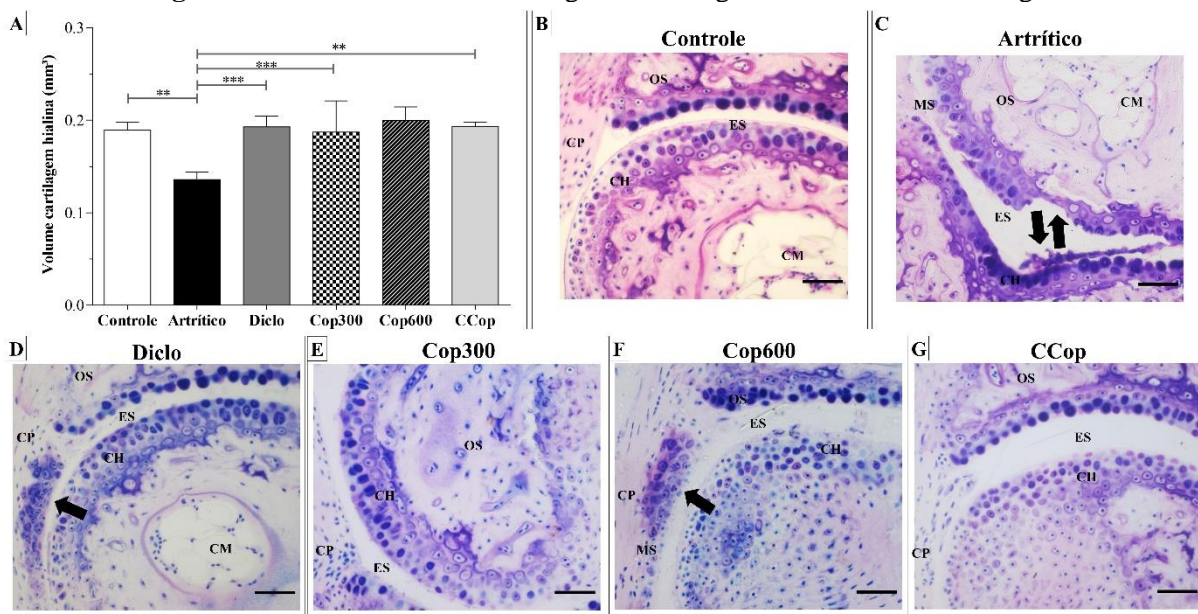
Destarte, o Zy promoveu o aumento do ES da articulação IFP de camundongos Balb/c após 96h da sua aplicação s.c. na pata esquerda traseira. Ao passo que, o diclofenaco e o óleo de copaíba (300 e 600 mg) preservaram-no, além de conservar sua morfologia normal, quando

administrado 30 minutos antes da injeção de Zy. Ainda, o óleo de copaíba administrado na ausência de um indutor não promoveu efeito sob o ES, mantendo-se semelhante ao grupo Controle.

5.3.5 Volume da cartilagem hialina

O volume da cartilagem hialina (CH) dos animais artríticos foi, em média, 29% menor em relação aos demais grupos, demonstrando diferença estatística significativa em relação a eles (Fig. 20a).

Figura 19 - Volume e histomorfologia da cartilagem hialina de camundongos



1. Gráfico demonstrando o volume da CH (em mm³) da articulação IFP da pata esquerda traseira de Balb/c após 96h da injeção s.c. de Zy ou salina, tratados ou não (de acordo com o grupo experimental) (a); Fotomicrografias representativas de seções histológicas das articulações demonstrando a CH (➔) dos grupos Controle (b), que apresentou características morfológicas normais; Artrítico (b), com perda de cartilagem (seta preta); Diclo (d), apresentando formação de cartilagem em substituição a MS (exostose) (seta amarela); Cop300 (e), normal; Cop600 (f), exostose (seta amarela) e CCop (g), normal; Barra = 50 μm.

2. **Controle**, sem intervenções; **Artrítico**, artrítico não tratado; **Diclo**, artrítico tratado com diclofenaco a 100 mg/kg; **Cop300** e **Cop600**, artríticos tratados com óleo de copaíba a 300 mg/kg e 600 mg/kg, respectivamente; **CCop**, não artrítico, tratado com copaíba a 300 mg/kg. **CP**, cápsula articular; **CH**, cartilagem hialina. **ES**, espaço sinovial; **MS**, membrana sinovial; **OS**, osso; **CM**, cavidade medular; **seta preta**, perda de cartilagem; **seta amarela**, exostose.

3. Diferença estatística quando $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***) e $P \leq 0,0001$ (****).

Os animais dos grupos Controle, Cop300, Cop600 e CCop apresentaram cartilagem hialina com características histológicas normais, em que o tecido cartilaginoso apresentou-se íntegro, composto por condrócitos diferenciados uni ou binucleados, ocupando as lacunas na matriz extracelular. Todavia, em algumas seções histológicas dos grupos artríticos tratados

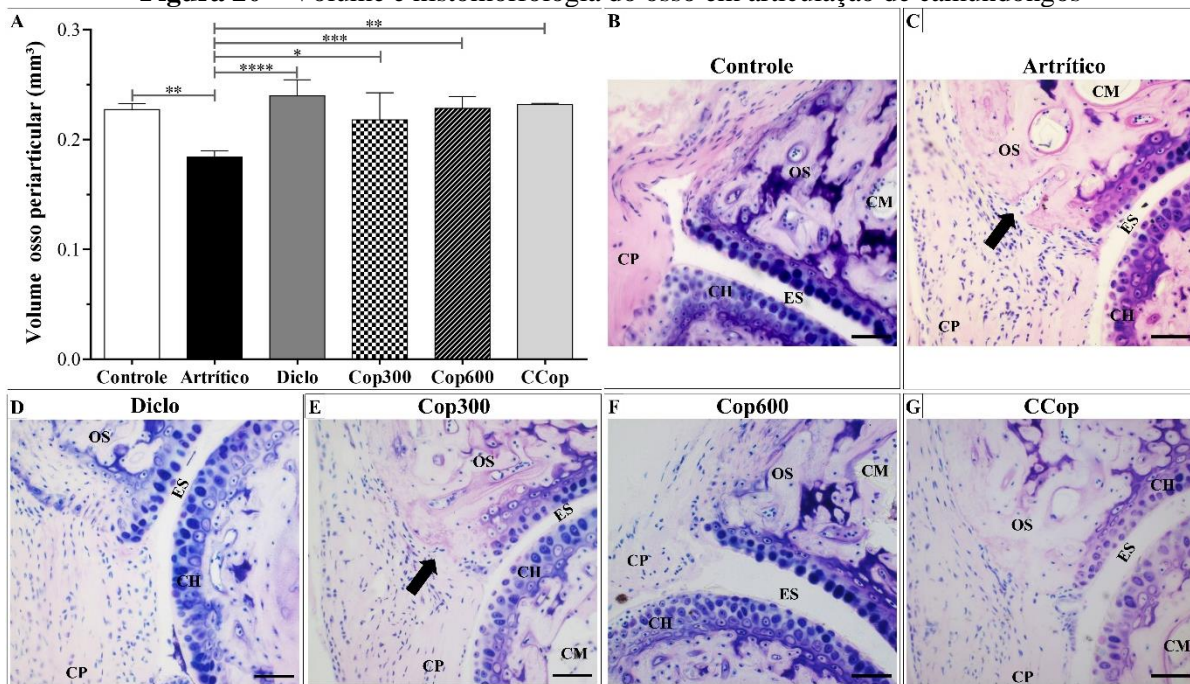
(Diclo, Cop300 e Cop600) foram proliferação de tecido cartilaginoso (20d e 20f) na camada sinovial, resultando no aumento da contagem de pontos e conseqüentemente do volume da cartilagem. Apesar desse achado histomorfológico, o volume da CH nesses grupos não foi diferente estatisticamente quando comparado ao Controle, o que pode ser atribuído ao fato dessa alteração não ter sido observada com frequência, estando presente em raras seções. No que tange o grupo Artrítico, em algumas seções observou-se uma obliteração entre a junção do osso e da cartilagem, tornando-a minada, erodida, destacada e finalmente perdida (Fig. 20c).

Do exposto, observou-se que o Zy quando aplicado por via s.c. na pata traseira de camundongos Balb/c promove alterações na CH, após 96h da sua aplicação, causando destruição da mesma, culminando na redução do volume do tecido cartilaginoso. No que se refere aos efeitos do diclofenaco e do óleo de copaíba, verificou-se a capacidade desses tratamentos em preservar a morfologia da CH, tendo em vista que o volume não foi significativamente diferente quando comparado ao grupo Controle. Contudo, observou-se uma tendência no aumento do tecido cartilaginoso nesse grupo. Ademais, o óleo de copaíba *per si* não exerce efeitos quantitativos ou qualitativos sobre a CH.

5.3.6 Volume do osso periarticular

O volume do tecido ósseo periarticular (OS) dos animais artríticos foi, em média, 20% menor em relação aos demais grupos, demonstrando diferença estatística significativa ($P < 0,05$) (Fig. 21a). Os demais grupos não foram diferentes entre si.

Figura 20 – Volume e histomorfologia do osso em articulação de camundongos



1. Gráfico demonstrando o volume do osso (em mm³) da articulação IFP da pata esquerda traseira de Balb/c após 96h da injeção s.c. de Zy ou salina, tratados ou não (de acordo com o grupo experimental) (a); Fotomicrografias representativas de seções histológicas das articulações demonstrando a histomorfologia do osso dos grupos Controle (b), que apresentou características morfológicas normais; Artrítico (b), com erosão óssea periarticular extensa e invasão sinovial (➔); Diclo (d), normal; Cop300 (e), com erosão óssea periarticular discreta (➔); Cop600 (f) e CCop (g), normais; Barra = 50 µm.

2. **Controle**, sem intervenções; **Artrítico**, artrítico não tratado; **Diclo**, artrítico tratado com diclofenaco a 100 mg/kg; **Cop300** e **Cop600**, artríticos tratados com óleo de copaíba a 300 mg/kg e 600 mg/kg, respectivamente; **CCop**, não artrítico, tratado com copaíba a 300 mg/kg. **CP**, cápsula articular; **CA**, cartilagem hialina. **ES**, espaço sinovial; **MS**, membrana sinovial; **OS**, osso; **CM**, cavidade medular; **seta preta**, erosão óssea.

3. Diferença estatística quando $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***) e $P \leq 0,0001$ (****).

Ao exame histológico, verificou-se que o grupo Artrítico apresentou áreas de perda óssea (osteólise) profunda na região periarticular à área afetada. Ainda, a área erodida do osso foi invadida por *pannus* inflamatório. Cabe destacar que em algumas seções histológicas do grupo artrítico tratado com copaíba a 300 mg/kg (Cop300) também foram observadas erosões ósseas, entretanto, estavam presentes em raras seções e de forma discreta quando comparadas ao grupo Artrítico (Fig. 21e), fato que resultou na redução do volume quando comparado o Controle, mas sem significância estatística (Fig. 21a). O grupo Controle e CCop apresentaram características morfológicas normais, em que o osso apresentou-se íntegro

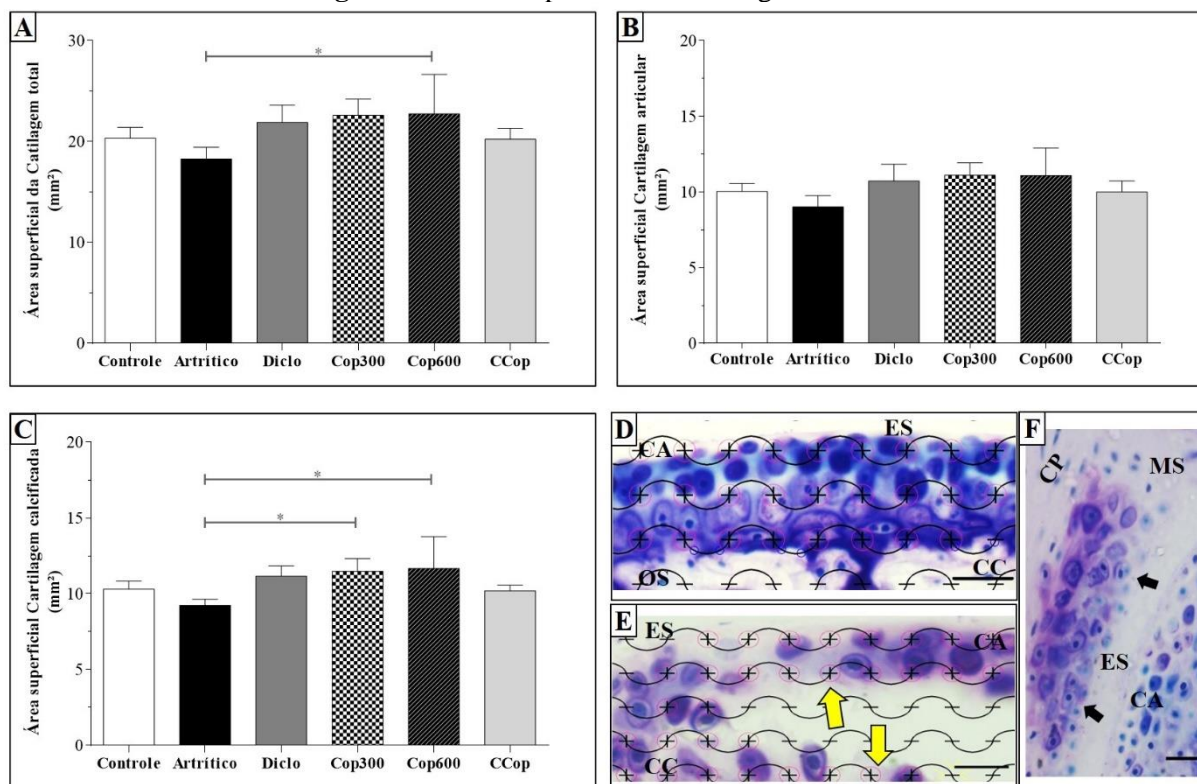
Diante do exposto, verificou-se que o Zy, quando aplicado s.c. na pata traseira promove a erosão do tecido ósseo periarticular em articulação IFP de camundongos Balb/c, após 96h da injeção, reduzindo o volume do OS. No que se refere ao efeito do óleo de copaíba, verifica-se que este foi parcialmente efetivo, tendo em vista que o grupo tratado na dose de 300 mg/kg apresentou erosão óssea, mesmo sendo considerada discreta e sem

significância estatística. Por outro lado, na concentração de 600 mg/kg o óleo de copaíba foi efetivo em preservar o volume e a morfologia o OS, pois apresentou níveis próximos ao grupo Controle e significativamente menor em relação ao Artrítico. Ainda, cita-se que o óleo de copaíba *per si* não foi capaz de alterar a morfologia e o volume da OS.

5.3.7 Área superficial da cartilagem hialina da articulação IFD

A área superficial da cartilagem hialina total da articulação IFP dos animais artríticos não tratados (Artrítico) foi, em média, 15% menor em relação aos demais grupos (Fig. 22), demonstrando diferença estatística significativa ($P < 0,05$) em relação ao Cop600.

Figura 21 - Área superficial da cartilagem hialina



1. Gráfico demonstrando a área superficial, em mm^2 , da cartilagem total (a), articular (b) e calcificada (c) em articulação de camundongos Balb/c após 96 horas da injeção s.c. de Zymosan ou salina, tratados ou não; Fotomicrografias representativas demonstrando seções histológicas da cartilagem com características morfológicas normais (d), com tecido cartilaginoso íntegro, sob grid de curvas para contagem de interseções e pontos; (e) cartilagem com alterações, com perda de tecido cartilaginoso (setas amarelas); Barras: $13\mu\text{m}$.; (e) osteogênese cartilaginosa em substituição a membrana sinovial (setas pretas) (barra: $20\mu\text{m}$).

2. **Controle**, sem intervenções; **Artrítico**, artrítico não tratado; **Diclo**, artrítico tratado com diclofenaco a 100 mg/kg; **Cop300** e **Cop600**, artríticos tratados com óleo de copaíba a 300 mg/kg e 600 mg/kg, respectivamente; **CCop**, não artrítico, tratado com copaíba a 300 mg/kg; **CP**, cápsula articular; **CA**, cartilagem articular; **CC**, cartilagem calcificada; **ES**, espaço sinovial; **MS**, membrana sinovial; **OS**, osso; **seta amarela**, cartilagem erodida.

3. Diferença estatística quando $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***) e $P \leq 0,0001$ (****).

Ao analisar as áreas articular e calcificada da cartilagem, verificou-se que a área da CA no grupo artrítico apresentou-se reduzida quando comparado aos demais, entretanto essa diferença não foi estatisticamente diferente (Fig. 22b). Já para CC, a diferença significativa foi observada em relação aos grupos Cop300 e Cop600, quando comparado ao grupo Artrítico, estando ambos 21% maior em relação ao Artrítico.

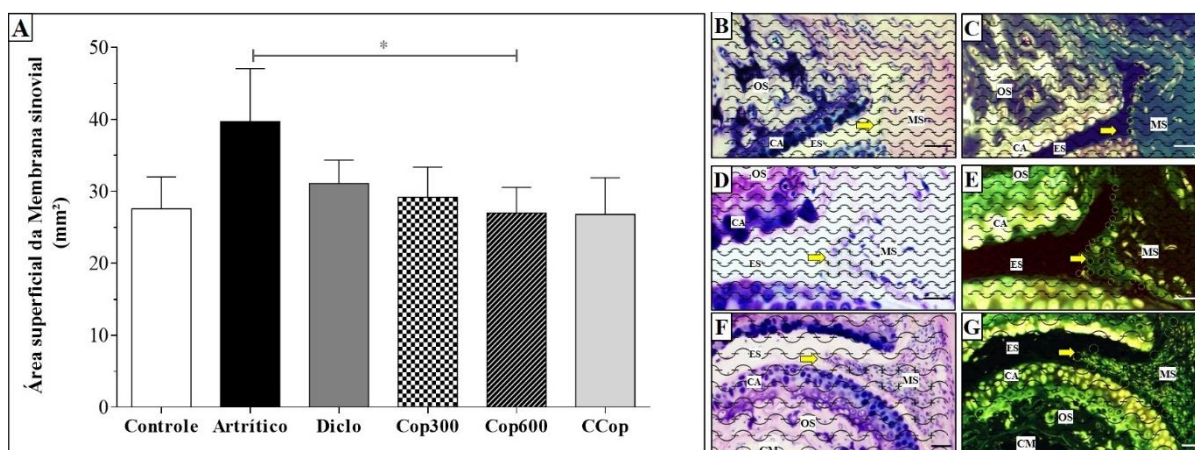
Ressalta-se que em algumas seções histológicas dos grupos artríticos tratados (Diclo, Cop300 e Cop600) observou-se a presença de tecido cartilaginoso em substituição a membrana sinovial (Fig. 22a), o que pode ter contribuído para uma contagem maior nesses grupos, quando comparado aos grupos controles (Controle e CCop), contudo essa diferença não apresentou significância estatística.

Em conjunto, os dados demonstraram que modelo de AZy, após 96 horas da aplicação s.c. em patas de camundongos, modificou a histomorfologia e a morfometria da cartilagem hialina da articulação sinovial em camundongos Balb/c, reduzindo a área superficial do tecido cartilaginoso, o que resultou da degradação e perda do mesmo. Sobre os efeitos do óleo de copaíba, constatou-se que este foi capaz de preservar a área da cartilagem, em ambas as doses utilizadas (300 e 600 mg/kg), que apesar de estar aumentada em relação ao controle, não foi considerado significativo estatisticamente.

5.3.8 Área superficial da membrana sinovial da articulação IFP

A área superficial da membrana sinovial da articulação IFP dos animais artríticos não tratados (Artrítico) foi, em média, 41% maior em relação aos demais grupos (Fig. 22), contudo a diferença foi apenas estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao Cop600.

Figura 22 - Área superficial da membrana sinovial



1. Gráfico demonstrando a área superficial, em mm², da membrana sinovial em articulação de camundongos Balb/c após 96 horas da injeção s.c. de Zymosan ou salina, tratados ou não (a). Fotomicrografias representativas demonstrando seções histológicas da MS sob grid de curvas para contagem de interseções e pontos do software Imod, vista normal e com recurso de inversão de cores (b-g), demonstrando MS (seta amarela) com características morfológicas normais (b-c); (d-e) com presença de células sinoviais hipertróficas (f-g); Barra: 20 µm; e hiperplásica e hipertrófica, invadindo o espaço sinovial (f-g) (barra: 40µm).

2. **Controle**, sem intervenções; **Artrítico**, artrítico não tratado; **Diclo**, artrítico tratado com diclofenaco a 100 mg/kg; **Cop300** e **Cop600**, artríticos tratados com óleo de copaíba a 300 mg/kg e 600 mg/kg, respectivamente; **CCop**, não artrítico, tratado com copaíba a 300 mg/kg; **CA**, cartilagem articular; **ES**, espaço sinovial; **MS**, membrana sinovial; **OS**, osso; **CM**, cavidade medular; **seta amarela**, membrana sinovial.

3. Diferença estatística quando $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***) e $P \leq 0,0001$ (****).

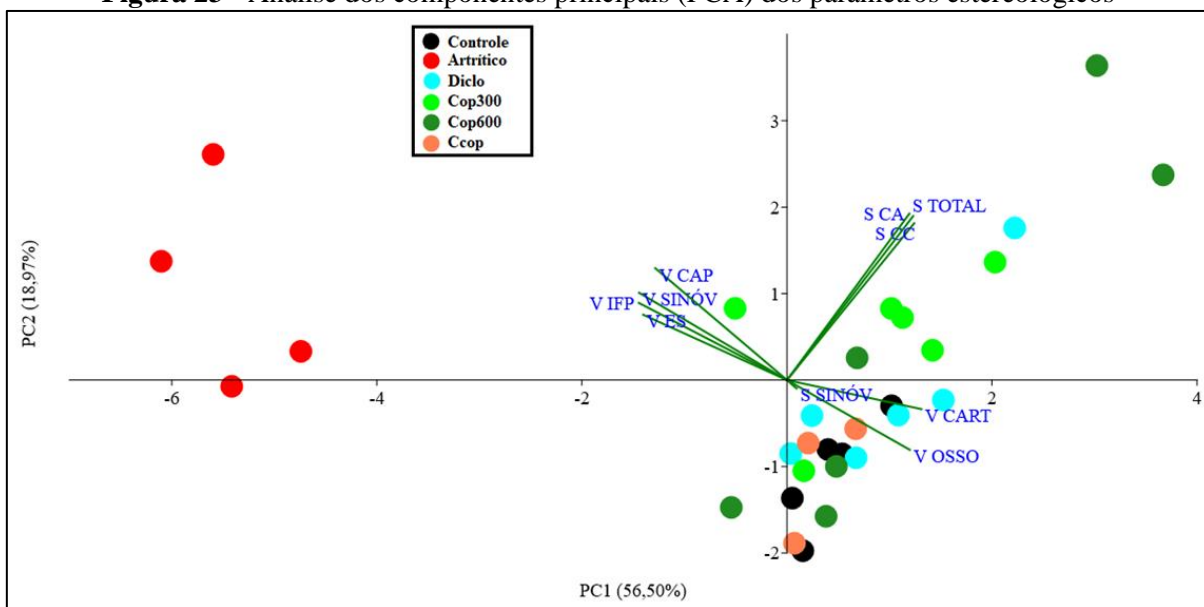
As seções histológicas dos grupos Controle apresentaram MS com superfície lisa, cujas células sinoviais em muitas seções eram praticamente imperceptíveis ao exame microscópico (Fig. 23b). Em contraste, o grupo Artrítico apresentou células sinoviais hiperplásicas, hipertróficas (Fig. 23 d-) e com infiltrado de células imunes, o que contribuiu com o aumento da contagem da área superficial. Os demais grupos, apresentaram em algumas seções discreta proliferação de células sinoviais, que por vezes apresentavam-se hipertróficas (Fig. 23d-e), entretanto essa diferença não foi significativa estatisticamente quando comparado ao Controle.

Diante dos dados apresentados, verificou-se que aplicação s.c. de Zy na pata esquerda de camundongos foi capaz de estimular a proliferação e hipertrofia de células sinoviais, contribuindo para o aumento da área superficial, após 96 h da injeção Zy. Em relação aos efeitos do Óleo de copaíba, este foi eficaz em conter a proliferação de células sinoviais, principalmente na concentração de 600 mg/kg, preservando a área superficial, que ficou próxima aos níveis do grupo Controle. Em adição, destaca-se que o óleo de copaíba quando administrado na ausência de um indutor de inflamação, não apresenta efeitos sob a área superficial da MS, tendo em vista que os valores ficaram próximos aos apresentados pelo grupo Controle.

