

THIAGO DE MELLO MORAES



**AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus aurantium* E DO SEU
CONSTITUINTE MAJORITÁRIO, LIMONENO, COMO ADJUVANTES
NO TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATÓIDE EM RATOS COM
ÚLCERAS GÁSTRICAS**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
Campus de Botucatu da Universidade
Estadual Paulista - UNESP, como requisito
para obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas (Área de Concentração:
Farmacologia)

**Botucatu-SP
2012**

Tese de doutorado

Moraes, Thiago de Mello.

Avaliação do óleo essencial de *Citrus aurantium* L. e limoneno como adjuvantes no tratamento da artrite reumatóide em ratos com úlceras gástricas / Thiago de Mello Moraes. - Botucatu, 2012.

Tese (doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2012.

Orientador: Clélia Akiko Hiruma-Lima

Capes: 21006008

1. Artrite reumatóide – Úlcera gástrica – Modelos experimentais.

Palavras-chave: Artrite; DAINE; limoneno; Úlceras gástricas; Ratos; *Citrus aurantium*

Dedicatória

DEDIDO esta tese a minha família, meus pais Álvaro e Solange e minha irmã Maria Carolina.

Agradeço pelo amor incondicional

Agradeço pelo esforço despendido em me criar, formar, ensinar e conduzir, muitas vezes abdicando de seus sonhos e direitos!

Obrigado por tornarem meus sonhos reais!

Dedico à minha noiva Ehlaz

Agradeço pelo carinho, amor e por compreender minhas ausências necessárias!!

*"Desejo que você
Não tenha medo da vida, tenha medo de não vivê-la.
Não há céu sem tempestades, nem caminhos sem acidentes.
Só é digno do pódio quem usa as derrotas para alcançá-lo.
Só é digno da sabedoria quem usa as lágrimas para irrigá-la.
Os frágeis usam a força; os fortes, a inteligência.
Seja um sonhador, mas una seus sonhos com disciplina,
Pois sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas.
Seja um debatedor de idéias. Lute pelo que você ama."*

(A. Cury)

Agradecimentos

À Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima, a pessoa de maior importância para a minha formação profissional e para o desenvolvimento deste trabalho, foram 9 anos de convivência e cada dia foi um aprendizado constante. Não tenho palavras para agradecer o tanto que fez por mim, obrigado pelos ensinamentos, broncas, elogios e principalmente pela amizade.

Obrigado Chefa!

*À Profa. Dra. Lúcia Regina Machado da Rocha pelo
companheirismo, por sempre me orientar e participar da minha formação,
todo esse tempo de convivência me ensinou muito e serei eternamente grato
por tudo!*

A todos os AMIGOS do laboratório, pelo auxílio na execução dos experimentos, sem a ajuda de vocês nada teria acontecido, não vou citar todos, pois foram muitos, Graças a Deus, mas saibam que vocês estão comigo independente dos caminhos que seguimos. Este trabalho também é de vocês.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia pelo apoio e auxílio nas atividades relacionadas à tese.

Aos funcionários da seção de pós-graduação pelos serviços prestados.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos usufruída nas etapas iniciais do doutorado.

Prólogo

O projeto de doutorado possibilitou a formação específica em farmacologia, com os estudos direcionados para a caracterização de atividade farmacológica de produtos naturais, sendo o objeto alvo dos estudos as doenças inflamatórias e ulcera gástrica. Durante a execução deste projeto, várias outras atividades foram realizadas, no intuito de enriquecer a formação profissional do aluno.

As atividades realizadas envolveram:

Publicação de artigos científicos em periódicos

1. Bonamin, Flávia; **Moraes, Thiago Mello**; Kushima, Hélio; Silva, Marcelo Aparecido; Rozza, Ariane Leite; Pellizzon, Cláudia Helena; Bauab, Tais Maria; Rocha, Lucia Regina Machado; Vilegas, Wagner; Hiruma-Lima, Clélia Akiko. *Can a Strychnos species be used as antiulcer agent? Ulcer healing action from alkaloid fraction of Strychnos pseudoquina St. Hil. (Loganiaceae).* Journal of Ethnopharmacology. , v.138, p.47 - 52, 2011.
2. Rozza, Ariane Leite; **Moraes, Thiago de Mello**; Kushima, Hélio; Tanimoto, Alexandre; Marques, Márcia Ortiz Mayo; Bauab, Taís Maria; Hiruma-Lima, Clélia Akiko; Pellizzon, Cláudia Helena. *Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene alfa-pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2.* Chemico-Biological Interactions (Print). , v.189, p.82 - 89, 2011.
3. Rozza, Ariane Leite; **Moraes, Thiago de Mello**; Kushima, Hélio; Nunes, Domingos Sávio; Hiruma-Lima, Clélia Akiko; Pellizzon, Cláudia Helena. *Involvement of Glutathione, Sulfhydryl Compounds, Nitric Oxide, Vasoactive Intestinal Peptide, and Heat-Shock Protein-70 in the Gastroprotective Mechanism of Benth. (Euphorbiaceae) Essential Oil.*