5.4 Análise dos componentes principais (PCA)

As variáveis morfológicas do presente estudo foram analisadas de forma multivariada (PCA, *Principal Component Analysis*), para o qual foram usados os dados estereológicos obtidos para todos os tratamentos, o qual demonstrou que os componentes PC1 (56,50%) e PC2 (18,97%) juntos representaram > 75% da variância total nos dados originais (Fig. 24).

Figura 23 - Análise dos componentes principais (PCA) dos parâmetros estereológicos



1. V IFF = volume da articulação IFP, V SINÓV = volume da membrana sinovial, V ES = volume do espaço sinovial, V CAP = volume da cápsula, V CART = volume cartilagem, V OSSO = volume osso, S CA = área superficial da cartilagem articular, S CC = área superficial da cartilagem calcificada, S TOTAL = área superficial total da cartilagem.

Como uma proporção significativa da variância foi contabilizada pelos componentes PC1 e PC2, os demais componentes principais não foram interpretados neste estudo. Os animais artríticos mostraram distanciamento dos demais tratamentos, indicando que o Zy afeta a morfologia quantitativa da articulação IFP. Os tratamentos Controle, Diclo, Cop300, Cop600 e Ccop mantiveram uma agregação (com exceção de dois animais de Cop600 que se distanciaram do grupo). Esse fato indica similaridades entre esses tratamentos. Em relação a PC1, os animais Controle, Diclo e aqueles que foram tratados com copaíba apresentaram correlações positivas sobre os parâmetros “volume da cartilagem (V CART) do osso (V OSSO) e fortes correlações negativas entre volume da articulação IFP (V IFF), da membrana sinovial (V SINÓV), do espaço sinovial (V ES) e da cápsula articular (V CAP). Ainda, o volume da cartilagem (V CART) e do osso (V OSSO) são inversamente correlacionados com V IFF, V SINÓV, V ES e V CAP. Os dados para área superficial da cartilagem apresentaram

fortes correlações positivas entre os animais tratados com copaíba e diclofenaco, indicando que tais terapias são eficientes na preservação das superfícies cartilaginosas em contato com o espaço sinovial (S CA) e osso (S CC). Não detectamos correlação entre as áreas superficiais da cartilagem (S CA, S CC e S TOTAL) e V IFP, V SINÓV, V ES e V CAP. A PC2 foi caracterizada pelos valores positivos para V CAP, V SINÓV, V IFP e V ES que direcionavam seus vetores em direção aos animais artríticos.

6. DISCUSSÃO

A artrite induzida por Zymosan (AZy) compartilha muitas características comuns com a AR clínica, que incluem manifestações sistêmicas inespecíficas, como a perda de peso e inchaço de uma ou mais articulações (CAPLAZI et al., 2015; GUIDELINES, 2002; WEINBLATT; KURITZKY, 2007) e alterações histopatológicas que incluem sinovite grave e erosiva (GEGOUT et al., 1994; KEYSTONE et al., 1977; SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010).

O modelo experimental utilizado no presente estudo é descrito como um modelo de artrite aguda, capaz de desenvolver uma reação inflamatória intensa, cujo pico ocorre após 6 horas da inoculação, caracterizado por aumento da permeabilidade vascular e migração celular, resultando em edema articular (PENIDO et al., 2006), que se desenvolve até o 3º dia (KEYSTONE et al., 1977), seguindo por sinovite progressiva, com infiltração de células mononucleares e reação de fibroblastos, semelhante à sinovite reumatoide crônica (GEGOUT et al., 1994).

No presente estudo, os animais submetidos à AZy apresentaram manifestações inespecíficas, como a perda de peso e manifestações inflamatórias iniciais, evidenciado por inchaço (edema) de pata, que elevou-se logo nas primeiras horas pós-injeção, atingiu um pico às 6h e teve o seu nível gradativamente reduzido até as 96h, tempo final do estudo. Corroborando com esses dados, Conte et al. (2008) e Penido et al. (2006) demonstraram que a administração de Zy em articulação de joelho aumenta a espessura da articulação e induz a migração de neutrófilos para o espaço sinovial em 6 h e 24 h. Ainda, dados publicados por Guazelli et al. (2018) também corroboram, em que demonstraram que os animais que receberam injeção de Zy apresentaram inchaço significativamente maior entre 5 e 7 h da indução.

O aumento do volume ou inchaço das articulações sinoviais é a principal característica clínica da AR (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016) e, como citado anteriormente, também é uma característica comum da artrite experimental (BASSI et al., 2016; GEGOUT et al., 1994; KEYSTONE et al., 1977), que pode ser devido a vários eventos, incluindo efusão de líquido sinovial, espessamento da membrana sinovial e cápsula fibrosa, podendo estar relacionado ao edema ou fibrose, inchaço dos tecidos periarticulares ou aumento ósseo (MCILWRAITH, 2001). A natureza específica deste inchaço também depende do estágio da doença (agudo ou crônico), sensibilidade (localizada ou difusa), entre outras (SMOLEN et al., 2018). Em nosso estudo, foram observados no grupo artrítico não tratados aumentos do

volume da articulação IFP, da cápsula articular, espaço e membrana sinovial, evidenciados pela análise de PCA, onde os autovalores positivos foram encontrados para este grupo.

Quanto aos efeitos do óleo de copaíba nas reações inflamatórias iniciais da artrite, o tratamento foi considerado efetivo nos momentos iniciais do processo inflamatório, uma vez que ambas as concentrações utilizadas (300 e 600 mg/kg) foram capazes de reduzir o edema durante nas primeiras horas (1h e 3h), em que verificou-se que o óleo de copaíba desempenhou os mesmos efeitos do tratamento padrão (diclofenaco). Contudo, nos tempos seguintes (6h, 24h, 48 e 72h) apesar óleo de copaíba ter contido o inchaço, não foi tão eficiente quando comparado ao Diclo. E às 96h observou-se que novamente o óleo de copaíba foi igual ao diclo, entretanto, apenas na concentração de 600 mg/kg. Dados publicados por Castro Ghizoni et al. (2017) corroboram com os achados no presente estudo, que ao analisar a ação da copaíba sobre a inflamação sistêmica em ratos com artrite induzida por carragenina, verificou o seu efeito antiedematogênico, ao qual também fora atribuída à maior dose utilizada, sendo a menor sem efeito significativo sobre o edema. Em adição, pode-se inferir que a copaíba na concentração de 300mg/kg, quando administrado na ausência de um indutor de artrite, não desempenha efeito edematogênico, tendo em vista que o grupo sem intervenção, que recebeu apenas copaíba (CCop) não apresentou diferença significativa na cinética do edema, quando comparado ao grupo controle.

Assim, os dados aqui apresentados corroboram com os descritos na literatura, que indicam que a inflamação induzida por Zy é um modelo importante para entender os mecanismos de inflamação e a descoberta de novas moléculas anti-inflamatórias e analgésicos, tendo em vista seus efeitos edematogênicos. Além disso, a ação do óleo de copaíba sobre os efeitos iniciais da inflamação (edema) também é sustentada. Contudo, a concentração e o número de doses devem ser considerados para potencializar a contenção do inchaço.

No presente estudo, todos os animais apresentaram perda de peso, entretanto a perda foi significativamente maior nos animais artríticos não tratados (Artríticos) e os tratados com óleo de copaíba a 600 mg/kg (Cop600). Embora seja considerada uma manifestação inespecífica, a perda de peso é frequentemente avaliada em estudos sobre AR clínica e experimental (BENDELE, 2001; CASTAÑEDA-LOPEZ et al., 2018; RAMOS et al., 2005; SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010). Dados publicados por Shealy et al. (2002) corroboram com essa a informação, que ao inibir os sinais da artrite (em níveis macroscópico e histológico) em camundongos transgênicos induzidos à artrite experimental, pelo uso de

anticorpo monoclonal contra TNF (anti-TNF), observou que os animais não apresentaram perda de peso mesmo após as 10 semanas de experimentação.

A sinalização inflamatória em resposta ao Zy requer a ativação do NF- κ B, um regulador fundamental na expressão de muitas citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6, e quimiocinas (p.ex., CXCL-1/KC) (UNDERHILL, 2003), sendo detectadas no início do processo inflamatório em modelos murinos (AJUEBOR et al., 1999). Ainda, estudos anteriores demonstraram que TNF- α , IL-1, IL-6 e CINC (um membro da família de quimiocinas α -CXC em ratos) foram produzidos sequencialmente durante os estágios iniciais da pleurisia induzida por Zy em ratos (UTSUNOMIYA; ITO; OH-ISHI, 1998). A injeção intra-torácia de Zy em camundongos também levou a produção de IL-6 e CXCL-1/ KC 4 h após (ROSAS et al., 2015a).

Em conjunto, infere-se que o processo inflamatório induzido pela aplicação s.c. de Zy estimulou a perda de peso, principalmente em grupos não tratados e que o diclofenaco e o óleo de copaíba na concentração de 300 mg/kg preservaram o peso, mantendo-os próximos ao grupo Controle. Já a copaíba a 600 mg/kg não apresentou a mesma capacidade de preservação do peso, em que as perdas foram semelhantes ao grupo artrítico não tratado. Em consonância com esses resultados, Castro Ghizoni et al. (2017) também relatou menor peso nos grupos artríticos tratados com a dose superior de óleo de copaíba, quando comparado ao demais, inferindo que a perda de peso parece indicar uma ação prejudicial do óleo na dose testada.

Vale ressaltar que nenhum dos modelos de artrite experimental disponíveis satisfazem plenamente todas os requisitos para serem considerados ideais (OLIVER; BRAHN, 1996), embora todos se aproximem razoavelmente do objetivo pretendido. Entre as dificuldades relatadas, citam-se a incerteza em se precisar o início da artrite *per se* e demonstrar relevância na fisiopatologia da AR (SILVA JÚNIOR; ROCHA, 2006). Apesar das dificuldades, as alterações que ocorrem nas articulações de modelos animais induzidos à artrite experimental são consideradas estereotipadas, independentemente do modelo adotado (CAPLAZI et al., 2015), sendo caracterizadas por edema periarticular, exsudato i.a., infiltração de células imunes (predominantemente neutrofílica) no espaço sinovial e na cavidade medular próxima as articulações artríticas, destruição da cartilagem e remodelação óssea (BOLON et al., 2010; CAPLAZI et al., 2015). No presente estudo, algumas dessas alterações foram evidenciadas no presente estudo, das quais citam-se o aumento da espessura da pata, alterações no volume da articulação e dos seus componentes e modificações histomorfológicas.

As articulações envolvidas na AR clínica são bastante específicas e distintas das articulações envolvidas em outras artropatias, incluindo as articulações metacarpofalângicas,

interfalângica proximal das mãos e dos pés, do pulso, do tornozelo, do cotovelo, do ombro, do joelho e do quadril (SMOLEN et al., 1995). Em modelos animais é comum o estudo da artrite experimental por inoculação de um indutor em articulação do joelho. Mais especificamente, sobre a AZy, a maioria dos estudos são realizadas por injeção de uma suspensão de Zy em salina, em modelos murinos (ratos e camundongos), com concentrações que variam de 10 µg a 2 mg por cavidade/articulação, sendo mais comumente injetada por via i.a. na articulação femorotibial em joelhos (BASSI et al., 2016; CARDOSO et al., 2010; CONTE et al., 2008; GUAZELLI et al., 2018; GUERRA et al., 2016b; HASHIMOTO et al., 2018; KEYSTONE et al., 1977; PAIVA et al., 2011b; PENIDO et al., 2006). Poucos estudos têm relatado a injeção de Zy por via s.c. na região plantar média da pata traseira (JI et al., 2014; MELLER; GEBHART, 1997), principalmente sobre o aspecto em promover modificações histomorfológicas e morfométricas de pequenas articulações, tais como as metatarsais e interfalangeanas, bem como a abordagem terapêutica para tais alterações.

Nesse contexto, o presente estudo demonstrou que a aplicação s.c. de Zy a 500µg na região plantar da pata traseira desenvolveu alterações histomorfológicas e morfométricas nas articulações IFP de camundongos Balb/c, evidenciadas por alterações histológicas clássicas da articulação artrítica em modelo animal (CAPLAZI et al., 2015), entre estas destacam-se as modificações na membrana sinovial, considerada a alteração-chave da doença, cujos componentes básicos da histopatologia foram bastante evidentes, em que os sinoviócitos tornaram-se hipertróficos e hiperplásicos, com invasão do espaço sinovial, presença de infiltrado inflamatório, composto por células imunes, formando o *pannus* inflamatório.

As características histológicas compatíveis com a AR humana, pode ser dividida em dois grupos: (a) hiperplasia da membrana sinovial e infiltração de polimorfonucleares e linfócitos no espaço sinovial, evidentes em todos os estágios da doença; e (b) formação de pannus, destruição da cartilagem e fibrose, as quais são observadas no estágio avançado da doença (AMAYA-AMAYA et al., 2013; CAPLAZI et al., 2015; SMOLEN et al., 2018).

Um fator crítico que contribui para o dano articular é a produção excessiva de mediadores inflamatórios por células inflamatórias residentes ou infiltrantes. Citocinas (TNF- α e IL-1 β) e eicosanóides (leucotrienos e prostaglandinas) estão envolvidos na patogênese da artrite e participam da dor, acúmulo de neutrófilos e dano tecidual (BRENNAN; MCINNES, 2008; GUERRERO et al., 2008). Nesse sentido, Pinto et al. (2010) demonstraram a importância da IL-17 na artrite experimental, em que a citocina foi detectada durante o acúmulo de neutrófilos e degradação da cartilagem e nos sintomas de hiperalgesia. O recrutamento de neutrófilos tem sido demonstrado como um agente que contribui para a

produção local de citocinas e danos articulares, demonstrando ser importante na patogênese da artrite humana (WRIGHT; MOOTS; EDWARDS, 2014). Ainda, uma variedade de outras células são descritas por desempenhar participação fundamental na perpetuação do processo inflamatório articular, como macrófagos, sinoviócitos, linfócitos e mastócitos (MCINNES; SCHETT, 2011).

De acordo com Caplazi et al. (2015), a lesão da cartilagem ocorre regularmente nas articulações mais gravemente afetadas e dependendo da duração das lesões, a gravidade varia desde a erosão superficial até a perda segmentar ou completa, que podem progredir para o amadurecimento da lesão resultando em anquilose parcial ou completa. Por vezes, também pode ocorrer a fusão osteocartilaginosa, resultando em exostose cartilaginosa ou óssea. No presente estudo, os animais artríticos não tratados demonstraram comprometimento da cartilagem, que variaram entre perda óssea (osteólise) e exostose, evidenciada por alterações histológicas e redução no volume e área superficial.

A osteólise na região periarticular à área afetada é um dos efeitos primários característicos da artrite (EGGELMEIJER et al., 1993). Além da perda óssea, outra alteração que envolve a sua remodelação inclui a osteogênese, com neoformação óssea predominantemente periosteal, incluindo a formação de exostoses cartilaginosa ou óssea (CABRAL; LOYA; ALARCON-SEGOVIA, 1989; CAPLAZI et al., 2015), a qual também foi encontrada no presente estudo. A remodelação óssea começa muito cedo na progressão das lesões (JOOSTEN et al., 2006), tipicamente coincidindo com a proliferação de células fusiformes e lesão da cartilagem precedente. Embora a perda óssea profunda seja um efeito primário da AR (EGGELMEIJER et al., 1993), durante períodos mais longo ocorre formação óssea, que podem incluir fusão articular ou formação de osteófito periarticular (CABRAL; LOYA; ALARCON-SEGOVIA, 1989). Ambos os eventos podem afetar a capacidade funcional, pois a reabsorção pode levar ao colapso do osso subcondral ou, ainda fratura patológica grosseira, enquanto a formação limita fisicamente o movimento da articulação. Entretanto, apesar da formação óssea limitar o movimento, a remodelação óssea na fase inicial da artrite é mais frequentemente relacionada a uma resposta reparadora à doença, não parte de sua patogênese (ALLARD; BAYLISS; MAINI, 1990).

Nesse contexto, o presente estudo demonstrou que o modelo de AZy, quando analisado por ferramentas estereológicas evidencia as alterações clássicas, como demonstrado pelo aumento do volume da articulação IFP, da cápsula articular, da membrana e espaço sinovial e redução da cartilagem hialina e osso periarticular. Cabe destacar, que as alterações morfométricas foram condizentes com o exame histomorfológicos, como por exemplo, o

aumento do volume e área superficial da MS, que ao exame microscópico demonstrou evidente hiperplasia e hipertrofia das células sinoviais, com infiltração do espaço. Ainda, alterações na remodelação óssea, sendo observadas várias áreas de erosão, principalmente no grupo artrítico não tratado, o que refletiu no menor volume do osso quando comparado ao Controle.

Mediante ao exposto, pode-se inferir que o Zy, quando aplicado por via s.c. na pata de camundongos Balb/c, promove alterações clássicas da artrite logo nas primeiras horas após a inoculação, que incluem edema de pata e modificações histomorfológicas e morfométricas, este último evidenciado por ferramentas da estereologia. Ainda, vale ressaltar que o presente estudo evidenciou que a AZy de fato compartilha muitas características comum com a AR clínica, sendo, portanto, um modelo eficiente para o seu estudo.

Quanto aos efeitos do óleo de copaíba sobre as alterações histomorfológicas, o tratamento foi efetivo, demonstrando preservação das características morfológicas, morfométricas (volume e área superficial) da articulação, da cápsula articular, da membrana e espaço sinovial, cartilagem hialina e osso periarticular. Contudo, também foram observadas alterações, como a formação de tecido cartilaginoso em substituição a MS, que pode refletir uma formação osteocartilaginosa, que pode estar envolvida no processo fisiopatológico ou uma resposta de reparação tecidual e fase de regressão do processo inflamatório, como descrito em estudos anteriores.

Vários óleos essenciais demonstraram atividade promissora em modelos animais de artrite, bem como outras condições inflamatórias das mãos e dedos em humanos (EFTEKHARSADAT et al., 2018; KOMEH-NKRUMAH et al., 2012). No entanto, o óleo de copaíba é especialmente promissor por causa de seu constituinte químico primário o beta-cariofileno (BCP), cujo efeitos anti-inflamatórios tem sido extensivamente analisado e que no presente estudo correspondeu a 40,7% da sua composição.

Sobre os mecanismos, o BCP é um conhecido agonista do receptor 2 de canabinóide (CB 2) (GERTSCH et al., 2008), que por sua vez é caracterizado por apresentar ação anti-inflamatória única (TURCOTTE et al., 2016). Sustentando esse dado, Andrade-Silva et al. (2016), demonstraram que em camundongos com inflamação induzida por micobactérias, o BCP reduziu a inflamação ao impedir a migração de neutrófilos, sendo este efeito atribuído à ação do BCP no CB 2. Em um estudo diferente empregando um modelo artrite em rato, o BCP diminuiu as pontuações do índice artrítico em cerca de duas vezes (VIJAYALAXMI et al., 2015). Outros estudos em animais também demonstraram as propriedades anti-artríticas do BCP (AGARWAL; RANGARI, 2003; PAUL et al., 2016).

A análise de PCA mostrou que há diferença entre o grupo artrítico e os demais grupos, indicando que a terapia com o óleo de copaíba tem sua eficácia comprovada na preservação de várias estruturais da articulação. Essa informação é relevante e deve servir de base para futuros estudos que visem ampliar o presente protocolo buscando testar novas dosagens da copaíba ou mesmo diferentes formulações desse composto.

Em resumo, o presente estudo demonstrou que o modelo de artrite induzida por Zy, por meio de injeção s.c. em pata foi capaz de desenvolver alterações inflamatórias compatíveis com articulações artríticas. Ainda, que o óleo de copaíba apresenta efeitos anti-inflamatórios, conservando modificações inflamatórias iniciais, como o edema, até alterações histomorfológicas e morfométricas. Contudo, a dose e concentração devem ser revistas, para obter melhores resultados. Ainda, os efeitos tóxicos relativos à dose devem ser mais extensivamente analisados, tendo em vista que a perda de peso foi significativa nos grupos tratados com a maior dose do óleo de copaíba.

7. CONCLUSÃO

- ✓ Poucos estudos têm avaliado o efeito e o mecanismo do óleo de copaíba sobre a morfologia da articulação artrítica.
- ✓ O modelo agudo de AZy é eficaz em promover um rápido efeito edematogênico, promovendo inchaço logo nas primeiras horas, atingindo um pico às 6 horas, e retomando as níveis basais em torno das 96 h.
- ✓ Os principais achados histopatológicos na articulação de animais AZy foram hiperplasia e hipertrofia sinovial, com invasão do espaço sinovial, espaçamento da cápsula articular, deterioração da cartilagem e osteólise.
- ✓ A estereologia é uma ferramenta que garante dados precisos e acurados na avaliação das alterações nas articulações artríticas, sendo detectados alterações no volume da articulação IFP e dos componentes (cartilagem, osso periarticular, membrana sinovial e espaço sinovial).
- ✓ O óleo de copaíba é eficaz em conter o edema articular, principalmente nas primeiras horas e preservar a morfologia e a morfometria da articulação IFP e, ainda, promover uma resposta reparadora, por produção de tecido cartilaginoso.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2008.
- AGARWAL, R. B.; RANGARI, V. D. Phytochemical investigation and evaluation of anti-inflammatory and anti-arthritis activities of essential oil of *Strobilanthes ixiocephala* Benth. 2003.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Consultas - Arpynflan**. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351594570201236/>>. Acesso em: 4 nov. 2017.
- AI, R. et al. DNA methylome signature in synoviocytes from patients with early rheumatoid arthritis compared to synoviocytes from patients with longstanding rheumatoid arthritis. **Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)**, v. 67, n. 7, p. 1978–1980, 2015.
- AJUEBOR, M. N. et al. Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 3, p. 1685–1691, 1999.
- AL-KHAMEES, W. A. et al. **Status Epilepticus Associated with Borage Oil Ingestion** **Journal of Medical Toxicology**, 2011.
- AL-OKBI, S. Y. Nutraceuticals of anti-inflammatory activity as complementary therapy for rheumatoid arthritis. **Toxicology and Industrial Health**, v. 30, n. 8, p. 738–749, 2014.
- ALAMANOS, Y.; VOULGARI, P. V.; DROSOS, A. A. Incidence and Prevalence of Rheumatoid Arthritis, Based on the 1987 American College of Rheumatology Criteria: A Systematic Review. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 36, n. 3, p. 182–188, 1 dez. 2006.
- ALETAHA, D.; ALASTI, F.; SMOLEN, J. S. Rheumatoid factor, not antibodies against citrullinated proteins, is associated with baseline disease activity in rheumatoid arthritis clinical trials. **Arthritis research & therapy**, v. 17, n. 1, p. 229, 2015.
- ALLARD, S. A.; BAYLISS, M. T.; MAINI, R. N. The synovium-cartilage junction of the normal human knee: implications for joint destruction and repair. **Arthritis & Rheumatism**, v. 33, n. 8, p. 1170–1179, 1990.
- ALVES, J. M. et al. Copaifera multijuga oleoresin and its constituent diterpene (–)-copalic acid: Genotoxicity and chemoprevention study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 819, p. 26–30, 1 jul. 2017.
- AMAYA-AMAYA, J. et al. Rheumatoid arthritis. 18 jul. 2013.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. **AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition**. 2020. ed. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association (AVMA), 2020.
- AMES-SIBIN, A. P. et al. β -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 12, p. 10262–10277, dez. 2018.
- AMILIA DESTRYANA, R. et al. Antioxidant and Anti-inflammation Activities of Ocotea, Copaiba and Blue Cypress Essential Oils in Vitro and in Vivo. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 9, p. 1531–1542, 5 set. 2014.
- AMMON, H. P. T. **Boswellic acids in chronic inflammatory diseases** **Planta Medica**, 2006.
- ANDERSEN, M. L. et al. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. [s.l.] Departamento de Psicobiologia. Escola Paulista de Medicina. Universidade ..., 2004.
- ARAB, H. H.; EL-SAWALHI, M. M. Carvedilol alleviates adjuvant-induced arthritis and subcutaneous air pouch edema: modulation of oxidative stress and inflammatory mediators. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 268, n. 2, p. 241–248, 2013.
- AREND, W. P.; FIRESTEIN, G. S. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 10, p. 573, 2012.
- ARNOLD, E. et al. Inhibition of Cytosolic Phospholipase A₂ (cPLA₂) by Medicinal Plants in Relation to Their Phenolic Content. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 8, p. 15033–48, 2015.
- ASADI-SAMANI, M.; BAHMANI, M.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. The chemical composition, botanical characteristic and biological activities of *Borago officinalis*: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical**

Medicine, v. 7, n. S1, p. S22–S28, 2014.

ASQUITH, D. L. et al. Animal models of rheumatoid arthritis. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 8, p. 2040–2044, 11 ago. 2009.

AZZA, Z.; OUDGHIRI, M. In vivo anti-inflammatory and antiarthritic activities of aqueous extracts from *Thymelaea hirsuta*. **Pharmacognosy research**, v. 7, n. 2, p. 213, 2015.

BADDELEY, A. J.; GUNDERSEN, H.-J. G.; CRUZ-ORIVE, L. M. Estimation of surface area from vertical sections. **Journal of microscopy**, v. 142, n. 3, p. 259–276, 1986.

BAETEN, D. et al. Macrophages expressing the scavenger receptor CD163: A link between immune alterations of the gut and synovial inflammation in spondyloarthritis. **Journal of Pathology**, v. 196, n. 3, p. 343–350, 1 mar. 2002.

BARLAND, P.; NOVIKOFF, A. B.; HAMERMAN, D. Electron microscopy of the human synovial membrane. **The Journal of cell biology**, v. 14, n. 2, p. 207–220, 1962.

BARTOK, B.; FIRESTEIN, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. **Immunological Reviews**, v. 233, n. 1, p. 233–255, jan. 2010.

BASILE, A. C. et al. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *copaifera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 1, p. 101–109, 1988.

BASSI, G. S. et al. Spinal GABA-B receptor modulates neutrophil recruitment to the knee joint in zymosan-induced arthritis. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 389, n. 8, p. 851–861, 2016.

BENDELE, A. et al. Animal Models of Arthritis: Relevance to Human Disease. **Toxicologic Pathology**, v. 27, n. 1, p. 134–142, 2 jan. 1999.

BENDELE, A. Animal models of rheumatoid arthritis. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 1, n. 4, p. 377–85, jun. 2001.

BENTO, A. F. et al. β -Caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPAR γ pathway. **The American journal of pathology**, v. 178, n. 3, p. 1153–1166, 2011.

BERMAN, A. Y. et al. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. **npj Precision Oncology**, v. 1, n. 1, p. 35, 2017.

BERTAZZOLO, N. et al. Interrelationships between interleukin (IL)-1, IL-6 and IL-8 in synovial fluid of various arthropathies. **Agents and Actions**, v. 41, n. 1–2, p. 90–92, mar. 1994.

BHATTARAM, P.; CHANDRASEKHARAN, U. The joint synovium: A critical determinant of articular cartilage fate in inflammatory joint diseases. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 62, p. 86–93, 1 fev. 2017.

BIEGERT, C. et al. Efficacy and safety of willow bark extract in the treatment of osteoarthritis and rheumatoid arthritis: results of 2 randomized double-blind controlled trials. **The Journal of rheumatology**, v. 31, n. 11, p. 2121–2130, 2004.

BOLON, B. et al. Rodent preclinical models for developing novel antiarthritic molecules: comparative biology and preferred methods for evaluating efficacy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, 2010.

BONATERRA, G. A. et al. Anti-inflammatory effects of the willow bark extract STW 33-I (Proaktiv®) in LPS-activated human monocytes and differentiated macrophages. **Phytomedicine**, v. 17, n. 14, p. 1106–1113, 2010.

BOTTINI, N.; FIRESTEIN, G. S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, n. 1, p. 24–33, 13 jan. 2013.

BRACHT, A. et al. Oxidative changes in the blood and serum albumin differentiate rats with monoarthritis and polyarthritis. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 36, 15 dez. 2016.

BRACHT, L. et al. Effects of simvastatin, atorvastatin, ezetimibe, and ezetimibe+ simvastatin combination on the inflammatory process and on the liver metabolic changes of arthritic rats. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 26, n. 6, p. 722–734, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, I. E. C. **Resolução Normativa nº37 - Diretriz para prática de eutanásia do CONCEA. Diário Oficial da União (DOU)** Brasília-DF, 22 fev. 2018. Disponível em: <<https://www.ceua.ufv.br/wp-content/uploads/2018/03/DIRETRIZ-DA-PRATICA-DE-EUTANASIA-DO-CONCEA-ATUALIZADA1.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 2021

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2014.** Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/ODAF/RENAME2014ed2015.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2018.** Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<http://portalquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/novembro/23/17-0407M-RENAME-2018.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2019.

BRASIL. **Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e dá outras providências.** Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm>. Acesso em: 28 fev. 2019.

BRASIL; MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, I. E C.; CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: fascículo 2: roedores e lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica [recurso eletrônico].** 1º ed. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, 2019. v. 2

BRAUN, J.; RAU, R. An update on methotrexate. **Current opinion in rheumatology**, v. 21, n. 3, p. 216–223, 2009.

BRENNAN, F. M.; MCINNES, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 11, p. 3537–3545, 2008.

BRENNAN, F. R. et al. CD44 expression by leucocytes in rheumatoid arthritis and modulation by specific antibody: Implications for lymphocyte adhesion to endothelial cells and synoviocytes in vitro. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 45, n. 2, p. 213–220, 1 fev. 1997.

BURGER, J. A. et al. Fibroblast-like synoviocytes support B-cell pseudoemperipolesis via a stromal cell-derived factor-1- and CD106 (VCAM-1)-dependent mechanism. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 3, p. 305–315, 1 fev. 2001.

CABRAL, A. R.; LOYA, B. L.; ALARCON-SEGOVIA, D. Bone remodeling and osteophyte formation after remission of rheumatoid arthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 16, n. 11, p. 1421–1427, 1989.

CALLEJA, M. A. et al. The antioxidant effect of β -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 3, p. 394–401, 2013.

CAMERON, M.; GAGNIER, J. J.; CHRUBASIK, S. Herbal therapy for treating rheumatoid arthritis. **Cochrane database of systematic reviews (Online)**, n. 2, p. CD002948, 2011.

CAPLAZI, P. et al. Mouse Models of Rheumatoid Arthritis. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 5, p. 819–826, 10 set. 2015.

CARDOSO, M. et al. Assessment of Zymosan-Induced Leukocyte Influx in a Rat Model using Sulfated Polysaccharides. **Planta Medica**, v. 76, n. 02, p. 113–119, 3 jan. 2010.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos: anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.** [s.l.] Tecmedd, 2004.

CASTAÑEDA-LOPEZ, M. E. et al. Animal Models of Rheumatoid Arthritis. In: **Experimental Animal Models of Human Diseases - An Effective Therapeutic Strategy.** [s.l.] InTech, 2018.

CASTILHOS, L. G. et al. Effect of Uncaria tomentosa extract on purinergic enzyme activities in lymphocytes of rats submitted to experimental adjuvant arthritis model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, 2015.

CASTOR, C. W. The microscopic structure of normal human synovial tissue. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 3, n. 2, p. 140–151, 1960.

CASTRO, C. A. et al. Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, Tween-20, Tween-80, and emulphor-620. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 50, n. 4, p. 521–526, 1 abr. 1995.

CASTRO GHIZONI, C. V. et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Actions of Copaiba Oil Are Related to Liver Cell Modifications in Arthritic Rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 10, p. 3409–3423,

2017.

CAVALIERI, B. 1635. Geometria indivisibilibus continuorum nova quadam ratione promota. **Bologna. First edition Bologna**, v. 1635, 1635.

CHEN, J. et al. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. **Genome medicine**, v. 8, n. 1, p. 43, 2016.

CIBERE, J. et al. A randomized double blind, placebo controlled trial of topical *Tripterygium wilfordii* in rheumatoid arthritis: reanalysis using logistic regression analysis. **J Rheumatol**, v. 30, n. 3, p. 465–467, 2003.

CIPRIANI, P. et al. Methotrexate in rheumatoid arthritis: optimizing therapy among different formulations. Current and emerging paradigms. **Clinical therapeutics**, v. 36, n. 3, p. 427–435, 2014.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados**. Brasília: [s.n.]. v. 1

CONTE, F. DE P. et al. Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB₄, TNF- α , and CXCL-1. **Journal of leukocyte biology**, v. 84, n. 3, p. 652–660, 2008.

COOPER, N. J. Economic burden of rheumatoid arthritis: a systematic review. **Rheumatology**, v. 39, n. 1, p. 28–33, 2000.

CROFFORD, L. J. Use of NSAIDs in treating patients with arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 15, n. 3, p. S2, 2013.

CROSS, P. C.; MERCER, K. L. **Cell and tissue ultrastructure: a functional perspective**. [s.l.] WH Freeman New York, 1993.

CROWSON, C. S. et al. The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n. 3, p. 633–639, 2011.

CRUZ-ORIVE, L. M. Stereology of single objects. **Journal of microscopy**, v. 186, n. 2, p. 93–107, 1997.

CURTIS, C. L. et al. n-3 Fatty acids specifically modulate catabolic factors involved in articular cartilage degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 2, p. 721–724, 2000.

CURTIS, C. L. et al. Pathologic indicators of degradation and inflammation in human osteoarthritic cartilage are abrogated by exposure to n-3 fatty acids. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 6, p. 1544–1553, jun. 2002.

DA COSTA, O. T. F. et al. Stereological estimation of surface area and barrier thickness of fish gills in vertical sections. **Journal of Microscopy**, v. 225, n. 1, p. 1–9, 2007.

DA ROSA, C.; MACHADO, C. A. Plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças reumáticas: revisão Herbal medications for the treatment of rheumatics disease: a review. **Rev. Bras. Farm**, v. 88, n. 1, 2007.

DAHAM, S. et al. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11808–11829, 2015.

DATE, K. Scanning electron microscope studies on the synovial membrane. **Archivum histologicum japonicum**, v. 42, n. 5, p. 517–531, 1979.

DE AZEVEDO, A. B. C.; FERRAZ, M. B.; CICONELLI, R. M. Indirect costs of rheumatoid arthritis in Brazil. **Value in Health**, v. 11, n. 5, p. 869–877, 2008.

DE BUFFON, G. L. L. Essai d'arithmétique morale. **Euvres philosophiques**, 1777.

DE LIMA SILVA, J. J. et al. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on Ischemia-Reperfusion of Randomized Skin Flaps in Rats. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 33, n. 1, p. 104–109, 4 jan. 2009.

DEHOFF, R. T. Probes, populations, samples, measurements and relations in stereology. **Image Analysis & Stereology**, v. 19, n. 1, p. 1–8, 2011.

DEL GROSSI MOURA, M. et al. **Oral herbal medicines marketed in Brazil for the treatment of osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis** *Phytotherapy Research*, 2017.

DELESSE, M. A. Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. **CR Acad. Sci. Paris**, v. 25, p. 544–545, 1847.

DELRIO, A. N. et al. Distribution and characteristics of synoviocytes in the rabbit knee joint: a scanning/transmission electron microscopic study. **Italian journal of anatomy and embryology= Archivio italiano di anatomia ed embriologia**, v. 104, n. 1, p. 33–45, 1999.

- DELRIO, A. N.; FADDA, M. Ultrastructural characteristics of the human synoviocytes. **Bollettino della Societa italiana di biologia sperimentale**, v. 66, n. 3, p. 209–14, mar. 1990.
- DENG, G.-M. Animal Models in Rheumatoid Arthritis. In: **Encyclopedia of Medical Immunology**. New York, NY: Springer New York, 2014. p. 36–38.
- DESMARCHELIER, C. Neotropics and natural ingredients for pharmaceuticals: why isn't South American biodiversity on the crest of the wave? **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 6, p. 791–799, 2010.
- DI CARLO, F. J.; FIORE, J. V. On the composition of zymosan. **Science**, v. 127, n. 3301, p. 756–757, 1958.
- DI GIOVINE, F. S. et al. Interleukin 1 (IL 1) as a mediator of crystal arthritis. Stimulation of T cell and synovial fibroblast mitogenesis by urate crystal-induced IL 1. **The Journal of Immunology**, v. 138, n. 10, 1987.
- DIEHL, K. et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **Journal of Applied Toxicology: An International Journal**, v. 21, n. 1, p. 15–23, 2001.
- DONALDSON, L. F.; SECKL, J. R.; MCQUEEN, D. S. A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: effects of adjuvant dose. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 49, n. 1–2, p. 5–10, 1993.
- DURO, C. C. et al. Qualitative study of young, adult, and aged Wistar rats temporomandibular synovial membrane employing light, scanning, and transmission electron microscopy. **Microscopy research and technique**, v. 75, n. 11, p. 1522–1527, 2012.
- EDWARDS, J. C. W. **Synovial intimal fibroblasts**. Annals of the Rheumatic Diseases. **Anais...BMJ Publishing Group**, 1995Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7794049/>>. Acesso em: 11 maio. 2021
- EFTEKHARSADAT, B. et al. Effectiveness of Lavendula stoechas essential oil in treatment of mild to moderate carpal tunnel syndrome: a randomized controlled trial. **Journal of Hand Therapy**, v. 31, n. 4, p. 437–442, 2018.
- EGERTON, R. F. **Electron energy-loss spectroscopy in the electron microscope**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2011.
- EGGELMEIJER, F. et al. Bone metabolism in rheumatoid arthritis; relation to disease activity. **Rheumatology**, v. 32, n. 5, p. 387–391, 1993.
- ELMALI, N. et al. Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. **Inflammation**, v. 30, n. 1–2, p. 1–6, 2007.
- FANG, C. et al. Complement-Dependent Enhancement of CD8 + T Cell Immunity to Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection in Decay-Accelerating Factor-Deficient Mice . **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 5, p. 3178–3186, 1 set. 2007.
- FEDERAL, U. Óleo de copaíba (Copaifera sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. p. 465–472, 2009.
- FEIJÓ, A.; DE MACEDO BRAGA, L. M. G.; PITREZ, P. M. C. **Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos**. [s.l.] EDIPUCRS, 2010.
- FELLOWS, C. R. et al. Adipose, bone marrow and synovial joint-derived mesenchymal stem cells for cartilage repair. **Frontiers in genetics**, v. 7, p. 213, 2016.
- FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (–)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of Cordia verbenacea. **European journal of pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228–236, 2007.
- FERRERO, R.; WILSON, J.; SUTTON, P. Mouse Models of Helicobacter-Induced Gastric Cancer: Use of Cocarcinogens. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 921, p. 157–173, 27 set. 2012.
- FIGUEREDO, C. A. DE; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 381–400, 2014.
- FONSECA, J. E. et al. Macrophage subpopulations in rheumatoid synovium: Reduced CD163 expression in CD4+ T lymphocyte-rich microenvironments. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 5, p. 1210–1216, 2002.
- FRANCISCO, S. G. Uso do óleo de resina de copaíba (Copaifera Officinalis L) em inflamação ginecológica. **Femina**, v. 33, n. 2, p. 89–93, 2005.
- FRASNELLI, M. E. et al. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Res Ther**, v. 7, n. 2, p. R370, 2005.

- GABRIEL, S. E.; MICHAUD, K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. **Arthritis Research & Therapy**, v. 11, n. 3, p. 229, 2009.
- GEGOUT, P. et al. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: Effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life Sciences**, v. 55, n. 17, 1994.
- GEGOUT, P. et al. Zymosan-induced arthritis in rats II. Effects of anti-inflammatory drugs. **Life Sciences**, v. 56, n. 20, p. PL389–PL394, 7 abr. 1995.
- GELMINI, F. et al. GC–MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 440, n. 2, p. 170–178, jan. 2013.
- GERTSCH, J. et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9099–9104, 2008.
- GIBOFISKY, A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. **The American journal of managed care**, v. 18, n. Suppl 13, p. 295–302, 2012.
- GOMES, N. M. et al. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 486–492, 2007.
- GRAABAEK, P. M. Characteristics of the two types of synoviocytes in rat synovial membrane. An ultrastructural study. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 50, n. 6, p. 690–702, jun. 1984.
- GREGERSEN, P. K.; SILVER, J.; WINCHESTER, R. J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 30, n. 11, p. 1205–1213, 1987.
- GRIGOR, C. et al. Effect of a treatment strategy of tight control for rheumatoid arthritis (the TICORA study): a single-blind randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 364, n. 9430, p. 263–269, 2004.
- GUAZELLI, C. F. S. et al. Quercetin attenuates zymosan-induced arthritis in mice. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 102, p. 175–184, 2018.
- GUERRA, G. C. B. et al. Olmesartan Prevented Intra-articular Inflammation Induced by Zymosan in Rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 11, p. 1793–1801, 2016a.
- GUERRA, G. C. B. et al. Olmesartan prevented intra-articular inflammation induced by zymosan in rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 11, p. 1793–1801, 2016b.
- GUERRERO, A. T. G. et al. Involvement of LTB4 in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE2. **Journal of leukocyte biology**, v. 83, n. 1, p. 122–130, 2008.
- GUIDELINES, A. C. OF R. S. ON R. A. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 update. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 2, p. 328–346, 2002.
- GUNDERSEN, H. J. G. et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**, v. 96, n. 1–6, p. 379–394, jan. 1988.
- GUNDERSEN, H. J. G.; JENSEN, E. B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **Journal of microscopy**, v. 147, n. 3, p. 229–263, 1987.
- GUNDERSEN, H. J. G.; ØSTERBY, R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or ‘Do more less well!’. **Journal of Microscopy**, v. 121, n. 1, p. 65–73, jan. 1981.
- HADDAD, A. et al. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. 3º ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. **Paleontological statistics software package for education and data analysis.–Paleontologia Electronica 4/1: 1–9**, 2001.
- HASHIMOTO, K. et al. LOX-1 deficient mice show resistance to zymosan-induced arthritis. **European journal of histochemistry: EJH**, v. 62, n. 1, 2018.
- HENDERSON, B.; REVELL, P. A.; EDWARDS, J. C. **Synovial lining cell hyperplasia in rheumatoid arthritis: dogma and fact.** *Annals of the rheumatic diseases* Ann Rheum Dis, , 1988. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3284489/>>. Acesso em: 11 maio. 2021
- HOLERS, V. M. Autoimmunity to citrullinated proteins and the initiation of rheumatoid arthritis. **Current**

opinion in immunology, v. 25, n. 6, p. 728–735, 2013.

HOWARD, V.; REED, M. **Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy**. [s.l.] Garland Science, 2004.

HUMBY, F. et al. Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. **PLoS medicine**, v. 6, n. 1, p. e1, 2009.

ISHIGURO, N. et al. Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover: analyses of synovial fluid from patients with osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 42, n. 1, p. 129–136, 1999a.

ISHIGURO, N. et al. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and glycosaminoglycans in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 26, n. 1, p. 34–40, 1999b.

IWANAGA, T. et al. Morphology and Functional Roles of Synoviocytes in the Joint. **Archives of Histology and Cytology**, v. 63, n. 1, p. 17–31, 2000.

JENSEN, E. B.; GUNDERSEN, H. J. G. Fundamental stereological formulae based on isotropically orientated probes through fixed points with applications to particle analysis. **Journal of Microscopy**, v. 153, n. 3, p. 249–267, 1989.

Ji, J. et al. Novel benzenediamine derivative FC99 ameliorates zymosan-induced arthritis by inhibiting ROR γ t expression and Th17 cell differentiation. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 46, n. 10, p. 829–836, 2014.

JIANG, Q. et al. Will Chinese external therapy with compound Tripterygium wilfordii hook F gel safely control disease activity in patients with rheumatoid arthritis: Design of a double-blinded randomized controlled trial. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, 2017.

JIN, J. H. et al. Anti-allergic activity of sesquiterpenes from the rhizomes of *Cyperus rotundus*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 2, p. 223–228, 2011.

JOOSTEN, L. A. B. et al. IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 9, p. 3298–3303, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 13^a ed. [s.l.: s.n.].

KENNEDY, A. et al. **Macrophages in synovial inflammation** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 10 out. 2011. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 11 maio. 2021

KEY, J. A. Synovial membrane in special Cytology. **New York. (Quoted from Kling.)**, 1928.

KEYSTONE, E. C. et al. Zymosan—Induced Arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 20, n. 7, p. 1396–1401, 1 set. 1977.

KEYSZER, G. et al. Differential expression of cathepsins B and L compared with matrix metalloproteinases and their respective inhibitors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: A parallel investigation by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction . **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 41, n. 8, p. 1378–1387, 1998.

KIENER, H. P. et al. Cadherin 11 promotes invasive behavior of fibroblast-like synoviocytes. **Arthritis & Rheumatism**, v. 60, n. 5, p. 1305–1310, 2009.

KITAS, G. D.; GABRIEL, S. E. Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: state of the art and future perspectives. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 70, n. 1, p. 8–14, 2011.

KOBAYASHI, C. et al. Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 3, p. 306–313, 16 mar. 2011a.

KOBAYASHI, C. et al. Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 3, p. 306–313, 16 mar. 2011b.

KOMEH-NKRUMAH, S. A. et al. Topical dermal application of essential oils attenuates the severity of adjuvant arthritis in Lewis rats. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 1, p. 54–59, 2012.

KREMER, J. R.; MASTRONARDE, D. N.; MCINTOSH, J. R. Computer Visualization of Three-Dimensional Image Data Using IMOD. **Journal of Structural Biology**, v. 116, n. 1, p. 71–76, jan. 1996.

KUBOTA, E. et al. Synovial fluid cytokines and proteinases as markers of temporomandibular joint disease. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 56, n. 2, p. 192–198, 1998.

- LAURINDO, I. M. M. et al. Artrite reumatóide: Diagnóstico e Tratamento. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 44, n. 6, p. 435–442, 2004.
- LEANDRO, L. M. et al. **Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (Copaifera spp.) oleoresins** *Molecules*, 2012.
- LEFÈVRE, S. et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. **Nature medicine**, v. 15, n. 12, p. 1414, 2009.
- LEIGH, R. D.; CAMBRIDGE, G.; EDWARDS, J. C. W. Expression of B cell survival cofactors on synovial fibroblasts. **Br J Rheumatol**, v. 1, p. 110, 1996.
- LEVENTHAL, L. J.; BOYCE, E. G.; ZURIER, R. B. Treatment of rheumatoid arthritis with blackcurrant seed oil. **Rheumatology**, v. 33, n. 9, p. 847–852, 1994.
- LEVÊQUE, D. et al. Pharmacokinetic drug–drug interactions with methotrexate in oncology. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 4, n. 6, p. 743–750, 2011.
- LEWIS, W. H. **Elvin-Lewis. MPF Medical Botany—plants affecting man’s health** John Wiley & Sons, , 1977.
- LI, P. et al. NF-κB Regulates VCAM-1 Expression on Fibroblast-Like Synoviocytes. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 11, p. 5990–5997, 1 jun. 2000.
- LIMA, S. R. M. et al. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 17, n. 9, p. 1048–1053, 2003.
- LINDSLEY, H. B. et al. Proinflammatory Cytokines Enhance Human Synoviocyte Expression of Functional Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1). **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 68, n. 3, p. 311–320, 1 set. 1993.
- LIU, H. et al. Neuroprotective effects of trans-caryophyllene against kainic acid induced seizure activity and oxidative stress in mice. **Neurochemical research**, v. 40, n. 1, p. 118–123, 2015.
- LJUNG, L.; RANTAPÄÄ-DAHLQVIST, S. Abdominal obesity, gender and the risk of rheumatoid arthritis—a nested case–control study. **Arthritis research & therapy**, v. 18, n. 1, p. 277, 2016.
- LLOYD, J. U. **Copaifera officinalis**. [s.l.] Engelhard, 1898.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. [s.l.: s.n.].
- LUCCA, L. G. et al. Determination of β-caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 104, p. 144–148, 2015.
- MACGREGOR, A. J. et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 43, n. 1, p. 30–37, 2000.
- MALEMBA, J. J. et al. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Kinshasa, Democratic Republic of Congo—a population-based study. **Rheumatology**, v. 51, n. 9, p. 1644–1647, 2012.
- MALMSTRÖM, V.; CATRINA, A. I.; KLARESKOG, L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 1, p. 60, 2017.
- MARQUES NETO, JF; GONÇALVES, ET; LANGEN, LF; CUNHA, MF; RADOMINSKI, S; OLIVEIRA, SM; CURY, SE; MEDEIROS, F; SAMPAIO, G. Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatóide do adulto em amostras da população brasileira. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 33, n. 5, p. 169–73, 1993.
- MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREIRA, J. F.; LIMA, H. C. DE. **O gênero *Copaifera* (Leguminosae — Caesalpinioideae) na Amazônia brasileira** *Rodriguésia* Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, , 2008. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/23499872>>. Acesso em: 3 fev. 2018
- MCDONALD, J. N.; LEVICK, J. R. Morphology of surface synoviocytes in situ at normal and raised joint pressure, studied by scanning electron microscopy. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 47, n. 3, p. 232–240, 1988.
- MCILWRAITH, C. W. **Disease processes of synovial membrane, fibrous capsule, ligaments, and articular cartilage**. Proceedings of 47th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. **Anais...**2001

- MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 23, p. 2205–2219, 2011.
- MEGRAJ, K. V. K. et al. Biological activities of some Indian medicinal plants. **Journal of Advanced pharmacy education & research**, v. 1, p. 12–44, 2011.
- MELLER, S. T.; GEBHART, G. F. Intraplantar zymosan as a reliable, quantifiable model of thermal and mechanical hyperalgesia in the rat. **European Journal of Pain**, v. 1, n. 1, p. 43–52, 1 mar. 1997.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - SISTEMA DE INFORMAÇÕES HOSPITALARES DO SUS (SIH/SUS). **Morbidade Hospitalar do SUS - por local de internação - Brasil - Artrite reumatóide e outras poliartropatias inflamatórias**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>>. Acesso em: 3 out. 2017.
- MORALES-DUCRET, J. et al. Alpha 4/beta 1 integrin (VLA-4) ligands in arthritis. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in synovium and on fibroblast-like synoviocytes. **The Journal of Immunology**, v. 149, n. 4, 1992.
- MOTA, L. M. H. DA et al. Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 3, p. 207–219, 2011.
- MOTA, L. M. H. DA; LAURINDO, I. M. M.; SANTOS NETO, L. L. DOS. Artrite reumatoide inicial: conceitos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 2, p. 227–229, 2010.
- MOUDGIL, K. D.; KIM, P.; BRAHN, E. Advances in rheumatoid arthritis animal models. **Current rheumatology reports**, v. 13, n. 5, p. 456–63, out. 2011.
- MUR, E. et al. Randomized double blind trial of an extract from the pentacyclic alkaloid-chemotype of *Uncaria tomentosa* for the treatment of rheumatoid arthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 29, n. 4, p. 678–81, 2002.
- MURASHIGE, N. et al. Normal structure and morphological effects of a corticosteroid on the peripatellar synovial membrane of the rat. **Kaibogaku zasshi. Journal of anatomy**, v. 74, n. 2, p. 183–189, 1999.
- NEVES, S. M. P. et al. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Instituto de Química/Universidade de São Paulo (FCF-IQ/USP), 2013.
- NGO, S. T.; STEYN, F. J.; MCCOMBE, P. A. Gender differences in autoimmune disease. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 347–369, 2014.
- NICOL, S.; FOSTER, J.; KAWAGUCHI, S. The fishery for Antarctic krill - recent developments. **Fish and Fisheries**, v. 13, n. 1, p. 30–40, 2012.
- NIO, J. et al. Three-dimensional Ultrastructure of Synoviocytes in the Knee Joint of Rabbits and Morphological Changes in Osteoarthritis Model. **Archives of Histology and Cytology**, v. 65, n. 2, p. 189–200, 2002.
- NISSEN, S. E. et al. Cardiovascular safety of celecoxib, naproxen, or ibuprofen for arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 375, p. 2519–2529, 2016.
- NOZAKI, Y. et al. Species difference in the inhibitory effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the uptake of methotrexate by human kidney slices. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 322, n. 3, p. 1162–1170, 2007.
- OECD. **Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure**. [s.l.] OECD Publishing, 2008.
- OLIVEIRA, F. M. DE; LYRA, I. N.; ESTEVES, G. S. G. Avaliação microbiológica e físico-química de iogurtes de morango industrializados e comercializados no município de Linhares–ES. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 2, p. 147–155, 2013.
- OLIVER, S. J.; BRAHN, E. Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective. **The Journal of rheumatology. Supplement**, v. 44, p. 56–60, 1996.
- OLSEN, N. J.; STEIN, C. M. New Drugs for Rheumatoid Arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 21, p. 2167–2179, 20 maio 2004.
- ORIVE, L.-M. C. On the estimation of particle number. **Journal of Microscopy**, v. 120, n. 1, p. 15–27, set. 1980.
- PAIVA, A. A. D. O. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Lobophora variegata* on zymosan-induced arthritis in rats. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 9, p. 1241–1250,

set. 2011a.

PAIVA, A. A. D. O. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Lobophora variegata* on zymosan-induced arthritis in rats. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 9, p. 1241–1250, 1 set. 2011b.

PAIVA, L. A. . et al. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 1, p. 51–56, jul. 2004.

PAREEK, A. et al. Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): A systematic review. **Pharmacognosy reviews**, v. 5, n. 9, p. 103–110, jan. 2011.

PARTSCH, G. et al. Highly increased levels of tumor necrosis factor-alpha and other proinflammatory cytokines in psoriatic arthritis synovial fluid. **The Journal of rheumatology**, v. 24, n. 3, p. 518–523, 1997.

PATRICK, M.; HEPTINSTALL, S.; DOHERTY, M. Feverfew in rheumatoid arthritis: a double blind, placebo controlled study. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 48, n. 7, p. 547–9, 1989.

PAUL, S. et al. Assessment of anti-inflammatory and anti-arthritic properties of *Acmella uliginosa* (Sw.) Cass. based on experiments in arthritic rat models and qualitative gas chromatography-mass spectrometry analyses. **Journal of intercultural ethnopharmacology**, v. 5, n. 3, p. 257, 2016.

PEARSON, C. M.; WOOD, F. D. Studies of polyarthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant. I. General clinical and pathologic characteristics and some modifying factors. **Arthritis & Rheumatology**, v. 2, n. 5, p. 440–459, 1959.

PEARSON, C. M.; WOOD, F. D. Studies of arthritis and other lesions induced in rats by the injection of mycobacterial adjuvant: VII. Pathologic details of the arthritis and spondylitis. **The American journal of pathology**, v. 42, n. 1, p. 73, 1963.

PENIDO, C. et al. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. **Inflammation Research**, v. 55, n. 11, p. 457–464, nov. 2006.

PENNYCOOK, S. J.; NELLIST, P. D. **Scanning transmission electron microscopy: imaging and analysis**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2011.

PHILIPPE, L. et al. MiR-20a regulates ASK1 expression and TLR4-dependent cytokine release in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 72, n. 6, p. 1071–1079, 2013.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465–472, 2009.

PILLEMER, L. A.; ECKER, E. E. Anticomplementary factor in fresh yeast. **J Biol Chem**, v. 137, n. 1, p. 139–142, 1941.

PINTO, L. G. et al. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. **Pain**, v. 148, n. 2, p. 247–256, 2010.

RAMOS, M. et al. Enfermedades autoinmunes sistémicas y reumatológicas. **1ª**, 2005.

RAMOS, M. F. DE S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por 'spray-drying': estudo de estabilidade e avaliação farmacológica** Universidade de São Paulo, , 2006.

RASBAND, W. S. **ImageJ 1997–2007**. US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 2008.

REDLICH, K.; SMOLEN, J. S. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. **Nature reviews Drug discovery**, v. 11, n. 3, p. 234, 2012.

REED, M. G.; HOWARD, C. V.; DE YANÉS, G. S. One-Stop Stereology: the estimation of 3D parameters using Isotropic Rulers. **Journal of microscopy**, v. 239, n. 1, p. 54–65, 2010.

RIBEL-MADSEN, S. et al. A Synoviocyte Model for Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis: Response to Ibuprofen, Betamethasone, and Ginger Extract—A Cross-Sectional In Vitro Study . **Arthritis**, v. 2012, p. 1–9, 31 dez. 2012.

RIZZO, L. V.; CAMARGO, L. F. A. Pesquisa clínica no Brasil. **Einstein (São Paulo)**, v. 11, n. 1, p. vii–viii, mar. 2013.

ROCHA, F. A. C. DA et al. Efeito de inibidores da sintase de óxido nítrico na dor inflamatória articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 4, p. 206–217,

2003.

ROCHA, F. A. C. et al. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflammation Research**, v. 48, n. 9, p. 485–490, 1999.

RODRIGUES, A. G.; SANTOS, M. G. DOS; AMARAL, A. C. F. Políticas públicas em plantas medicinais e fitoterápicos. **Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de assistência farmacêutica. Fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos. Brasília:(DF): MS**, p. 9–28, 2006.

ROSA, I. et al. Morphological evidence of telocytes in human synovium. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

ROSAS, E. C. et al. Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 490–498, 2015a.

ROSAS, E. C. et al. Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 490–498, 8 out. 2015b.

ROSE, H. Electron Microscopy. **Optik**, v. 39, n. 4, p. 416–436, 1974.

ROSIWAL, A. Ueber geometrische Gesteinsanalysen. **Verh. KK Geol. Reichsanst Wien**, p. 143–175, 1898.

SACHETTI, C. G. et al. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 937–941, 2009.

SAFAYHI, H. et al. Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 261, n. 3, p. 1143–6, 1992.

SALLIOT, C.; VAN DER HEIJDE, D. Long term safety of methotrexate monotherapy in rheumatoid arthritis patients: a systematic literature research. **Annals of the rheumatic diseases**, 2008.

SANTOS, A. O. et al. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 204–208, 2008.

SASTRY, S. V.; NYSHADHAM, J. R.; FIX, J. A. Recent technological advances in oral drug delivery—a review. **Pharmaceutical science & technology today**, v. 3, n. 4, p. 138–145, 2000.

SATO, E. I. et al. Estudo da prevalência da artrite reumatóide em população de origem japonesa em Moji das Cruzes, São Paulo. **Rev. bras. reumatol**, p. 133–6, 1990.

SCHEIMAN, J. M. NSAID-induced gastrointestinal injury: A focused update for clinicians. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 50, n. 1, p. 5–10, 2016.

SCHETT, G. **Erosive arthritis** *Arthritis Research and Therapy*, 2007.

SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. J. **Rheumatoid arthritis**. *The Lancet*. **Anais...Elsevier B.V.**, 25 set. 2010

SENNA, E. R. et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **The Journal of Rheumatology**, v. 31, n. 3, p. 594–597, 2004.

SHEALY, D. J. et al. Anti-TNF-alpha antibody allows healing of joint damage in polyarthritic transgenic mice. **Arthritis research**, v. 4, n. 5, p. R7, 2002.

SHIKICHI, M. et al. Three-dimensional ultrastructure of synoviocytes in the horse joint as revealed by the scanning electron microscope. **Archives of histology and cytology**, v. 62, n. 3, p. 219–229, 1999.

SHIKICHI, M. Three-dimensional Ultrastructure of Synoviocytes in the Horse Joint. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 55–56, 2000.

SHIOZAWA, S. et al. Pathogenesis of joint destruction in rheumatoid arthritis. **Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis**, v. 59, n. 2, p. 89–95, 2011.

SILVA, E. DE A. Avaliação química e farmacológica do óleo destilado de copaiba (*Copaifera* spp.-*Leguminosae*/*Caesalpinoideae*) e aplicações biotecnológicas. 2019.

SILVA JÚNIOR, F. S.; ROCHA, F. A. C. Artrite induzida por Zymosan em ratos—Mecanismos envolvidos na hipernocicepção e finalise da cartilagem articular. **Acta Reum. Port**, v. 31, p. 143–149, 2006.

SINGH, J. A. et al. Immunohistochemistry of normal human knee synovium: A quantitative study. **Annals of**

the Rheumatic Diseases, v. 63, n. 7, p. 785–790, jul. 2004a.

SINGH, J. A. et al. Immunohistochemistry of normal human knee synovium: A quantitative study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 63, n. 7, p. 785–790, jul. 2004b.

SINGH, J.; FURST, D.; BHARAT, A. 2012 Update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. **Arthritis Care & Research**, v. 64, n. 5, p. 625–39, 2012.

SMITH, M. D. et al. Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. 4, p. 303–307, 1 abr. 2003.

SMITH, M. D. Suppl 1: the normal synovium. **The open rheumatology journal**, v. 5, p. 100, 2011.

SMITH, M. D.; WECHALEKAR, M. D. The synovium. In: **Rheumatology**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 27–32.

SMOLEN, J. S. et al. Validity and reliability of the twenty-eight-joint count for the assessment of rheumatoid arthritis activity. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 38, n. 1, p. 38–43, 1995.

SMOLEN, J. S. et al. **New therapies for treatment of rheumatoid arthritis** *Lancet*, 2007.

SMOLEN, J. S. et al. Proposal for a new nomenclature of disease-modifying antirheumatic drugs. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 73, n. 1, p. 3–5, 2014a.

SMOLEN, J. S. et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 73, n. 3, p. 492–509, 23 mar. 2014b.

SMOLEN, J. S. et al. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 75, n. 1, p. 3–15, 2016.

SMOLEN, J. S. et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 76, n. 6, p. 960–977, 2017.

SMOLEN, J. S. et al. Rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 18001, 8 fev. 2018.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 388, n. 10055, p. 2023–2038, 22 out. 2016.

SOEKEN, K. L.; MILLER, S. A.; ERNST, E. **Herbal medicines for the treatment of rheumatoid arthritis: A systematic review** *Rheumatology*, 2003.

STAHL, E. A. et al. Bayesian inference analyses of the polygenic architecture of rheumatoid arthritis. **Nature genetics**, v. 44, n. 5, p. 483, 2012.

STANCZYK, J. et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n. 4, p. 1001–1009, 2008.

STEINER, G. Auto-antibodies and autoreactive T-cells in rheumatoid arthritis. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 32, n. 1, p. 23, 2007.

STEVENS, C. R.; MAPP, P. I.; REVELL, P. A. A monoclonal antibody (Mab 67) marks type B synoviocytes. **Rheumatology International**, v. 10, n. 3, p. 103–106, maio 1990.

STOLT, P. et al. Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 64, n. 4, p. 582–586, 2005.

STREHL, C. et al. Defining conditions where long-term glucocorticoid treatment has an acceptably low level of harm to facilitate implementation of existing recommendations: viewpoints from an EULAR task force. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 75, n. 6, p. 952–957, 2016.

STRICKLEY, R. G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. **Pharmaceutical research**, v. 21, n. 2, p. 201–230, 2004.

SWAAK, A. J. et al. Interleukin-6 (IL-6) in synovial fluid and serum of patients with rheumatic diseases. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 17, n. 6, p. 469–474, 1988.

TANIA PINHEIRO, M. et al. **ACTA SCIENTIFIC MEDICAL SCIENCES Evaluation of the Anti-Inflammatory Activity of the Oil from the Pequi (Caryocar brasiliensis Camb) in Mice**. [s.l.: s.n.].

- Disponível em: <<https://www.actascientific.com/ASMS/pdf/ASMS-02-0115.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2019.
- TANNER, M. R. et al. KCa1.1 channels regulate b1-integrin function and cell adhesion in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **FASEB Journal**, v. 31, n. 8, p. 3309–3320, 1 ago. 2017.
- TAPPIN, M. R. R. et al. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 236–240, 2004.
- TARAFDER, S.; LEE, C. H. Synovial Joint. In: **In Situ Tissue Regeneration**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 253–273.
- TAYLOR, P. R. et al. The β -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. **The Journal of immunology**, v. 169, n. 7, p. 3876–3882, 2002.
- TEIXEIRA, F. B. et al. Copaiba oil-resin (*Copaifera reticulata* Ducke) modulates the inflammation in a model of injury to rats' tongues. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 313, 14 jun. 2017.
- THOMSON, E. Quantitative microscopic analysis. **The Journal of Geology**, v. 38, n. 3, p. 193–222, 1930.
- THYSS, A. et al. Clinical and pharmacokinetic evidence of a life-threatening interaction between methotrexate and ketoprofen. **The Lancet**, v. 327, n. 8475, p. 256–258, 1986.
- TOBÓN, G. J.; YOUINOU, P.; SARAUX, A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, v. 35, n. 1, p. 10–14, 2010.
- TRYNKA, G. et al. Chromatin marks identify critical cell types for fine mapping complex trait variants. **Nature genetics**, v. 45, n. 2, p. 124, 2013.
- TURCOTTE, C. et al. The CB 2 receptor and its role as a regulator of inflammation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 23, p. 4449–4470, 2016.
- UHLIG, T.; MOE, R. H.; KVIEN, T. K. The Burden of Disease in Rheumatoid Arthritis. **PharmacoEconomics**, v. 32, n. 9, p. 841–851, 25 set. 2014.
- UNDERHILL, D. M. Macrophage recognition of zymosan particles. **Journal of endotoxin research**, v. 9, n. 3, p. 176–180, 2003.
- UTSUNOMIYA, I.; ITO, M.; OH-ISHI, S. Generation of inflammatory cytokines in zymosan-induced pleurisy in rats: TNF induces IL-6 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in vivo. **Cytokine**, v. 10, n. 12, p. 956–963, 1998.
- VASCONCELOS, C. P. P. DE. **Pré-condicionamento e tratamento com misturas de óleos de ômega-3, 6 e 9 sobre a inflamação e a reabsorção óssea na doença periodontal experimental**, 29 abr. 2013. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/26332>>. Acesso em: 3 fev. 2018
- VASILJEVIC, D. et al. Evaluation of the effects of different supplementation on oxidative status in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 35, p. 1909–1915, 2016.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero copaifera L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273–286, maio 2002.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, jun. 2005.
- VEIGA, V. F. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 248–254, jun. 2007.
- VESPERINI, V. et al. Association of tobacco exposure and reduction of radiographic progression in early rheumatoid arthritis: results from a French multicenter cohort. **Arthritis care & research**, v. 65, n. 12, p. 1899–1906, 2013.
- VIJAYALAXMI, A. et al. Anti-arthritic and anti inflammatory activity of beta caryophyllene against Freund's complete adjuvant induced arthritis in wistar rats. **Journal of Bone Reports & Recommendations**, v. 1, n. 29, p. 1–10, 2015.
- VILELA, C. A. A.; ARTUR, P. O. Secagem do açafrão (*Curcuma longa* L.) em diferentes cortes geométricos TT - Drying of *Curcuma longa* L. in different shapes. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 28, n. 2, p. 387–394, 2008.
- VOLMAN, T. J. H.; HENDRIKS, T.; GORIS, R. J. A. Zymosan-induced generalized inflammation: experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome. **Shock (Augusta, Ga.)**,

v. 23, n. 4, p. 291–7, abr. 2005.

WALAKOVITS, L. A. et al. Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 35, n. 1, p. 35–42, 1992.

WANG, X. et al. Treatment of rheumatoid arthritis with combination of methotrexate and Tripterygium wilfordii: A meta-analysis. **Life Sciences**, v. 171, p. 45–50, 2017.

WEIBEL, E. R. **Stereological Methods: Theoretical Foundations. Vol. 2.** [s.l.] Academic Press, London, 1980.

WEINBLATT, M. E.; KURITZKY, L. Rapid rheumatoid arthritis: primary care initiative for improved diagnosis and outcomes. **Journal of Family Practice**, v. 56, n. 4, p. S1–S1, 2007.

WEST, M. J. Introduction to stereology. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2012, n. 8, p. pdb.top070623, 1 ago. 2012.

WIJEKOON, H. M. S. et al. Anti-arthritic effect of pentosan polysulfate in rats with collagen-induced arthritis. **Research in veterinary science**, v. 122, p. 179–185, 2019.

WINEY, M. et al. Conventional transmission electron microscopy. **Molecular biology of the cell**, v. 25, n. 3, p. 319–323, 2014.

WOOD, J. N. From plant extract to molecular panacea: a commentary on Stone (1763) “An account of the success of the bark of the willow in the cure of the agues”. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 370, n. 1666, p. 20140317, 19 abr. 2015.

WRIGHT, H. L.; MOOTS, R. J.; EDWARDS, S. W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 10, p. 593–601, 2014.

WYSOCKI, G. P. Scanning electron microscopy of synovial membranes. **Arch Path**, v. 93, p. 172–177, 1972.

YANG, C. S.; WANG, Z. Y. **Tea and cancer** **Journal of the National Cancer Institute**, 1993.

ZIFF, M. Relation of cellular infiltration of rheumatoid synovial membrane to its immune response. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 17, n. 3, p. 313–319, 1974.

ZURIER, R. B. et al. Gamma-linolenic acid treatment of rheumatoid arthritis. A randomized, placebo-controlled trial. **Arthritis and rheumatism**, v. 39, n. 11, p. 1808–1817, 1996.

Capítulo 3

O efeito do óleo de copaíba (Copaifera spp.) sobre a morfologia ultraestrutural da membrana sinovial de camundongos na artrite aguda induzida por Zymosan

RESUMO

A ação do óleo de copaíba como um agente anti-inflamatório é amplamente difundida na literatura, principalmente em modelos animais. Contudo os seus efeitos especificamente sobre a ultraestrutura da membrana sinovial em articulações saudáveis e artríticas, necessitam ser elucidadas. **Objetivo:** Avaliar qualitativamente o efeito do óleo de copaíba (*Copaifera* spp.) sobre a morfologia ultraestrutural da membrana sinovial (MS) de camundongos na artrite aguda induzida por Zymosan (Zy). **Materiais e métodos:** Camundongos BALB/c, fêmeas, foram divididos em quatro grupos. Desses, três foram induzidos a artrite experimental por Zymosan (AZy), ao inocular 25µL da solução na pata esquerda, por via s.c. Tais grupos também distinguiram-se pelo tratamento orogástrico (o.g.) (gavagem) prévio (30 minutos antes da inoculação), sendo administrados aos grupo “Artrítico”, “Copaíba e “Diclo”, solução salina, óleo de copaíba a 600mg/kg e diclofenaco a 100 mg/kg, respectivamente. O grupo “Controle”, correspondeu aos animais não artríticos que receberam apenas salina. Após 96 horas da inoculação de Zy ou salina, os animais foram eutanasiados e então suas patas e tecidos foram removidos para processamento das articulações metatarsofalangeana (MTF) para análise por microscopia eletrônica. **Resultados:** A MS da articulação MTF do grupo Artrítico apresentou alterações ultraestruturais características de artrite experimental, tais como hiperplasia com infiltração de células imunes mononucleares, os sinoviócitos do tipo B apresentaram aumento de retículo endoplasmático rugoso e vacúolos citoplasmáticos, cisternas dilatadas repletas de ribossomos e processos citoplasmáticos extensos; os sinoviócitos do tipo A demonstram inúmeros vacúolos citoplasmáticos, indicando atividade fagocítica ativada nos animais artríticos. Os grupos Controle, Diclofenaco e Cop600 apresentaram baixa celularidade na sinóvia. Por fim, o óleo de copaíba modificou o arranjo celular, fornecendo plasticidade aos sinoviócitos para tornar a membrana impermeável. **Conclusão:** O modelo de AZy foi eficaz em promover alterações ultraestruturais clássicas na MS de pequenas articulações, quando injetado em pata por via subcutânea (s.c.) e na concentração de 500 µg. O óleo de copaíba demonstrou-se promissor em preservar a ultraestrutura dos sinoviócitos. Estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos e vias envolvidas.

Palavras-chaves: ultraestrutura, microscopia eletrônica, pequenas articulações, articulação metatarsofalangeana, modelo animal.

ABSTRACT

The action of copaiba oil as an anti-inflammatory agent is widely disseminated in the literature, mainly in animal models. However, its effects specifically on the synovial membrane ultrastructure in healthy and arthritic joints need to be elucidated. **Objective:** To qualitatively evaluate the effect of copaiba oil (*Copaifera* spp.) on the ultrastructural morphology of the synovial membrane (SM) of mice in acute arthritis induced by Zymosan (Zy). **Materials and methods:** Female BALB/c mice were divided into four groups. Of these, three were induced to experimental arthritis by Zymosan (AZy), when inoculating 25 μ L of the solution in the left paw, via sc. These groups were also distinguished by previous orogastric treatment (og) (gavage) (30 minutes before inoculation), being administered to the groups “Arthritic”, “Copaíba and “Diclo”, saline solution, copaiba oil at 600mg/kg and diclofenac at 100 mg/kg, respectively. The “Control” group corresponded to non-arthritic animals that received only saline. 96 hours after Zy or saline inoculation, the animals were euthanized and then their paws and tissues were removed for processing of the metatarsophalangeal joints (MTF) for analysis by electron microscopy. **Results:** The UL of the MTF joint of the Arthritic group showed ultrastructural changes characteristic of experimental arthritis, such as hyperplasia with infiltration of mononuclear immune cells, type B synoviocytes showed an increase in rough endoplasmic reticulum and cytoplasmic vacuoles, dilated cisterns full of ribosomes and processes extensive cytoplasmic; type A synoviocytes demonstrate numerous cytoplasmic vacuoles, indicating activated phagocytic activity in arthritic animals. The Control, Diclofenac and Cop600 groups showed low cellularity in the synovia. Finally, copaiba oil modified the cell arrangement, providing plasticity to synoviocytes to make the membrane impermeable. **Conclusion:** The AZy model was effective in promoting classic ultrastructural changes in UL of small joints, when injected subcutaneously in the paw at a concentration of 500 μ g. Copaiba oil showed promise in preserving the ultrastructure of synoviocytes. Additional studies are needed to elucidate the mechanisms and pathways involved.

Keywords: ultrastructure, electron microscopy, small joints, metatarsophalangeal joint, animal model.

1. INTRODUÇÃO

As articulações diartrodiais (ou sinoviais) correspondem a juntas presentes, em grande parte, nas extremidades do corpo, que possibilitam uma ampla variedade de movimentos quando comparadas aos outros tipos de articulações (TARAFDER; LEE, 2016). Entre seus componentes, citam-se a cápsula articular, composta por camada externa fibrosa e, interna, a membrana sinovial (DELRIO; FADDA, 1990; SMITH; WECHALEKAR, 2015). Ainda, citam-se a cartilagem hialina, que reveste a extremidade dos ossos periarticulares e o espaço sinovial, que contém o líquido sinovial, um derivado do plasma sanguíneo, responsável por lubrificar e nutrir a cartilagem (SILVA; SILVA; VIANA, 2011).

A sinóvia ou membrana sinovial refere-se a um tecido conjuntivo mole especializado que reveste a superfície interna da cápsula fibrosa das articulações sinoviais, bainhas de tendão e bursas (SMITH, 2011; SMITH; WECHALEKAR, 2015). Sua morfologia normal é descrita como uma estrutura relativamente acelular, composta por duas camadas: a camada de revestimento sinovial (ou íntima), que está em contato com o espaço sinovial e é constituída por uma a três camadas de células compactadas (macrófagos e fibroblastos) e a outra subjacente, referida como subíntima, composta por vasos sanguíneos e linfáticos e abundante matriz extracelular colágena (MEC), na qual encontram-se dispersas diferentes componentes celulares, tais como fibroblastos residentes, macrófagos, mastócitos, adipócitos e, ainda, fibras nervosas autônomas (ALLARD; BAYLISS; MAINI, 1990; SINGH et al., 2004a; SMITH, 2011; SMITH; WECHALEKAR, 2015).

A camada de revestimento sinovial compreende dois tipos de células morfológicamente diferentes: sinoviócitos tipo A ou semelhantes a macrófagos (SSM), que são células fagocíticas derivadas da medula óssea, responsáveis por eliminar detritos do espaço sinovial, além de servir como sentinelas imunológicas, e tipo B ou sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (SSF ou fibroblastos sinoviais), um tipo de células mesenquimais que atuam como grandes produtoras de componentes moleculares do líquido sinovial, incluindo o ácido hialurônico e a glicoproteína lubricina (ALLARD; BAYLISS; MAINI, 1990; SMITH, 2011; SMITH; WECHALEKAR, 2015). Portanto a sinóvia é essencial para a homeostase articular. Contudo, também desempenha papel central na patogenia de uma série de doenças inflamatórias das articulações, incluindo artrite reumatoide (AR) (SMITH, 2011).

As alterações estruturais em articulações de indivíduos com AR têm tratamento controverso entre os profissionais de saúde e, portanto, um maior conhecimento da estrutura normal e da ultraestrutura dos sinoviócitos em diferentes fases da doença é necessário para

propor tratamentos mais eficazes (LAURINDO et al., 2004; SHIOZAWA et al., 2011; SINGH; FURST; BHARAT, 2012).

Os estudos em humanos são geralmente realizados a partir de amostras de autópsia (DELRIO; FADDA, 1990; RIBEL-MADSEN et al., 2012), mas as condições clínicas e as doenças pré-existentes comuns não podem ser avaliadas com precisão através das histórias familiares e clínicas (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010; SMOLEN et al., 2014b). Considerando esses fatos e outras dificuldades associadas, como protocolos padronizados de acordo com a idade, gênero, raça e período de tratamento ou doença (SMOLEN et al., 2014b), modelos animais estão sendo usados para o estudo das articulações artríticas para compreensão de mecanismos fisiopatológicos e abordagem novas opções terapêuticas (ASQUITH et al., 2009; MOUDGIL; KIM; BRAHN, 2011; OLIVER; BRAHN, 1996; ZURIER et al., 1996).

Diferentes modelos experimentais de artrite que compartilham características comuns com a AR clínica têm sido empregados para elucidar e compreender mecanismos patológicos da artrite, bem como os efeitos de novas opções terapêuticas sobre mecanismos imunológicos, bioquímicos e histopatológicos envolvidos (ASQUITH et al., 2009; BENDELE, 2001; BENDELE et al., 1999; CAPLAZI et al., 2015; CASTAÑEDA-LOPEZ et al., 2018). Dentre estes, destaca-se o modelo de AZy, que consiste em polissacarídeo obtido da parede celular de *Sacharomices cerevisies*, que quando inoculado em animais desenvolve mecanismos inflamatórios semelhantes a AR clínica (ASQUITH et al., 2009; DI CARLO; FIORE, 1958; KEYSTONE et al., 1977). A artrite experimental desenvolve várias alterações morfológicas na articulação, que incluem modificações na membrana sinovial, resultando numa sinovite progressiva, tornando-a hipertrófica e hiperplásica, infiltrado de células imunes no espaço sinovial e na matriz da membrana, formação de novos vasos, destruição óssea e cartilaginosa (BHATTARAM; CHANDRASEKHARAN, 2017).

O tratamento da artrite consiste em utilizar medicamentos modificadores da doença (DMARDs, drogas modificadoras de atividade da doença), corticosteroides e anti-inflamatórios (SMOLEN et al., 2014b; SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016). Contudo, muitos dos medicamentos usados apresentam desvantagens, como efeitos adversos graves e outras limitações (MOTA et al., 2011; SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016). Nesse contexto, tratamentos opcionais tem sido propostos, como por exemplo, o uso de fitoterápicos ou produtos naturais (CARVALHO, 2004). Nesse sentido, o óleo de copaíba tem demonstrado ser promissor, cujos efeitos anti-inflamatórios têm sido extensivamente avaliados em estudos animais e, de forma inicial, mas não definitiva, em humanos (AMES-

SIBIN et al., 2018; FRANCISCO, 2005; KOBAYASHI et al., 2011a; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

O óleo de copaíba refere-se a um óleo resina, cujos componentes químicos, em especial o beta-cariofileno, apresenta efeito sobre inflamações, inibindo a ação de citocinas pró-inflamatórias (ALVES et al., 2017; AMES-SIBIN et al., 2018). Contudo, apesar do seu efeito ter sido demonstrado por vários estudos, sua ação no nível celular, sob o aspecto morfológico ainda não foi totalmente compreendido, em especial sobre modelos de artrite que mimetizam a AR clínica. Dessa forma, a compreensão sobre a morfologia artrítica bem como os efeitos do óleo de copaíba sobre esses aspectos são fundamentais para a compreensão de mecanismos fisiopatológicos envolvidos.

Um das ferramentas utilizadas para o estudo da morfologia da articulação e seus componentes consiste no uso da microscopia eletrônica (ME) (ROSE, 1974), que é útil para analisar a organização interna das células (DATE, 1979; DELRIO; FADDA, 1990; MCDONALD; LEVICK, 1988; MURASHIGE et al., 1999; NIO et al., 2002; ROSA et al., 2018; SHIKICHI, 2000; WYSOCKI, 1972). Entre as diversas tecnologias de ME existentes, destaca-se a microscopia eletrônica de transmissão de varredura (STEM, *Scanning transmission electron microscopy*) (PENNYCOOK; NELLIST, 2011). Tal como acontece com um microscópio eletrônico de transmissão convencional (CTEM, *conventional transmission electron microscope*), as imagens são formadas por elétrons que passam por um espécime suficientemente fino (PENNYCOOK; NELLIST, 2011; WINEY et al., 2014). No entanto, ao contrário do CTEM, no STEM o feixe de elétrons é focado em um ponto fino (com o tamanho de ponto típico 0,05 - 0,2 nm), que é então varrido sobre a amostra em um sistema de iluminação construído de modo que a amostra seja iluminada em cada ponto com o feixe paralelo ao eixo óptico (PENNYCOOK; NELLIST, 2011). A varredura do feixe através da amostra torna STEM adequado para técnicas analíticas, como o contraste-Z para imagem anular de campo escuro e mapeamento espectroscópico por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX, *energy dispersive X-ray*) ou espectroscopia de perda de energia de elétrons (EELS, *electron energy loss spectroscopy*). Esses sinais podem ser obtidos simultaneamente, permitindo a correlação direta de imagens e dados espectroscópicos (EGERTON, 2011). Portanto, um STEM típico é um CTEM equipado com bobinas de varredura adicionais, detectores e circuitos necessários, o que permite alternar entre operar como STEM ou CTEM (PENNYCOOK; NELLIST, 2011).

Embora seja amplamente conhecido as estruturas e funções da membrana sinovial, pouco se sabe sobre os aspectos estruturais e ultraestruturais das pequenas articulações, como

as metatarsoflangeanas (MTF), submetidas a um indutor de artrite aguda, com o animal tratado ou não. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo descrever a morfologia ultraestrutural da articulação MTF de camundongos Balb/c, após 96 h da injeção s.c. de salina ou Zy em pata traseira, usando o método de STEM, observando os aspectos normais e as alterações decorrentes da AZy, sobretudo na membrana sinovial e seus componentes, comparando com morfologia dos diferentes tratamentos empregados (diclofenaco e óleo de copaíba).

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Avaliar qualitativamente o efeito do óleo de copaíba (*Copaifera* spp.) sobre a morfologia ultraestrutural da membrana sinovial de camundongos na artrite aguda induzida por Zymosan.

1.2 Objetivos específicos

- i.** Descrever a morfologia ultraestrutural da MS e seus componentes em articulações artríticas.
- ii.** Relatar os efeitos do óleo de copaíba e do diclofenaco na ultraestrutura dos sinoviócitos de articulações artríticas

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo descritivo, as articulações MTF da pata de camundongos Balb/c foram usados para microscopia eletrônica de transmissão de varredura (STEM), sendo usado de um a dois animais para o grupo Controle, Artrítico não tratado, artrítico tratado com Copaíba e artrítico tratado com diclofenaco.

Os animais induzidos a artrite experimental (AZy) por injeção s.c. de Zy e previamente (30 minutos antes) tratados com óleo de copaíba a 600 mg/kg ou diclofenaco a 100 mg/dL por via oral, foram sacrificados após 96 h de experimentação, para remoção de patas, as quais foram processadas com intuito de analisar as articulações MTF do 2º dígito, seguindo a metodologia descrita por Haddad et al. (2011), que consistiu em fixar a pata imediatamente em solução de glutaraldeído a 2,5% (GTA 2,5%) (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) diluído em tampão fosfato de sódio a 0,1 M em pH 7,3 a 4°C por no mínimo 48 h. As amostras foram processadas inicialmente no Laboratório de Microscopia Quantitativa (LaMiq/ICB/UFAM).

Após o período de fixação, sucedeu-se com a descalcificação em ácido fórmico, desidratação com séries ascendentes de álcoois e óxido de propileno, infiltração e inclusão em resina Fluka Durcupan, ultramicrotomia, contrastação com acetato de uranila e o citrato de chumbo e observação no Microscópio Eletrônico de Varredura LEO 435 VP. Todos os procedimentos relacionados a microscopia eletrônica foram realizados no Laboratório Temático de Microscopia Eletrônica do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (LTME-INPA).

Os espécimes já fixados e descalcificados foram submetidos à etapa de desidratação, que consistiu em passar as amostras por sucessivos banhos em álcool etílico gradativamente concentrados (50%, 70%, 90%, 95% e 100%) por 10 a 15 minutos cada, sendo que a última concentração (100%), o procedimento foi realizado duas vezes. Em seguida, o material passou por dois banhos em óxido de propileno por 15 minutos cada, etapa necessária para transição entre a desidratação por etanol e infiltração por resina Durcupan.

Após o último banho, as amostras passaram por um processo gradativo de infiltração em resina Durcupan (Sigma-Aldrich Brasil Ltda), sendo inicialmente imersas numa mistura de solvente e resina na concentração de 2:1, seguida por resina pura. Em ambas as concentrações de resina as amostras permaneceram *overnight* à temperatura ambiente. Findando o período, a infiltração estava completa e procedeu-se com a inclusão em moldes.

Para a etapa de inclusão, moldes de silicone foram preenchidos com uma mistura de resina com endurecedor, ao qual as amostras foram adicionadas. Os moldes foram levados à estufa a 37-45°C por 3 a 4 dias para completa polimerização da resina.

Os blocos polimerizados contendo as amostras apresentando consistência necessária para serem seccionadas em cortes ultrafinos (10-100nm), foram preparados para serem processados em ultramicrotomo (Leica Microsystems EM UC7/FC7). O preparo consistiu em esculpir, sob o aumento de uma lupa binocular, uma pirâmide, com o auxílio de uma gilete, de modo que atingisse a forma de um trapézio, com a face a cortar bem plana.

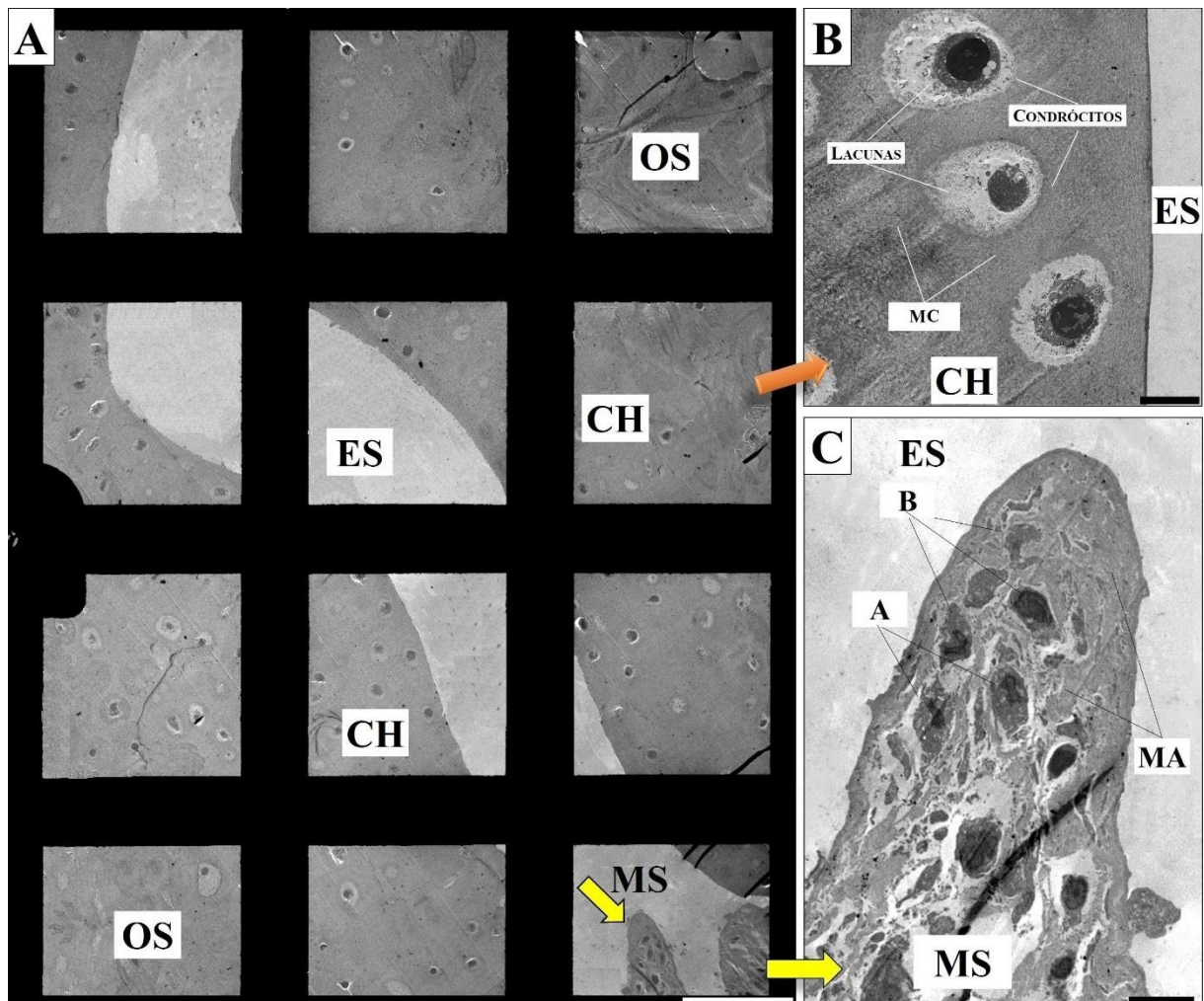
O bloco preparado foi então posicionado no ultramicrotomo para realização dos cortes utilizando navalha de diamante para obtenção de cortes semi-finos (500 nm) para verificar se a estrutura de interesse constava na seção, seguido de seções ultra-finas (70 nm) para observação em microscópio eletrônico. Os cortes semi-finos foram coletados em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina (por um minuto e meio) para observação sob um microscópio de luz. Já as seções ultrafinas foram colhidas em grades de cobre, sendo o material contrastadas com acetato de uranila (por 40 minutos), seguido de citrato de chumbo (por 10 minutos) e então analisadas no microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP, que gera imagens de transmissão (*Scanner Transmission Electron Microscope*; STEM).

4. RESULTADOS

4.1 Membrana sinovial normal

A superfície da articulação MTF de animais Controle (ao qual foi administrado salina por via s.c.) mostrou ultraestrutura normal, com membrana sinovial ocupada por poucos sinoviócitos e abundante matriz amorfa. Não houve evidências de infiltração leucocitária. Adicionalmente, cita-se que o osso periarticular e a cartilagem hialina também apresentaram-se íntegras e o espaço sinovial sem infiltrado celular (Fig. 1).

Figura 1– Ultraestrutura da articulação MTF de animais Controle



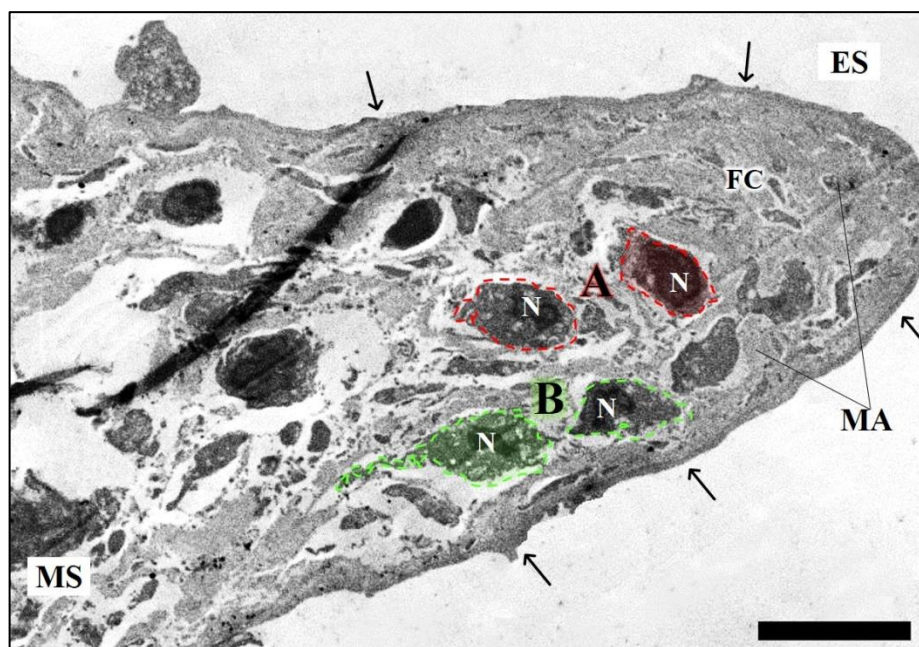
1. Ultramicrografia STEM representativa, demonstrando articulação sinovial MTF de Balb/c do grupo Controle (que receberam injeção s.c. de Salina). (a) Articulação MTF e seus componentes sob malhas da grade de cobre usado em ME, destacando a MS (→); (b) CH vista em maior aumento (11,9 kx), demonstrando condrócitos ocupando lacunas entre abundante matriz colágena (MC); (c) MS observada em maior aumento (4,98kx), com duas a três camadas de sinoviócitos incorporados numa matriz amorfa (MA), em que o tipo B localiza-se próximo a superfície, em contanto com o ES e o tipo A, situa-se na região subjacente à membrana (subíntima). Barras: 50μm (a), 5 μm (b); 5 μm (c).

2. **ES**, espaço sinovial; **CH**, cartilagem hialina; **MS**, membrana sinovial; **OS**, osso; **A**, sinoviócitos tipo A (macrófagos); **B**, sinoviócitos tipo B (fibroblastos); **MC**, matriz cartilaginosa; Seta amarela (→), MS; seta laranja (→), indica região da CH vistas em maior aumento; **MA**, matriz amorfa.

Em maior aumento, a CH apresentou superfície lisa e organizada em camadas celulares normais. Na zona superficial se visualizou uma densidade celular maior, estando os condrócitos dispostos em aglomerados horizontais, organizados em lacunas e abundante material intercelular que forma a matriz cartilaginosa (MC) (Fig. 1b).

A membrana sinovial também apresentou características ultraestruturais normais, limitando-se a região periarticular, apresentando-se hipocelular, composta por uma a duas camadas de células sinoviais (tipo A e tipo B), as quais revestiram a MS para formar a superfície sinovial (íntima) e camada subjacente (subíntima) (Fig. 1b e 2). A superfície, em contato com o espaço, era na maior parte lisa. Dependendo da região, a camada subjacente diferia, sendo ocupada por fibras de colágeno densamente arranjadas, tecido adiposo ou tecido conjuntivo frouxo.

Figura 2– Microscopia eletrônica de transmissão da superfície da membrana sinovial da MTF.



1. Ultramicrografia STEM representativa, demonstrando as características ultraestruturais da membrana sinovial da articulação MTF de Balb/c do grupo Controle (que receberam injeção s.c. de Salina), destacando a superfície sinovial (→), núcleos dos sinoviócitos (N) e feixes de fibras de colágeno (FC) que compõem a matriz amorfa (MA). Os sinoviócitos tipo A (vermelho), ocuparam as camadas mais profundas da MS, apresentando-se globoso e os sinoviócitos tipo B (verde), mais superficiais e com processos citoplasmáticos curtos. Barras: 7 µm.

2. **ES**, espaço sinovial; **MS**, membrana sinovial; **A**, sinoviócitos tipo A (macrófagos); **B**, sinoviócitos tipo B (fibroblastos); **Seta preta longa** (→), superfície sinovial.

Na observação STEM, os sinoviócitos tipo A apresentaram-se como células esféricas ou delgadas cobertas com microvilosidades e micropregas desenvolvidas, ocupando a subíntima da MS (Fig. 2). Nesta região, macrófagos foram embutidos na malha formada por projeções dos sinoviócitos do tipo B. Os núcleos dos macrófagos eram de aparência mais escura que os das células F, devido à rica heterocromatina e o citoplasma com poucos ou nenhum vacúolo.

Já os sinoviócitos do tipo B, corresponderam a maior população de células da camada superficial da MS, em contato com o ES (Fig. 1 e 2). Essas células apresentaram processos citoplasmáticos únicos e curtos, com aspectos planos e dendríticos (Fig.3). Contudo, essas células diferiam em suas formas, localização dos corpos celulares na camada subjacente (subíntima) e distribuição. Os corpos celulares localizaram-se superficialmente na camada sinovial (íntima) e estavam rodeados por amplos espaços intersticiais entre eles. Essas células apresentaram processos citoplasmáticos curtos (3,8 μm) (Fig. 3), que se estendiam dos seus corpos celulares paralelamente à superfície da íntima sinovial (Fig. 2). Tanto os corpos celulares como os processos citoplasmáticos demonstraram aparência lisa, não sendo observadas microprojeções nessas estruturas. Também foram observadas abundantes fibras colágenas dispersas e ligadas aos corpos celulares dessas células e alguns vacúolos nos processos.

Figura 3– Sinoviócitos tipo B com morfologia normal



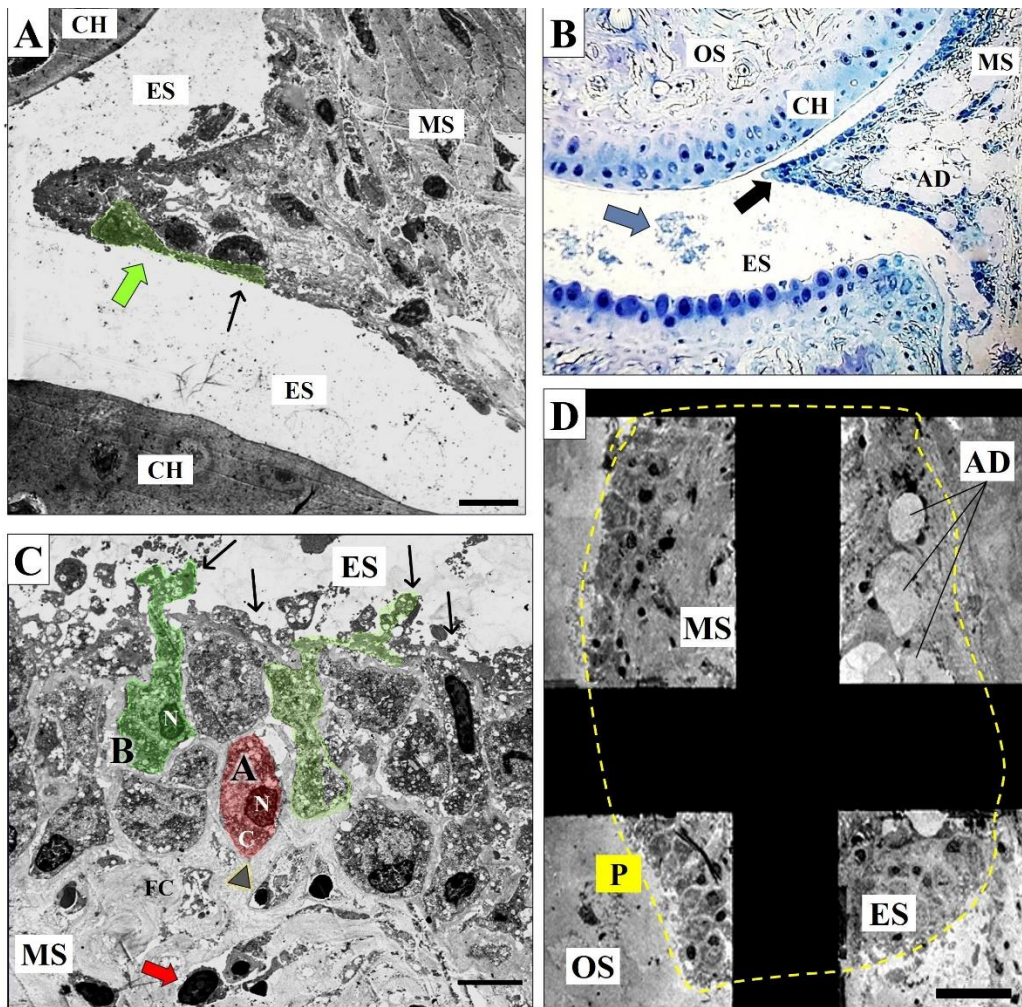
1. Ultramicrografia STEM representativa, demonstrando a ultraestrutura do sinoviócito tipo B da articulação MTF de Balb/c do grupo Controle (que receberam injeção s.c. de Salina), apresentando-se plano e com processos citoplasmáticos curtos (3,8 μm), de aspecto liso (\rightarrow), cromatina nuclear solta. Também é demonstrado FC ao redor da célula e ligadas ao seu corpo celular (\rightarrow). Barra: 2 μm .

2. FC, fibras colágenas; N, núcleo; n, nucléolo; C, citoplasma; Sinoviócitos tipo B (fibroblastos); seta amarela (\rightarrow), FC; seta preta (\rightarrow), processos citoplasmáticos.

4.2 Articulação sinovial em modelo de AZy

A ultraestrutura da articulação sinovial em modelo de AZy mudou drasticamente, sendo observadas proliferação de células sinoviais, que tornou a MS hiperplásica, tanto na região periarticular, como no espaço sinovial. Além disso, foram observadas um aumento de células adiposas, quando comparado ao grupo controle, e infiltrado de células imunes, que ocuparam a matriz amorfa da MS, formando o *pannus* inflamatório, que por sua vez invadiu o espaço sinovial (Fig. 2a-b). Além disso, alterações morfológicas também foram observadas nos demais componentes da articulação, que incluíram degradação do tecido cartilaginoso e invasão do espaço sinovial por células imunes e formação de fibrina, que por sua vez ocupou a superfície da cartilagem articular (Fig. 2c).

Figura 4– Alterações morfológicas de articulação MTF em modelo de AZy



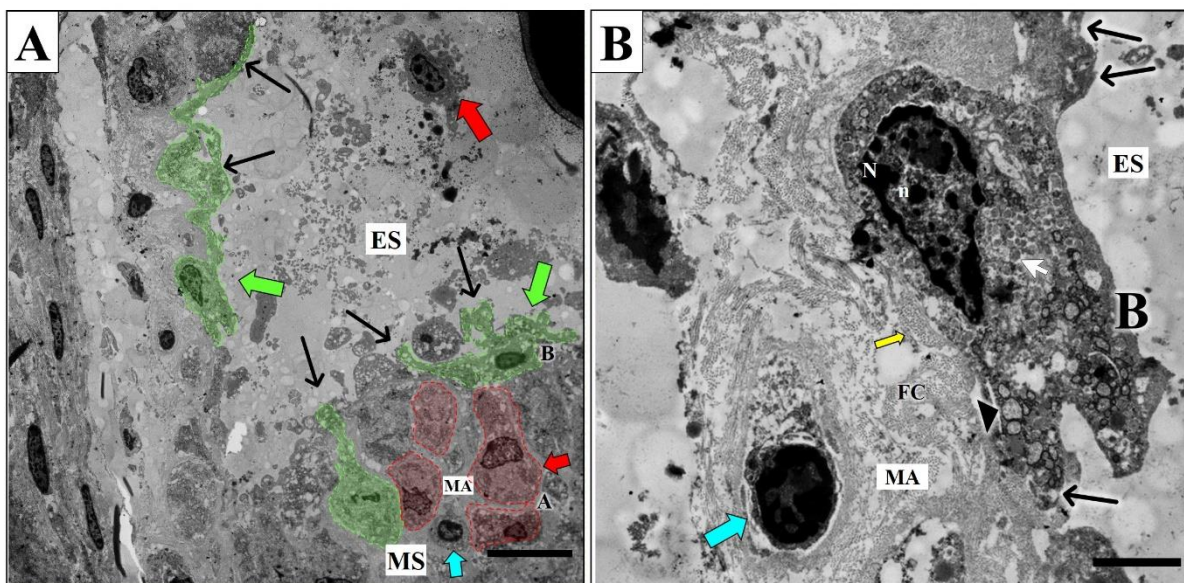
1. Imagens representativas representativa, demonstrando características ultraestruturais da MS da articulação MTF de Balb/c do grupo Artrítico (que receberam injeção s.c. de Zy). (a) MS contendo sinoviócitos do tipo B (verde), localizados mais superficialmente e com processos citoplasmáticos longos (→) que se estenderam radialmente. Também é observado fibrina e debris celulares; (b) Fotomicrografia semi-fino contendo seção histológica da articulação MTF, demonstrando MS projetada para o ES (→), contendo sinoviócitos

hipertróficos, inúmeros adipócitos (AD) e fibrina (→) no ES; (c) MS vista em maior aumento (7,03 kx), destacando os sinoviócitos que variaram em morfologia, em que os tipo B (em verde) apresentaram corpos celulares que ocupavam a subítima e os seus processos citoplasmáticos (→) projetaram-se para superfície da MS. Também são observados sinoviócitos tipo A (vermelho), localizado na camada subjacente, e vasos linfáticos (▶); (d) Articulação MTF e seus componentes sob malhas da grade de cobre usado em ME, destacando pannus inflamatório (tracejado amarelo) invadindo o ES. Também são observados vários adipócitos (AD). Barras = 8µm (a), 7 µm (c) e 35 µm (d).

2. MS, membrana sinovial; ES, espaço sinovial; CH, cartilagem hialina; OS, osso; AD, adipócitos; A, sinoviócitos tipo A (macrófagos); B, sinoviócitos tipo B (fibroblastos); FC, fibras colágenas; N, núcleo; C, citoplasma; Seta verde (→), sinoviócitos tipo B; Seta preta longa (→), processos citoplasmáticos; Seta azul (→), fibrina; Seta preta (→), MS; Seta vermelha (→), células imunes; Seta cinza (▶), vasos linfáticos.

Os sinoviócitos do tipo B (tipo fibroblastos) aumentaram em número e encobriram a camada superficial da MS (íntima). Essas células continham corpos celulares que ocupavam as camadas mais profundas da MS (subítima) e demonstraram processos citoplasmáticos que se projetaram dos seus corpos celulares em direção à camada superficial da MS, para o espaço sinovial (Fig. 2b). Por vezes, esses processos se estendem verticalmente ou obliquamente a partir de seus corpos celulares em direção à superfície da membrana sinovial para formar uma rede fina e densa composta por processos mais longos (~38,7 µm) do que os das células tipo B normais na superfície da membrana sinovial (~4 µm) (Fig. 3a). Ainda, os corpos celulares e os processos dessas células desenvolveram inteiramente em sua superfície celular como projeções pregueadas e semelhantes a vacúolos (Fig. 3b).

Figura 5– Ultraestrutura dos sinoviócitos em modelo de AZy



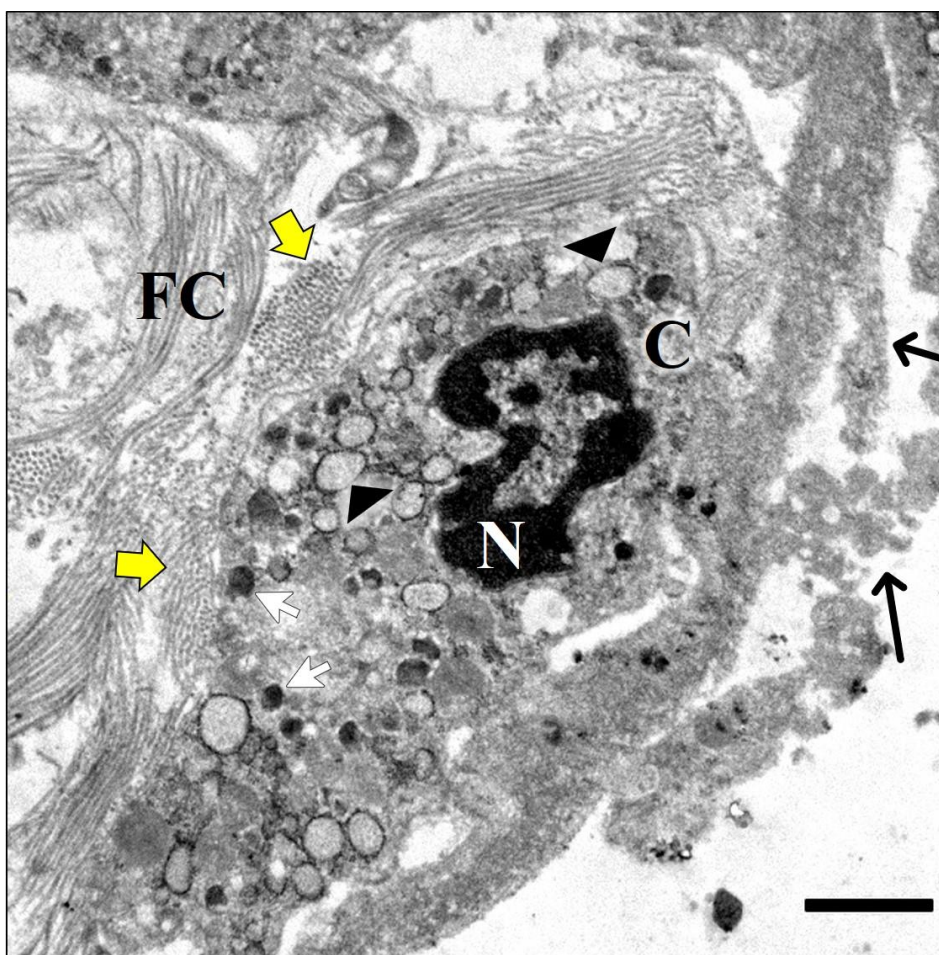
1. Ultramicrografias STEM representativas, demonstrando a ultraestrutura dos sinoviócitos em articulação MTF de Balb/c do grupo Artrítico (que receberam injeção s.c. de Zy). (a) MS hiperplásica, destacando os sinoviócitos tipo B (verde), que variaram em morfologia, alguns com corpo celular ocupando a subítima e processos citoplasmáticos (→) projetados verticalmente para o ES, outros localizados mais superficialmente (íntima) e com processos (→) mais longos (38,7µm), que se estendem paralelamente à superfície da MS. Na imagem também são destacadas os sinoviócitos tipo B (→) também em maior número, células imunes no ES e na matriz amorfa da MS (→); (b) Sinoviócitos tipo B observada em maior aumento (25 kx), com processos citoplasmáticos pregueadas (→), cisternas repletas de ribossomos (▶) e citoplasma rico em RER (⇨). Ainda,

observa-se MA com abundantes fibras colágenas dispersas e ligadas ao corpo celular (→) do sinoviócito tipo B. Barras= 10µm (a), 2 µm (b).

2. MS, membrana sinovial; ES, espaço sinovial; A, sinoviócitos tipo A (macrófagos); B, sinoviócitos tipo B (fibroblastos); MA, matriz amorfa; FC, fibras colágenas; N, núcleo; n, nucléolo; Seta verde (→), sinoviócitos tipo B; Seta vermelha (→), células imunes; Seta preta longa (→), processos citoplasmáticos; Seta preta curta (▶), vesículas com ribossomos; Seta branca (⇨), REr.

Na observação STEM observou-se que as células tipo B desenvolvem retículo endoplasmático rugoso (REr) mais abundante no citoplasma do que as células normais, e os lúmens do rER foram conspicuamente prolongados. Além disso, também apresentaram vesículas dilatadas repletas de ribossomos e abundante fibras colágenas dispersas e próximas ao seu corpo celular (Fig.6).

Figura 6- Morfologia dos sinoviócitos tipo B na articulação artrítica

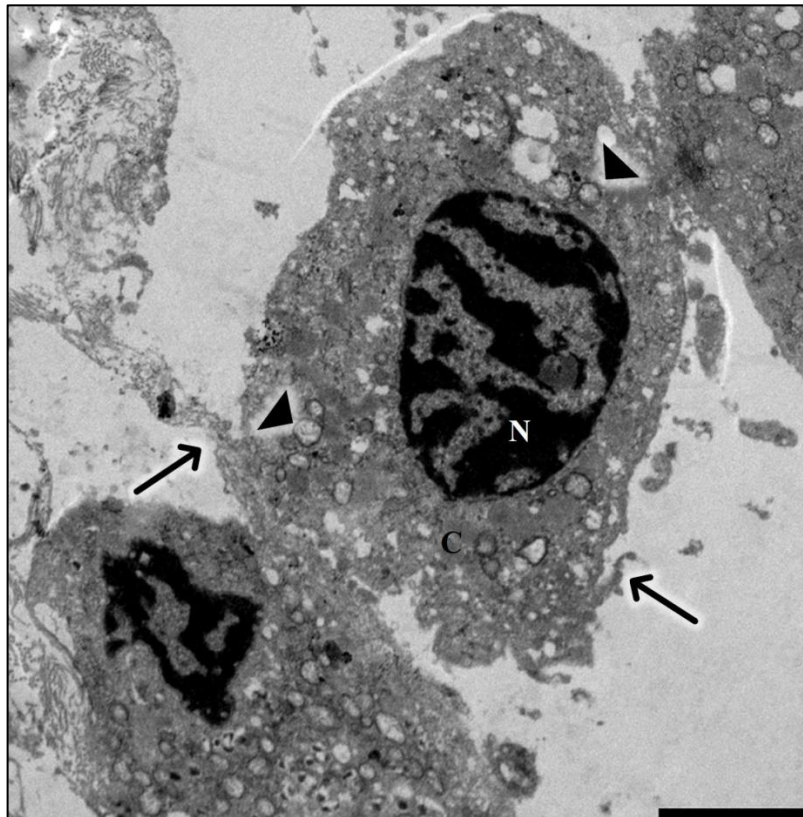


1. Ultramicrografia STEM representativa, demonstrando sinoviócito tipo B da articulação MTF de Balb/c do grupo Artrítico (que receberam injeção s.c. de Zy), com cromatina nuclear frouxa, citoplasma rico em REr (⇨) e vesículas rodeadas por ribossomos (▶) e processos citoplasmáticos prolongados e rugosos (→). Também é demonstrado FC dispersa e ligadas ao corpo celular (→). Barra = 1 µm, 46,3kx.

2. FC, fibras colágenas; N, núcleo; n, nucléolo; C, citoplasma; rER, retículo endoplasmático rugoso; Seta amarela (→), fibras colágenas; Seta preta longa (→), processos citoplasmáticos; Seta preta curta (▶), vesículas com ribossomos; Seta branca (⇨), REr.

Os sinoviócitos tipo B predominaram na MS artrítica, os quais foram identificados como células esféricas, cobertas com microvilosidades desenvolvidas, demonstrando microprojeções de forma irregular em sua superfície e grande número de vacúolos em seu citoplasma. Os núcleos dos macrófagos eram de aparência mais escura que os do sinoviócitos tipo B, devido à rica heterocromatina (Fig.7).

Figura 7- Sinoviócitos tipo A em modelo de AZy

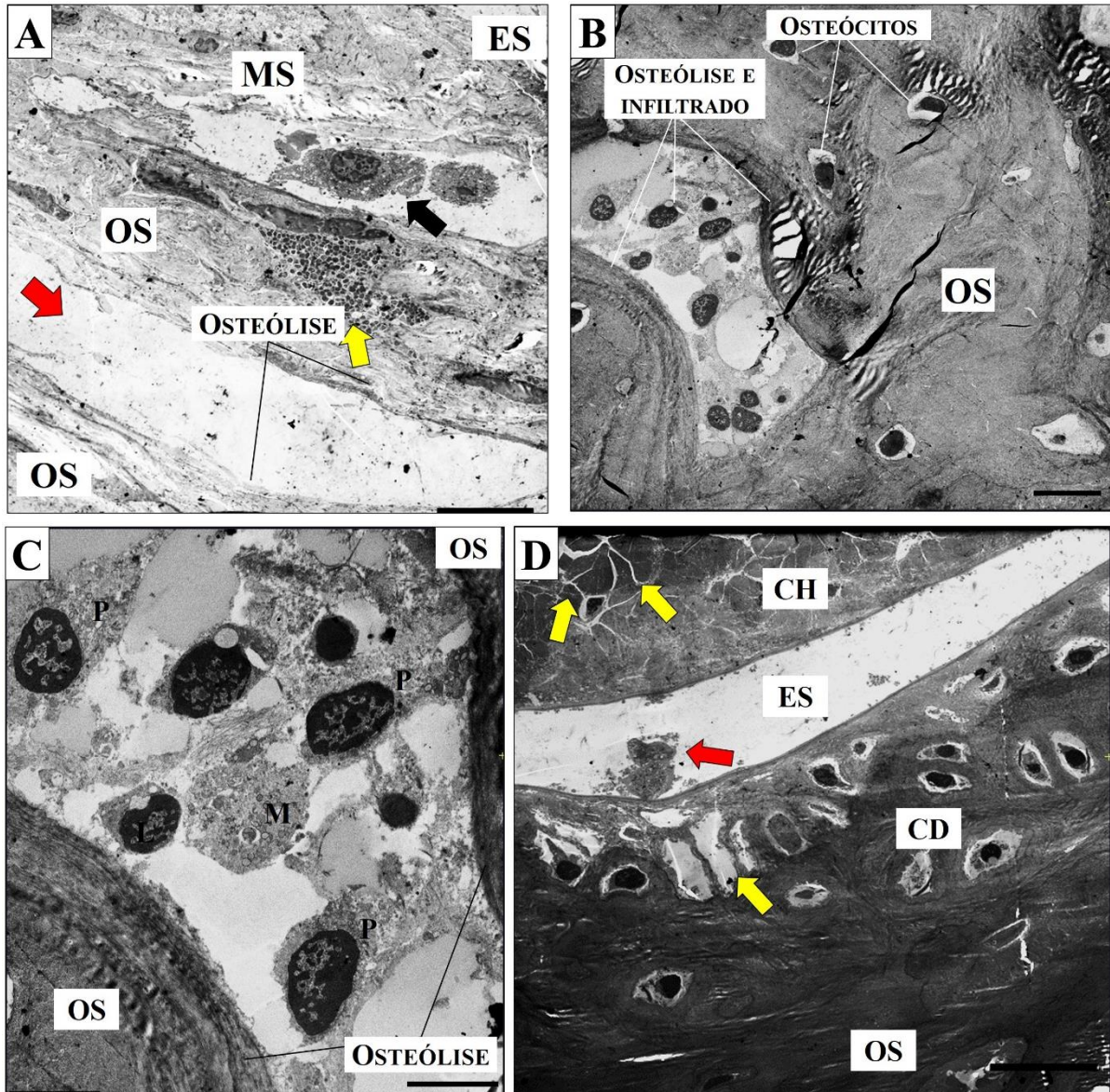


1. Ultramicrografia STEM representativa, demonstrando ultraestrutura dos sinoviócitos tipo A (macrófagos) em MS de articulação MTF de Balb/c após 96h da aplicação s.c. de Zy, apresentando núcleo globoso, com cromatina frouxa, citoplasma com inúmeros vacúolos (▶), que variam em tamanhos e densidades de seu conteúdo, microprojeções irregulares em sua superfície (→). Barra = 2 µm.

2. N, núcleo; C, citoplasma; Seta preta curta (▶), vacúolos citoplasmáticos; Seta preta longa (→), microprojeções.

As articulações sinoviais dos animais artríticos também demonstraram alteração no osso periarticular, apresentando região de erosão óssea (osteólise), infiltrado de células imunes e degradação de cartilagem (Fig. 8).

Figura 8- Alterações morfológicas do osso periarticular de articulação MTF em modelo de AZy



1. Ultramicrografia STEM representativa, demonstrando ultraestrutura da articulação sinovial MTF de Balb/c do grupo Artrítico (que receberam injeção s.c. de Zy). (a) Erosão óssea (osteólise) (→), grânulos de monócitos no tecido ósseo (→) e sinoviócitos tipo A no ES (→) (4,35kx); (b) Área erodida (osteólise) invadida por células imunes (4,28kx); (c) Área de osteólise vista em em maior aumento (12,5kx), evidenciando células imunes mononucleares (→); (d) CH demonstrando pontos de degradação da matriz cartilaginosa (→) (3,92 kx), infiltrado de células imunes (→) e fibrina no ES. Barras: 10 µm (a), 10 µm (b), 10 µm (c) e 15 µm (d).

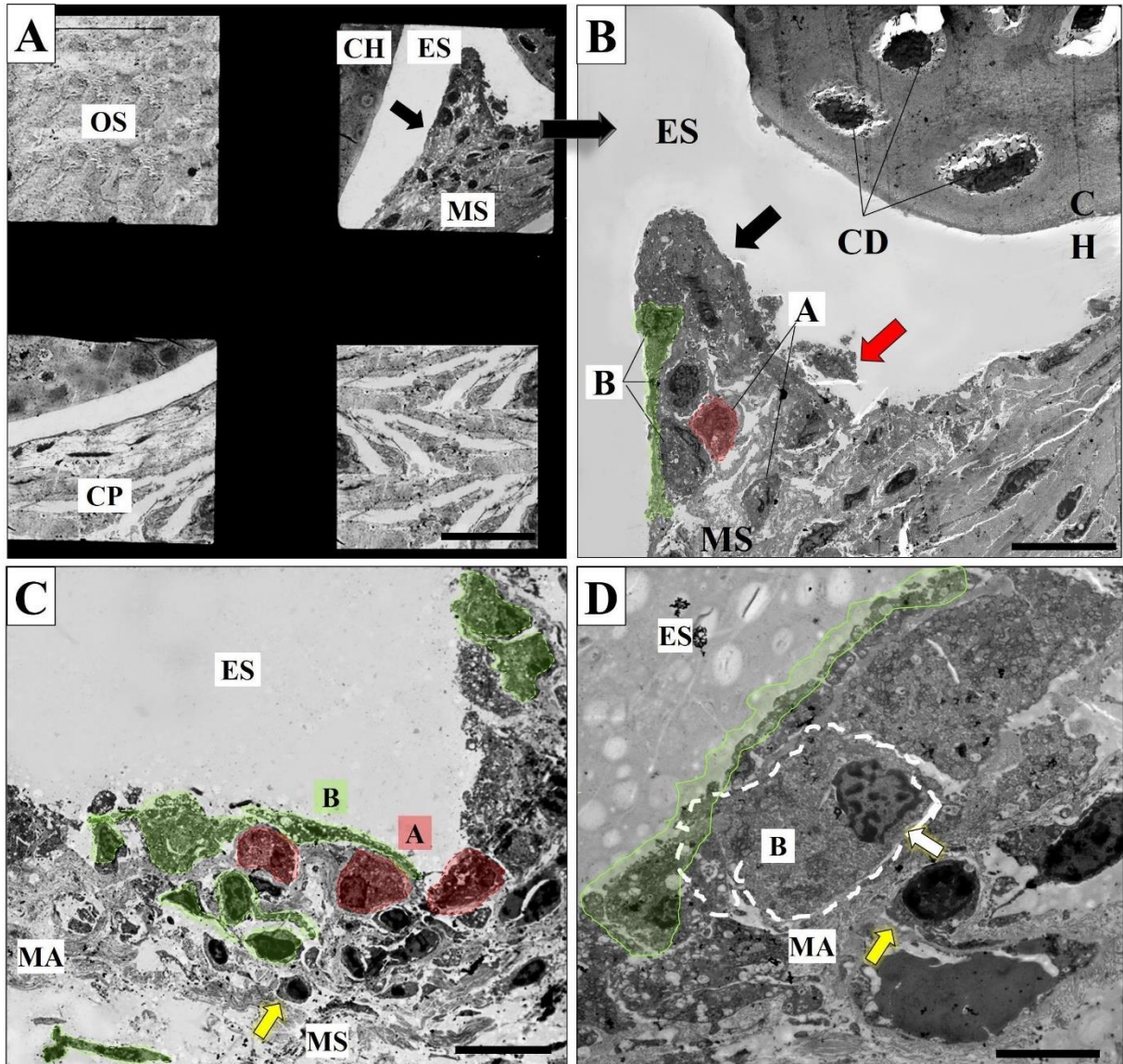
2. MS, membrana sinovial; ES, espaço sinovial; CH, cartilagem hialina; OS, osso; MA, matriz amorfa; MC, matriz cartilaginosa; CD, condrócitos; P, plasmócitos; L, linfócitos; M, macrófagos

4.3 Membrana sinovial em modelo de AZy tratados

A membrana sinovial de animais artríticos tratados com óleo de copaíba (600 mg/kg) e diclofenaco demonstraram modificações histológicas sutis, quando comparado ao grupo controle. Onde destaca-se o grupo tratado com OC, que demonstraram uma discreta proliferação da MS. Contudo, não invadiu o espaço sinovial e ainda manteve um certo nível

de organização. O osso periarticular e a cartilagem hialina também apresentaram morfologia normal, com o tecido íntegro e contínuo (Fig. 9).

Figura 9 – Morfologia da MS em animais artríticos tratados com óleo de copaíba.

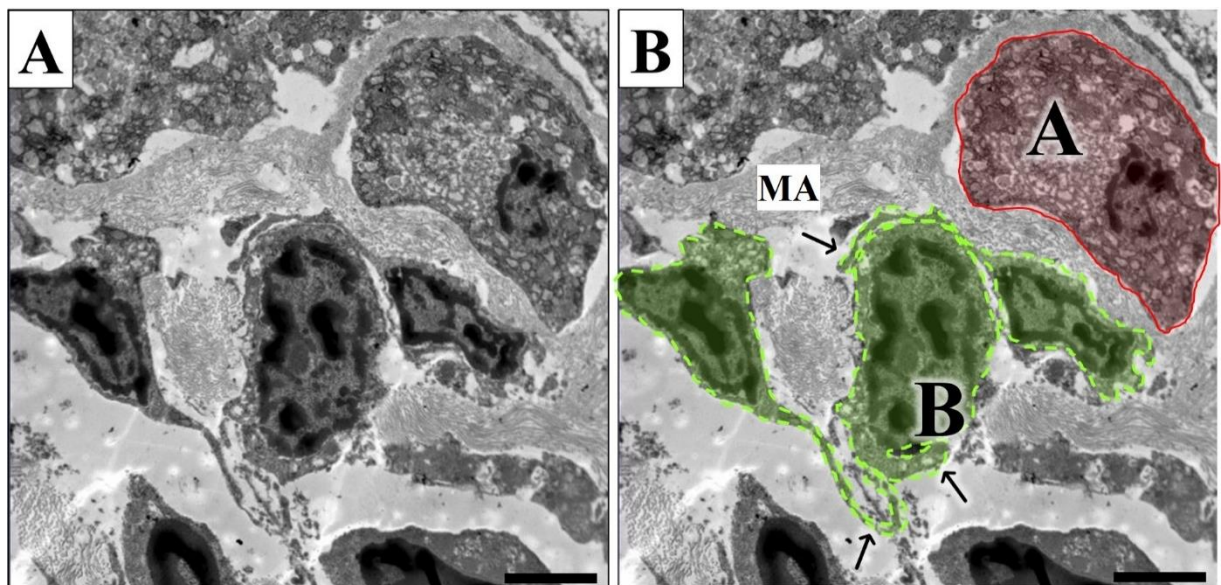


1. Ultramicrografia STEM representativa, demonstrando articulação sinovial MTF de Balb/c do grupo Artrítico (que receberam injeção s.c. de Zy) tratado com óleo de copaíba. (a) Campo microscópico sob malhas da grade de cobre usado em ME, destacando membrana (→); (b) Campo visto em maior aumento (5,47kx), demonstrando MS hipocelular, com células compactadas, imersas em abundante matriz amorfa e cercadas por processos citoplasmáticos, com sinoviócitos tipo B localizados superficialmente e com longos processos citoplasmáticos (destacado em verde) e sinoviócitos tipo A (vermelho); (c) Maior aumento (5,97kx), a composição da MS, com sinoviócitos com morfologia variada (verde) e célula imune (→); (d) Células sinoviais vistas em maior aumento (16,7kx), em que observa-se o tipo B com longo processo citoplasmático (17µm) (verde) e outro mais curto (3,7µm) e cuboide (branco). Barras=30 µm (a), 12 µm (b), 10 µm (c) e 4 µm (d)

2. MS, membrana sinovial; ES, espaço sinovial; CH, cartilagem hialina; OS, osso; A, sinoviócitos tipo A (macrófagos); B, sinoviócitos tipo B (fibroblastos); MA, matriz amorfa; Seta amarela (→), células imunes; Seta preta (→), MS.

A MS dos animais artríticos tratados com OC apresentou-se hipocelular na região projetada para o espaço sinovial. Uma sutil proliferação da membrana foi observada na região periarticular. Curiosamente, as células sinoviais desse grupo demonstraram-se densamente arranjadas, sendo o espaço intercelular ocupado por processos citoplasmáticos do sinoviócitos tipo B ou por matriz amorfa cartilaginosa. Os sinoviócitos tipo B ocuparam a camada superficial da MS (íntima), que variaram em morfologia, em que alguns apresentava-se planos, com processos citoplasmáticos longos (17 μm), que cobriam toda superfície da MS, outros mais curtos (3,7 μm) (Fig. 9d). Fato que merece ser destacado, é que foram observados nesse grupo vários sinoviócitos com formato cuboide e com processos curtos. Sobre os sinoviócitos do tipo B, a maioria apresentou morfologia normal, esféricos com núcleo globoso e vacúolos citoplasmáticos pequenos e pouco densos, não sendo observado RER significativo, quando comparado ao grupo artrítico.

Figura 10– Sinoviócitos em articulação MTF de camundongos Balb/c tratados com óleo de copaíba



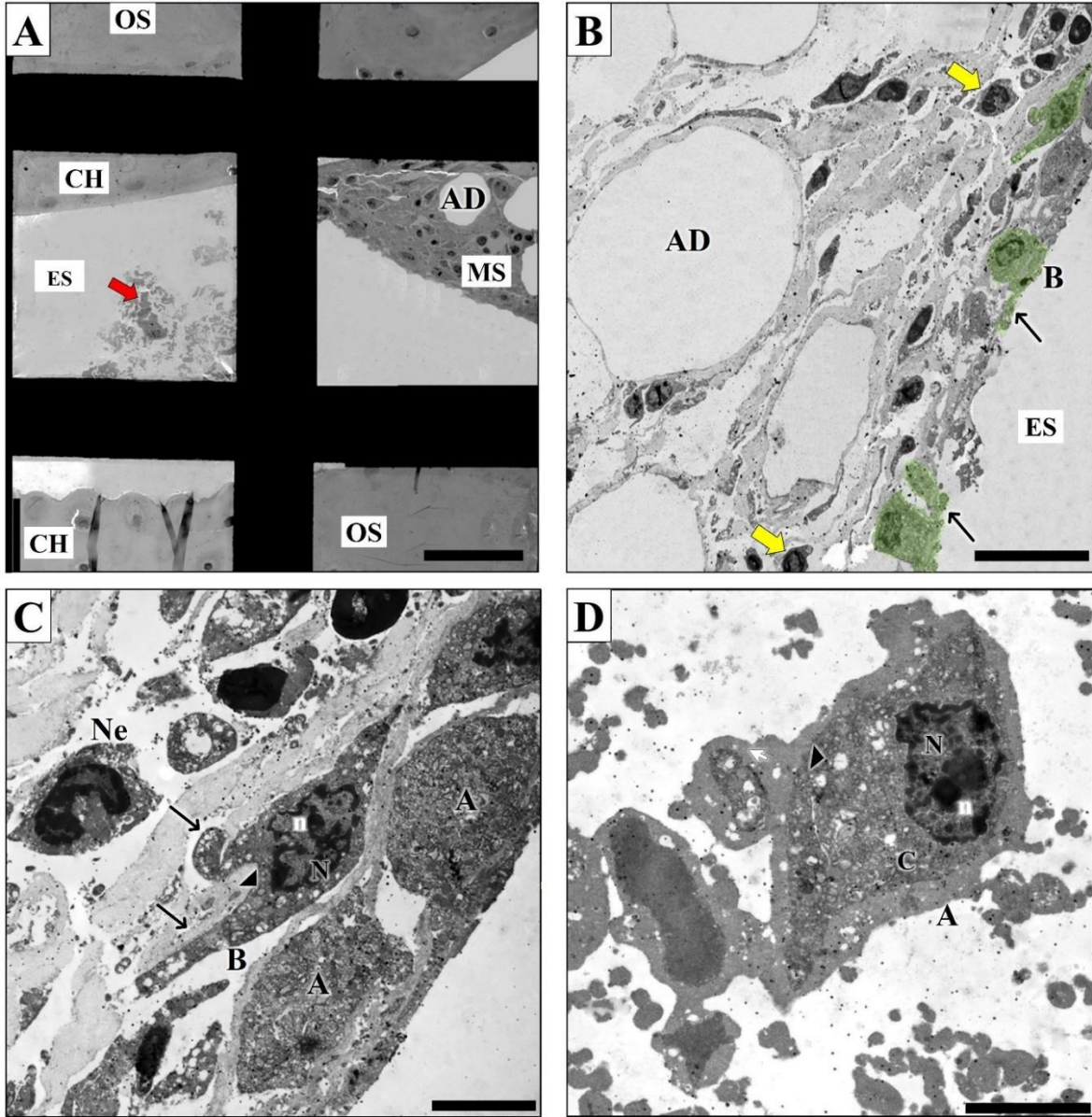
1. Ultramicrografia STEM representativa, demonstrando a morfologia dos sinoviócitos de Balb/c artríticos tratados com óleo de copaíba, sem (a) e com (b) identificações. Na imagem observam-se células sinoviais em matriz amorfa colágena, com sinoviócitos do tipo B (verde) apresentando processos citoplasmáticos que se projetam e recobrem a superfície celular, interligando-as, e sinoviócitos tipo A cuboide. Barra: 2 μm .

2. **MA**, matriz amorfa; **A**, sinoviócitos tipo A (macrófagos); **B**, sinoviócitos tipo B (fibroblastos); **Seta preta** (\rightarrow), projeções membranas.

O grupo artrítico tratado com diclofenaco também resultou em aumento da MS (Fig. 11a), que se projetou para a luz do ES, mas restrita à região periarticular, composta por sinoviócitos tipo B, demonstrando processos citoplasmáticos curtos (6 μm) (Fig. 11c), diferindo em localização, alguns ocupando a íntima e outros a subíntima. Vale destacar, que nesse grupo os sinoviócitos tipo B prevaleceram na camada superficial (Fig. 11c), e ainda

foram observados adipócitos e alguns neutrófilos envolvidos por matriz amorfa. Ainda, no espaço sinovial foi observado um sinoviócito do tipo A, repleto de debris celulares (Fig. 11d).

Figura 11– Articulação sinovial MTF de modelo animal de AZy tratados com diclofenaco



Ultramicrografia STEM representativa, demonstrando a ultraestrutura da membrana sinovial de Balb/c artríticos tratados com diclofenaco; (a) Campo microscópico sob malha da grade de cobre usado em ME, demonstrando MS projetada para a luz do ES, hipocelular, com adipócitos (AD) e célula no ES rodeada por debris e fibrina (→); (b) Vista da MS em maior aumento (5kx), destacando sinoviócitos tipo B (verde) com morfologia variada e processos citoplasmáticos curtos (→) que projetaram-se paralelamente à superfície da MS; (c) Sinoviócito tipo B com processos curtos (6 µm) (→), heterocromatina frouxa e vesículas rodeadas por ribossomos (16,7kx). Ainda são observados neutrófilo (Ne) e Sinoviócitos tipo A ocupando a camada superficial da MS; (d) Sinoviócito tipo A ocupando o ES, com vacúolos citoplasmáticos (▶), rodeado por fibrina e debris celulares (20,kx). Barras: 40 µm (a), 15 µm (b), 4 µm (c), 4 µm (d).

2. MS, membrana sinovial; ES, espaço sinovial; CH, cartilagem hialina; OS, osso; A, sinoviócitos tipo A (macrófagos); B, sinoviócitos tipo B (fibroblastos); MA, matriz amorfa; N, núcleo; n, nucléolo; C, citoplasma Ne, neutrófilo; AD, adipócitos; Seta vermelha (→), sinoviócito tipo A; Seta amarela (→), neutrófilos; Seta preta longa (→), processos citoplasmáticos; Seta preta curta (▶), vacúolos citoplasmáticos.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo evidenciou a ultraestrutura da articulação sinovial MTF em modelos de artrite induzida por Zy (AZy), sob diferentes condições: saudáveis (ao qual foi administrado salina por via s.c.), artrítico não tratado e artríticos tratados (Diclofenaco a 100 mg/kg e Copaíba a 600 mg/kg), dando ênfase a membrana sinovial e seus componentes.

Modelos experimentais têm sido empregados ao longo dos anos para descrever a ultraestrutura da articulação sinovial, principalmente a membrana sinovial, sob aspectos morfológicos normais (DATE, 1979; DELRIO et al., 1999; DURO et al., 2012; MURASHIGE et al., 1999; NIO et al., 2002; SHIKICHI et al., 1999; WY SOCKI, 1972) ou sob condições patológicas (JIANG et al., 2017; MCDONALD; LEVICK, 1988; NIO et al., 2002). Os modelos animais incluídos em tais estudos variam em relação a espécie, das quais citam-se cão (WY SOCKI, 1972), cavalo (SHIKICHI et al., 1999), coelhos (DATE, 1979; DELRIO et al., 1999; MCDONALD; LEVICK, 1988; NIO et al., 2002) e rato (MURASHIGE et al., 1999), a articulação analisada, que incluem principalmente o joelho (articulação femoral-tibial) ou mandíbula (articulação temporomandibular). Ainda, quando analisado sob os aspectos patológicos, as análises basicamente concentraram-se em modelos de osteoartrite (JIANG et al., 2017; NIO et al., 2002).

Dessa forma, estudos que abordem a ultraestrutura da membrana sinovial em artrite experimental que mimetizam a AR é escasso, sobretudo em relação aos mecanismos que envolvem pequenas articulações, o que é de suma importância para correlação com a AR clínica, tendo em vista que a doença envolve caracteristicamente as pequenas articulações das mãos e dos pés, embora a inflamação articular maior também seja frequente (BARTOK; FIRESTEIN, 2010; GABRIEL; MICHAUD, 2009). E ainda, sob a ótica de terapêuticas alternativas, tal como demonstrado no presente estudo, que evidenciou a ultraestrutura da MS artrítica sem tratamento, com tratamento padrão (diclofenaco) e alternativo (copaíba) para articulação artrítica.

Nesse contexto, o presente estudo demonstrou que a MS da articulação MTF dos animais do grupo Controle, após 96 h da aplicação s.c. de salina, demonstrou morfologia ultraestrutural compatível com as descritas na literatura (DURO et al., 2012; IWANAGA et al., 2000; SHIKICHI et al., 1999), que definem a MS como um revestimento articular normalmente delicada e com baixa celularidade, principalmente no tecido adulto (DURO et al., 2012; FELLOWS et al., 2016), que se divide em dois compartimentos anatômicos e

funcionais: a camada de revestimento superficial (íntima sinovial) e a camada subjacente (subíntima), composta normalmente, de duas a três células sinoviais (NIO et al., 2002; SINGH et al., 2004a; SMITH; WECHALEKAR, 2015). No presente estudo, os grupos Controle, Cop600 e Diclo apresentaram baixa celularidade, sendo por vezes observada apenas uma monocamada de células sinoviais, em que no grupo controle os dois tipos celulares eram equivalentes em número. Em contrapartida, o grupo artrítico demonstrou uma proliferação dessas células sinoviais, que invadiram o espaço sinovial. O que condiz com a literatura, sendo relatado que a maioria dos estados de doença artrítica, como a AR, o número de células da íntima aumenta (SMITH; WECHALEKAR, 2015; SMOLEN et al., 2016).

Sobre a ultraestrutura dos sinoviócitos normais, o tipo B é descrito como uma célula que pode apresentar-se sob diferentes aspectos morfológicos, podendo ser planos ou de forma dendrítica, o que também designa funções diferentes para essas células (BARLAND; NOVIKOFF; HAMERMAN, 1962; SMITH; WECHALEKAR, 2015). No presente estudo, essas células também apresentaram morfologia variada, alguns demonstrando processos citoplasmáticos curtos (~4 µm) e outros extensos (~40 µm), que por vezes se estendiam de ambos os lados dos seus corpos celulares e outros apenas de um dos lados. Ainda, esses processos também variaram em relação a sua projeção, projetando-se verticalmente ou obliquamente a partir dos seus corpos celulares em relação ao espaço sinovial.

Sobre as funções do sinoviócitos tipo B dendrítico é atribuído função secretora, que incluem a secreção de glicosaminoglicanos, como ácido hialurônico e fibronectina, no líquido sinovial e na matriz intercelular (IWANAGA et al., 2000). Inicialmente essa ideia foi sustentada pela descoberta de que sinoviócitos do tipo B desenvolveram RER mais abundante em seu citoplasma do que o tipo plano (NIO et al., 2002). Posteriormente, foi definido que essas células expressam CD55, sendo este um marcador que pode ser usado para distinguir as células sinoviais (SMITH, 2011; SMITH et al., 2003; STEVENS; MAPP; REVELL, 1990). No presente estudo, o tipo dendrítico nos grupos artríticos foram bem evidentes, os quais exibiram RER mais abundante em contraste com o grupo Controle.

Já os sinoviócitos tipo A são descritos como macrófagos verdadeiros, derivados de monócitos do sangue, sendo encontrados nas regiões intimal e subintimal da sinóvia normal (SMITH, 2011; SMITH et al., 2003). O tipo A intimais carregam marcadores de linhagem de macrófagos típicos, sendo fortemente positivos para CD163 e CD68, mas menos para CD14 (BAETEN et al., 2002; FONSECA et al., 2002). No entanto, os sinoviócitos tipo A constituem uma minoria de células na íntima normal, enquanto os números na artrite

inflamatória aumentam dramaticamente e no tecido sinovial de AR representam até 80% da camada íntima (SMITH; WECHALEKAR, 2015).

Nesse contexto, os resultados encontrados no presente são condizentes com os descritos na literatura, pois uma mudança notável no modelo de AZy foi justamente proliferação dos sinoviócitos, estando ambos os tipos celulares aumentados, principalmente no grupo não tratado, demonstrando aumento no número de células sinoviais na região periarticular, que avançou para o espaço sinovial. Esse achado está em concordância com estudos anteriores que avaliaram a membrana sinovial em processos inflamatórios (SHIKICHI et al., 1999), os quais atribuem o aumento do número de sinoviócitos tipo B ao aumento de mitose e ao tipo A a uma série de processos que estão sob controle de citocinas e moléculas de adesão celular, levando ao influxo de macrófagos do compartimento vascular (HENDERSON; REVELL; EDWARDS, 1988; SINGH et al., 2004a; SMITH, 2011).

Outra alteração morfológica dos sinoviócitos do tipo B no presente modelo de AZy foi caracterizada pela presença de processos citoplasmáticos significativamente extensos. Esse achado também é sustentado por dados previamente publicados (MCDONALD; LEVICK, 1988; NIO et al., 2002), que citam que essas células se tornaram mais dendríticas quando expostas a agentes indutores de inflamação. A extensão dos processos citoplasmáticos dos sinoviócitos tipo B é uma ocorrência comum em modelos inflamação sinovial (SHIKICHI et al., 1999). Contudo, dados da literatura indicam que esses processos geralmente, em articulações normais atingem de 2-4 μm e ocasionalmente pode ser ampliado para ser maior que o corpo celular (acima de 10 μm) (SHIKICHI et al., 1999). Nesse contexto, no presente estudo, os processos dos sinoviócitos tipo B de animais artríticos chegaram a atingir, aproximadamente 40 μm , sendo aproximadamente duas vezes maior que o seu corpo celular (~15 μm), cobrindo grande parte da superfície sinovial. Sendo bastante distinto dos demais grupos (Controle, Cop600 e Diclo) com processos citoplasmáticos medindo 3,8 μm , 3,7-17 μm e 3,2-6 μm , respectivamente.

Adicionalmente, os sinoviócitos tipo B no modelo de AZy também apresentaram RER extenso com cisternas dilatadas, o que indica síntese proteica ativa. Nesse contexto, sabe-se que os componentes proteicos do líquido sinovial, como as metaloproteinases, aumentam em várias doenças articulares, incluindo artrite e outras desordens articulares (ISHIGURO et al., 1999a, 1999b; SHIKICHI et al., 1999; WALAKOVITS et al., 1992).

Outro achado comum no presente modelo de AZy foi o desenvolvimento de vilosidades nos sinoviócitos tipo B, que assemelharam-se a pregas, que ainda continham estruturas semelhantes a vesículas em suas superfícies celulares. Tal alteração também foi

documentada em modelos de osteoartrite (SHIKICHI et al., 1999), em articulação com hemartrose experimental (DATE, 1979) e em articulação cuja pressão foi artificialmente aumentada (MCDONALD; LEVICK, 1988). O desenvolvimento de microprojeções aumenta a área superficial dos sinoviócitos tipo B em contato com espaço sinovial, o que pode ser vantajoso para as funções secretora e absorptiva dessas células (IWANAGA et al., 2000).

O aumento do número de células na íntima sinovial foi observado em ambos os tipos de sinoviócitos. Contudo, o tipo A prevaleceu na membrana artrítica. Dados publicados por Smith e Wechalekar (2015) corroboram com os encontrados no presente estudo, que citam esse tipo celular predominante na artrite inflamatória, representando até 80% da camada íntima. O que distingue do modelo de osteoartrite, em que um estudo realizado por Shikichi et al. (1999) demonstrou o tipo B é mais predominante nessa condição.

Adicionalmente, no presente estudo, os sinoviócitos do tipo A desenvolveram muitos vacúolos citoplasmático, indicando sua atividade fagocitária estimulada (KENNEDY et al., 2011). Eles podem fagocitar ativamente restos celulares e produtos de clivagem no espaço sinovial e produzir alguns mediadores inflamatórios. Em algumas doenças articulares, o líquido sinovial apresenta concentrações elevadas de interleucina-1(IL-1) (DI GIOVINE et al., 1987), IL-6 (SWAAK et al., 1988) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (PARTSCH et al., 1997), que podem ser liberado de macrófagos ativado (BERTAZZOLO et al., 1994; KUBOTA et al., 1998) (KUBOTA et al., 1998).

Sobre a infiltração de células imunes na membrana sinovial, verificou-se que no grupo artrítico não tratado predominarem células mononucleares. Algumas dessas células apresentaram características morfológicas compatíveis com linfócitos, sendo descrito que a maioria dessas células apresenta ultraestrutura similar, sendo pequenas (7-9 μm) e com uma fina borda de citoplasma (CROSS; MERCER, 1993). Entretanto, por meio de ME não é possível distinguir os tipos B e T. Entretanto, os plasmócitos são diferenciados, com núcleo excêntrico, complexo de Golgi bem desenvolvido e citoplasma repleto de retículo endoplasmático rugoso dilatado contendo muitas cópias de um único tipo de anticorpo (CROSS; MERCER, 1993). Essas células fornecem defesa contra a entrada de matéria estranha, cruzando uma barreira epitelial. As células plasmáticas locais sintetizam e liberam especificamente IgA, o anticorpo das secreções (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008) .

O perfil de células imunes nos animais artríticos e é condizente com estudos previamente publicados, que descrevem o pico de influxo de neutrófilos no espaço sinovial na 6^o hora após a injeção do estímulo (GEGOUT et al., 1995). Após esse período, o infiltrado é repleto de células mononucleares como linfócitos e macrófagos (SINGH et al., 2004b).

Curiosamente, o grupo tratado com diclofenaco foi distinto dos demais, pois apresentou neutrófilos na membrana sinovial.

Em relação aos efeitos do óleo de copaíba sobre a ultraestrutura da MS em modelo de AZy, pode-se inferir que foi parcialmente eficaz, tendo em vista que as alterações ultraestruturais foram consideradas sutis, quando comparado ao grupo Artrítico não tratado. Nesse contexto, destaca-se que apesar de ter sido observado a proliferação de células sinoviais, não invadiu o espaço sinovial e ainda manteve um certo nível de organização. Inclusive, quando comparado ao Controle e ao Artrítico, essas células apresentaram-se mais compactadas. Além disso, a morfologia também foi distinta quando comparada aos grupos supracitadas, em que demonstraram um aspecto mais cuboide, dando a impressão que elas organizaram-se para formar uma barreira superficial, tendo em vista que os espaços intercelulares estavam totalmente ocupados, sendo pelo contato próximo entre uma célula e outra, ou pelo processo citoplasmático dos sinoviócitos que encobriam todas os espaços, formando uma margem limitante aparente na MS. Em relação a ultraestrutura, os sinoviócitos variaram, algumas demonstraram aspectos morfológicos semelhantes ao Controle, ou seja, com REr quase imperceptível e cisternas ou vacúolos ausentes, outras poucas apresentaram a mesma estrutura do Artrítico, ou seja, citoplasma repletos de REr, cisternas dilatadas e grande número de vacúolos citoplasmáticos.

Contudo, os sinoviócitos do tipo B também demonstraram extensos processos citoplasmáticos (17µm), porém inferior ao grupo Artrítico. Além disso, esses processos basicamente projetaram-se paralelamente a superfície da MS, não sendo observada a projeção radial observada no grupo artrítico. Nesse contexto, estudos anteriores citam que esse tipo de alteração morfológica não é observado em articulação sinovial normal (MCDONALD; LEVICK, 1988; NIO et al., 2002), sendo considerada um mecanismo adaptativo dessas células em processos inflamatórios. Em adição, os sinoviócitos tipo A presentes também variaram em relação a ultraestrutura, em que alguns demonstraram características de macrófagos com atividade fagocítica ativa e outros, inativos. Além disso, poucas células imunes foram observadas infiltrando a matriz amorfa da membrana sinovial. Em conjunto, os dados sugerem que o óleo de copaíba foi capaz de conter o processo inflamatório, o que foi evidenciado pela membrana sinovial restrita a área periarticular, poucas células imunes na matriz amorfa. E ainda, as células demonstraram uma plasticidade cuboide, mostrando um arranjo que formou uma barreira da membrana sinovial.

Os animais artríticos tratados com diclofenaco apresentaram modificações ultrustruturais singulares, com membrana sinovial projetando-se para a luz do espaço

sinovial, com pouca celularidade, composta por sinoviócitos tipo A e B. O tipo B demonstrou projeções citoplasmáticas curtas (6 μm) quando comparadas aos demais grupos artríticos, que irradiaram para ambos os lados do seu corpo celular, estando repleto de cisternas e vacúolos presentes tanto no citoplasma como no corpo celular. Ainda, foram observados neutrófilos na matriz amorfa da membrana sinovial, sinoviócitos do tipo A ocupando a camada superficial da membrana e o espaço sinovial, que adicionalmente estava cercado de debris celulares e fibrina.

Os sinoviócitos tipo B localizados na íntima sinovial expressam várias moléculas de adesão, incluindo de adesão de células vasculares-1 (VCAM-1) (BURGER et al., 2001; LI et al., 2000), de adesão intercelular-1 (ICAM-1) (LINDSLEY et al., 1993), CD44 (BRENNAN et al., 1997) e integrinas β -1 (TANNER et al., 2017). A expressão de VCAM-1 é particularmente incomum, pois está ausente da maioria das outras populações de fibroblastos normais, enquanto as integrinas CD44 e β -1 podem ser expressas em níveis mais baixos em fibroblastos normais (EDWARDS, 1995; SMITH et al., 2003). A expressão de VCAM-1 em fibroblastos da íntima pode ser importante no tráfego celular. O ligante para VCAM-1, integrina α 4/ β -1 (VLA-4) (MORALES-DUCRET et al., 1992), está presente em leucócitos mononucleares, mas não granulócitos, portanto, a presença de VCAM-1 em sinoviócitos do tipo B na artrite inflamatória pode aprisionar macrófagos e linfócitos dentro da membrana sinovial enquanto permite que os neutrófilos saiam para o líquido sinovial (SMITH; WECHALEKAR, 2015). O receptor-2 do complemento (CR2, CD21) pode ser induzido em fibroblastos sinoviais (mas não em outros fibroblastos) em cultura, embora não seja expresso por fibroblastos normais da íntima (LEIGH; CAMBRIDGE; EDWARDS, 1996). O fator de aceleração do decaimento (FAD) (FANG et al., 2007), VCAM-1 e CR2 estão todos envolvidos na sobrevivência dos linfócitos B (BURGER et al., 2001; LINDSLEY et al., 1993). Acredita-se que os fibroblastos íntimos surjam por divisão dentro da sínovia como uma população autoreplicante discreta, distinta dos fibroblastos subintimais, mas é mais provável que sejam substituídos na subíntima (BARTOK; FIRESTEIN, 2010; LINDSLEY et al., 1993). Se os fibroblastos sinoviais forem desagregados e cultivados *in vitro*, eles perdem a expressão de VCAM-1 e CD55, mas a maioria, aparentemente incluindo células de origem subintimal, expressará prontamente esses marcadores após a estimulação de citocinas (LI et al., 2000; SMITH et al., 2003). Parece provável, portanto, que os fibroblastos sinoviais na íntima e na subíntima pertençam a uma população de células especializadas com propensão a expressar VCAM-1 e CD55 (LI et al., 2000; SMITH et al., 2003).

Curiosamente, os animais artríticos não tratados ou tratados com diclofenaco apresentaram um número maior de adipócitos, quando comparado aos demais grupos (Controle e Cop600). A anatomia microscópica do tecido sinovial normal frequentemente se enquadra em três tipos principais, com base na estrutura e no conteúdo da camada subintimal: fibrosa, areolar e adiposa (KEY, 1928; SMITH, 2011). A sinóvia adiposa é encontrada principalmente nas almofadas adiposas, tal como ocorre nas almofadas anulares encontradas nas articulações dos dedos (SMITH; WECHALEKAR, 2015). A íntima pode estar diretamente sobre os adipócitos, mas geralmente é separada por matriz amorfa rico em colágeno, enquanto o tecido mais profundo é adiposo. As vilosidades da membrana geralmente têm uma arteríola e uma vênula centrais, mas podem ser avasculares. A quantidade de gordura nas vilosidades varia e provavelmente diminui com a idade, com aumento do tecido fibroso. Estudos recentes (FELLOWS et al., 2016) demonstram que células-tronco mesenquimais (MSC) derivadas de tecido adiposo, medula óssea e articulação sinovial demonstram capacidade de se diferenciar em várias linhagens celulares e exercer efeitos parácrinos para reparo de cartilagem. Com isso, infere-se que a presença aumentada de tecido adiposo nos grupos artríticos e Diclo pode estar correlacionada com a transição de sinóvia adiposa para fibrosa ou ainda que trata-se de um mecanismo reparador, tendo em vista que a resposta imune estava mais ativa nesses grupos.

Em adição, acrescenta-se que os animais artríticos não tratados também apresentaram alterações ultraestruturais na cartilagem articular e osso periarticular que é um achado comum da artrite experimental e clínica (EGGELMEIJER et al., 1993), apresentando degradação da matriz cartilaginosa e erosão óssea com infiltrado de células imunes, como por exemplo, linfócitos e plasmócitos e ainda, grânulos de mastócitos foram observados próximo a área de osteólise. Tais alterações podem decorrer de atividade aumentada de osteoclastos, que têm um papel importante no desencadeamento da osteoporose difusa e no aparecimento das erosões ósseas focais em artrite (ALLARD; BAYLISS; MAINI, 1990; GEGOUT et al., 1994; KOBAYASHI et al., 2011a).

6. CONCLUSÃO

- ✓ O modelo de AZy foi útil em analisar a ultraestrutura da membrana sinovial de articulações MTF de camundongos Balb/c após 96 horas da aplicação s.c. de Zy ou Salina;
- ✓ O Zy foi capaz de estimular alterações-chaves na ultraestrutura da membrana sinovial, tornando-a hiperplásica e com infiltrado de células imunes mononucleares;
- ✓ Os sinoviócitos do tipo B apresentaram alterações ultraestruturais clássicas da AR clínica e experimental, destacando o aumento de REr e vacúolos citoplasmáticos, cisternas dilatadas repletas de ribossomos e processos citoplasmáticos extensos;
- ✓ Os sinoviócitos do tipo A demonstram inúmeros vacúolos citoplasmáticos, indicando atividade fagocítica ativada nos animais artríticos.
- ✓ O controle, o diclofenaco e o Cop600 apresentaram baixa celularidade na sinóvia.
- ✓ O óleo de copaíba foi efetivo em preservar a ultraestrutura dos sinoviócitos, conferindo-lhes plasticidade para tornar a membrana impermeável.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2008.
- ALLARD, S. A.; BAYLISS, M. T.; MAINI, R. N. The synovium-cartilage junction of the normal human knee: implications for joint destruction and repair. **Arthritis & Rheumatism**, v. 33, n. 8, p. 1170–1179, 1990.
- BAETEN, D. et al. Macrophages expressing the scavenger receptor CD163: A link between immune alterations of the gut and synovial inflammation in spondyloarthritis. **Journal of Pathology**, v. 196, n. 3, p. 343–350, 1 mar. 2002.
- BARLAND, P.; NOVIKOFF, A. B.; HAMERMAN, D. Electron microscopy of the human synovial membrane. **The Journal of cell biology**, v. 14, n. 2, p. 207–220, 1962.
- BARTOK, B.; FIRESTEIN, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. **Immunological Reviews**, v. 233, n. 1, p. 233–255, jan. 2010.
- BERTAZZOLO, N. et al. Interrelationships between interleukin (IL)-1, IL-6 and IL-8 in synovial fluid of various arthropathies. **Agents and Actions**, v. 41, n. 1–2, p. 90–92, mar. 1994.
- BRENNAN, F. R. et al. CD44 expression by leucocytes in rheumatoid arthritis and modulation by specific antibody: Implications for lymphocyte adhesion to endothelial cells and synoviocytes in vitro. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 45, n. 2, p. 213–220, 1 fev. 1997.
- BURGER, J. A. et al. Fibroblast-like synoviocytes support B-cell pseudoemperipolesis via a stromal cell-derived factor-1- and CD106 (VCAM-1)-dependent mechanism. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 3, p. 305–315, 1 fev. 2001.
- CROSS, P. C.; MERCER, K. L. **Cell and tissue ultrastructure: a functional perspective**. [s.l.] WH Freeman New York:, 1993.
- DATE, K. Scanning electron microscope studies on the synovial membrane. **Archivum histologicum japonicum**, v. 42, n. 5, p. 517–531, 1979.
- DEL RIO, A. N. et al. Distribution and characteristics of synoviocytes in the rabbit knee joint: a scanning/transmission electron microscopic study. **Italian journal of anatomy and embryology= Archivio italiano di anatomia ed embriologia**, v. 104, n. 1, p. 33–45, 1999.
- DI GIOVINE, F. S. et al. Interleukin 1 (IL 1) as a mediator of crystal arthritis. Stimulation of T cell and synovial fibroblast mitogenesis by urate crystal-induced IL 1. **The Journal of Immunology**, v. 138, n. 10, 1987.
- DURO, C. C. et al. Qualitative study of young, adult, and aged Wistar rats temporomandibular synovial membrane employing light, scanning, and transmission electron microscopy. **Microscopy research and technique**, v. 75, n. 11, p. 1522–1527, 2012.
- EDWARDS, J. C. W. **Synovial intimal fibroblasts**. Annals of the Rheumatic Diseases. **Anais...BMJ Publishing Group**, 1995Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7794049/>>. Acesso em: 11 maio. 2021
- EGGELMEIJER, F. et al. Bone metabolism in rheumatoid arthritis; relation to disease activity. **Rheumatology**, v. 32, n. 5, p. 387–391, 1993.
- FANG, C. et al. Complement-Dependent Enhancement of CD8 + T Cell Immunity to Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection in Decay-Accelerating Factor-Deficient Mice . **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 5, p. 3178–3186, 1 set. 2007.
- FELLOWS, C. R. et al. Adipose, bone marrow and synovial joint-derived mesenchymal stem cells for cartilage repair. **Frontiers in genetics**, v. 7, p. 213, 2016.
- FONSECA, J. E. et al. Macrophage subpopulations in rheumatoid synovium: Reduced CD163 expression in CD4+ T lymphocyte-rich microenvironments. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 5, p. 1210–1216, 2002.
- GABRIEL, S. E.; MICHAUD, K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. **Arthritis Research & Therapy**, v. 11, n. 3, p. 229, 2009.
- GEGOUT, P. et al. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: Effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life Sciences**, v. 55, n. 17, 1994.
- GEGOUT, P. et al. Zymosan-induced arthritis in rats II. Effects of anti-inflammatory drugs. **Life Sciences**, v. 56, n. 20, p. PL389–PL394, 7 abr. 1995.

HADDAD, A. et al. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. 3º ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

HENDERSON, B.; REVELL, P. A.; EDWARDS, J. C. **Synovial lining cell hyperplasia in rheumatoid arthritis: dogma and fact**. *Annals of the rheumatic diseases* Ann Rheum Dis, , 1988. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3284489/>>. Acesso em: 11 maio. 2021

ISHIGURO, N. et al. Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover: analyses of synovial fluid from patients with osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 42, n. 1, p. 129–136, 1999a.

ISHIGURO, N. et al. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and glycosaminoglycans in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 26, n. 1, p. 34–40, 1999b.

IWANAGA, T. et al. Morphology and Functional Roles of Synoviocytes in the Joint. **Archives of Histology and Cytology**, v. 63, n. 1, p. 17–31, 2000.

JIANG, Q. et al. Will Chinese external therapy with compound Tripterygium wilfordii hook F gel safely control disease activity in patients with rheumatoid arthritis: Design of a double-blinded randomized controlled trial. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, 2017.

KENNEDY, A. et al. **Macrophages in synovial inflammation** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 10 out. 2011. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 11 maio. 2021

KEY, J. A. Synovial membrane in special Cytology. **New York. (Quoted from Kling.)**, 1928.

KOBAYASHI, C. et al. Pharmacological evaluation of Copaifera multijuga oil in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 3, p. 306–313, 16 mar. 2011.

KUBOTA, E. et al. Synovial fluid cytokines and proteinases as markers of temporomandibular joint disease. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 56, n. 2, p. 192–198, 1998.

LEIGH, R. D.; CAMBRIDGE, G.; EDWARDS, J. C. W. Expression of B cell survival cofactors on synovial fibroblasts. **Br J Rheumatol**, v. 1, p. 110, 1996.

LI, P. et al. NF- κ B Regulates VCAM-1 Expression on Fibroblast-Like Synoviocytes. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 11, p. 5990–5997, 1 jun. 2000.

LINDSLEY, H. B. et al. Proinflammatory Cytokines Enhance Human Synoviocyte Expression of Functional Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1). **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 68, n. 3, p. 311–320, 1 set. 1993.

MCDONALD, J. N.; LEVICK, J. R. Morphology of surface synoviocytes in situ at normal and raised joint pressure, studied by scanning electron microscopy. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 47, n. 3, p. 232–240, 1988.

MORALES-DUCRET, J. et al. Alpha 4/beta 1 integrin (VLA-4) ligands in arthritis. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in synovium and on fibroblast-like synoviocytes. **The Journal of Immunology**, v. 149, n. 4, 1992.

MURASHIGE, N. et al. Normal structure and morphological effects of a corticosteroid on the peripatellar synovial membrane of the rat. **Kaibogaku zasshi. Journal of anatomy**, v. 74, n. 2, p. 183–189, 1999.

NIO, J. et al. Three-dimensional Ultrastructure of Synoviocytes in the Knee Joint of Rabbits and Morphological Changes in Osteoarthritis Model. **Archives of Histology and Cytology**, v. 65, n. 2, p. 189–200, 2002.

PARTSCH, G. et al. Highly increased levels of tumor necrosis factor-alpha and other proinflammatory cytokines in psoriatic arthritis synovial fluid. **The Journal of rheumatology**, v. 24, n. 3, p. 518–523, 1997.

SHIKICHI, M. et al. Three-dimensional ultrastructure of synoviocytes in the horse joint as revealed by the scanning electron microscope. **Archives of histology and cytology**, v. 62, n. 3, p. 219–229, 1999.

SINGH, J. A. et al. Immunohistochemistry of normal human knee synovium: A quantitative study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 63, n. 7, p. 785–790, jul. 2004a.

SINGH, J. A. et al. Immunohistochemistry of normal human knee synovium: A quantitative study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 63, n. 7, p. 785–790, jul. 2004b.

SMITH, M. D. et al. Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and

- arthroscopically normal knee joints. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. 4, p. 303–307, 1 abr. 2003.
- SMITH, M. D. Suppl 1: the normal synovium. **The open rheumatology journal**, v. 5, p. 100, 2011.
- SMITH, M. D.; WECHALEKAR, M. D. The synovium. In: **Rheumatology**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 27–32.
- SMOLEN, J. S. et al. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 75, n. 1, p. 3–15, 2016.
- STEVENS, C. R.; MAPP, P. I.; REVELL, P. A. A monoclonal antibody (Mab 67) marks type B synoviocytes. **Rheumatology International**, v. 10, n. 3, p. 103–106, maio 1990.
- SWAAK, A. J. et al. Interleukin-6 (IL-6) in synovial fluid and serum of patients with rheumatic diseases. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 17, n. 6, p. 469–474, 1988.
- TANNER, M. R. et al. KCa1.1 channels regulate β 1-integrin function and cell adhesion in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **FASEB Journal**, v. 31, n. 8, p. 3309–3320, 1 ago. 2017.
- WALAKOVITS, L. A. et al. Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 35, n. 1, p. 35–42, 1992.
- WYSOCKI, G. P. Scanning electron microscopy of synovial membranes. **Arch Path**, v. 93, p. 172–177, 1972.

ANEXOS

ANEXO 1 – Equipe do projeto de pesquisa

Nome	Instituição	Formação	Função
Vanda Santana Queiroz Dini	ICB/UFAM	Biomédica Mestra em Biotecnologia (PPGBIOTEC-UFAM)	Desenvolvimento, análise, conclusão e divulgação dos resultados
Oscar Tadeu Ferreira da Costa	ICB/UFAM	Biólogo Doutor em Ecologia e Recursos Naturais (UFSCAR-PPGERN)	Orientação Estereologia, ecotoxicologia Histopatologia
Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes	ICB/UFAM	Médico Doutor em Biotecnologia (PPGBIOTEC-UFAM)	Coorientação Imunologia
Lucas Castanhola Dias	INPA	Biólogo Gerente do laboratório temático de microscopia eletrônica, INPA	Microscopia eletrônica
Violeta Bastos de Mattos Areosa	ICB/UFAM	Bióloga Graduada em Ciências Biológicas (ICB-UFAM)	Processamento de amostras Morfologia quantitativa
Pritesh Jaychand Lalwani		Biólogo/Biotecnólogo Doutor em Imunologia (Universidade (Humboldt University-Alemanha)	Experimentação animal
Erilene Santos do Carmo	ICB/UFAM	Técnica em Morfologia quantitativa	Processamento de amostras Morfologia quantitativa
Cacilda Satomi Yano Malmann		Farmacêutica Mestre em Imunologia (PPGIBA-UFAM)	Análises bioquímicas



Ação anti-inflamatória do óleo de copaíba em artrite induzida em modelo animal: Uma Revisão Sistemática

Vanda Santana Queiroz Dini¹, Silvania da Conceição Furtado², José Fernando Marques Barcellos³
Oscar Tadeu Ferreira da Costa⁴

Resumo

O óleo de copaíba (*Copaifera* sp.) é usado na medicina alternativa devido as propriedades anti-inflamatória, antitumoral e antimicrobiana já comprovados, tornando-o atrativo para o tratamento de diversas doenças, como por exemplo a artrite, caracterizada como uma doença inflamatória sistêmica, que acomete 1% da população. Esta revisão sistemática identificou estudos que relatassem os efeitos do óleo de copaíba sobre a inflamação em modelos animais de artrite experimental, a fim de verificar as doses efetivas e tóxicas e os mecanismos anti-inflamatórios eficazes. Oitenta e quatro estudos foram encontrados por pesquisa eletrônica, que foram triados de acordo com critérios de inclusão e exclusão pré-definidos. A dose efetiva, segura e não tóxica do óleo de copaíba necessita ser investigada. Esta revisão sistemática permitiu concluir que o principal componente químico da copaíba que apresenta atividade anti-inflamatória é o β -cariofileno, entretanto, o mecanismo de ação necessita ser elucidado. Além disso, a falta de estudos que abordem o óleo de copaíba como agente anti-inflamatório na artrite reumatoide é insuficiente para sustentar o uso efetivo e seguro desse óleo-resina, sendo necessário mais estudos, tendo em vista os benefícios promissores já comprovados desse composto medicinal.

Palavras-Chave: eficácia e segurança, dose tóxica, fitoterápico, artrite experimental

Anti-inflammatory action of copaiba oil in animal model-induced arthritis: A Systematic Review -Copaiba oil (*Copaifera* sp.) is used in alternative medicine because of the proven anti-inflammatory, antitumor and antimicrobial properties, making it attractive for the treatment of several diseases, such as arthritis, characterized as a systemic inflammatory disease, which affects 1% of the population. This systematic review identified studies that reported the effects of copaiba oil on inflammation in animal models of experimental arthritis in order to verify effective and toxic doses and effective anti-inflammatory mechanisms. Eighty-four studies were found by electronic research, which were screened according to pre-defined inclusion and exclusion criteria. The effective, safe and non-toxic dose of copaiba oil needs to be investigated. This systematic review allowed us to conclude that the main chemical component of copaiba that has anti-inflammatory activity is β -caryophyllene, however, the mechanism of action needs to be elucidated. In addition, the lack of studies addressing copaiba oil as an anti-inflammatory agent in rheumatoid arthritis is insufficient to support the effective and safe use of this oil-resin, and further studies are needed in view of the already proven promising benefits of this compound medicinal.

Key-words: efficacy and safety, toxic dose, phytotherapeutic, experimental arthritis

¹ Aluna Doutorado Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, UFAM, vanda_santana@hotmail.com

² Professora Departamento de Morfologia, ICB, UFAM, silvania_furtado@yahoo.com.br

³ Professor Departamento de Morfologia, ICB, UFAM, fmarques123@gmail.com

⁴ Professor Departamento de Morfologia, ICB, UFAM, oscarcosta@ufam.edu.br

ANEXO 3– Parecer do CEUA/INPA



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

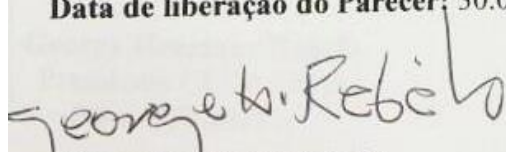
**PARECER CONSUBSTANCIADO E CERTIFICADO SOBRE PROTOCOLOS
DE PESQUISAS NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Estereologia da Articulação Tibiotarsal de Camundongos induzidos à Artrite e tratados com óleo de Copaíba, Copaifera multijuga Hayne (Leguminosae)**", registrada com o nº **048/2016**, sob a responsabilidade de **PRITESH JAYCHAND LALWANI** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA, em reunião de 26/01/2017.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	03/01/2017 a 09/01/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Balb/C
Número de animais	36
Peso/Idade	18 – 22g / 8 semanas
Sexo	M / F
Origem	Biotério Central - INPA

Data de liberação do Parecer: 30.01.2017


George Henrique Rebelo
Presidente CEUA-INPA
PO n. 079/2015