4. Melanchauski, Larissa S; Broto, Ana Paula G. S; **Moraes, Thiago de Mello**; Nasser, Ana Lúcia M; Said, Ataa; Hawas, Usama W; Rashed, Khaled; Vilegas, Wagner; Hiruma-Lima, Clélia A. *Gastroprotective and antisecretory effects of *Ailanthus excelsa* (Roxb).* Journal of Natural Medicines., v.64, p.109 - 113, 2010.
5. Mazzolin, Lucilene Patrícia; Nasser, Ana Lúcia Martiniano; **Moraes, Thiago de Mello**; Santos, Raquel Cássia; Nishijima, Catarine Massucato; Santos, Fábio Vieira; Varanda, Eliana; Aparecida Bauab, Taís Maria; da Rocha, Lúcia Regina Machado; Di Stasi, Luis Cláudio; Hiruma-Lima, Clélia A. *Qualea parviflora Mart.: An integrative study to validate the gastroprotective, antidiarrheal, antihemorrhagic and mutagenic action.* Journal of Ethnopharmacology., v.127, p.508 - 514, 2010.
6. **Moraes, Thiago de Mello**; Kushima, Hélio; Santos, Raquel C; Moleiro, Fábio Cruz; Rocha, Lúcia R. M; Marques, Márcia O; Vilegas, Wagner; Hiruma-Lima, Clélia A. *Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion.* *Chemico-Biological Interactions.*, v.180, p.499 - 505, 2009.
7. Moleiro, Fábio C; Andreo, Márcio Aparecido; Santos, Raquel C; **Moraes, Thiago de Mello**; Hiruma-Lima, Clélia A. *Mouriri elliptica: Validation of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* effects.* Journal of Ethnopharmacology., v.123, p.359 - 368, 2009.
8. Hiruma-Lima, Clélia A; Rodrigues, Clenilson; Kushima, Hélio; **Moraes, Thiago de Mello**, Lolis, S; Feitosa, S; Magri, Soares, F; Cola, M; Andrade, F. *The anti-ulcerogenic effects of *Curatella americana* L..* Journal of Ethnopharmacology., v.121, p.425 - 432, 2009.
9. **Moraes, Thiago de Mello**; Rodrigues, Clenilson; Kushima, Hélio; Bauab, Taís; Villegas, Wagner; Pellizzon, Cláudia; Brito, Alba R; Hiruma-Lima,

Clélia A. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. Journal of Ethnopharmacology. , v.120, p.161 - 168, 2008.

Publicações de resumos em anais de eventos

1. Tanimoto, Alexandre; Rozza, Ariane Leite; **Moraes, Thiago de Mello**; Kushima, Hélio; Hiruma-Lima, Clélia A; Pellizzon, Cláudia. Role of Alpha-2 adrenoreceptors and sulfhydryl groupments on gastroprotective and antiulcerogenic action of epicatechin In: Fesbe, 2011, Rio de Janeiro.
2. **Moraes, Thiago de Mello**; Hiruma-Lima, Clélia A. Avaliação do potencial anti-artrítico do óleo essencial obtido das cascas do fruto de *Citrus aurantium* L. XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, no Centro de Convenções do Tropical Hotel Tambaú, na cidade de João Pessoa-PB.
3. Rozza, Ariane Leite; **Moraes, Thiago de Mello**; Hiruma-Lima, Clélia A; Pellizzon, Cláudia. Avaliação da participação dos compostos sulfidrílicos e do óxido nítrico no efeito gastroprotetor do óleo essencial de *Croton cajucara* In: FESBE, 2009, Águas de Lindóia.
4. **Moraes, Thiago de Mello**; Hiruma-Lima, Clélia A. Effect of essential oil from *Citrus aurantium* and its main compound limonene on quantity of PGE2 and mucus production in gastric mucosa In: 57 International Congress and Annual meeting of the Society for Medicinal Plant And Natural Product Research, 2009, Geneva. **Planta Medica**. , 2009.
5. Polo, Celi; **Moraes, Thiago de Mello**; Hiruma-Lima, Clélia A. Influence of aging on gastric ulcer healing activity of the essential oil from *Citrus aurantium* In: 57 International Congress and Annual meeting of the Society for Medicinal Plant And Natural Product Research, 2009, Gneva. **Planta Medica**. , 2009.

6. Rozza, Ariane Leite; **Moraes, Thiago de Mello**; Hiruma-Lima, Clélia A; Pellizzon, Cláudia Assessment of the gastroprotective effect from d-limonene In: IV Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, 2008, Botucatu.

7. **Moraes, Thiago de Mello**; Hiruma-Lima, Clélia A. Healing action of *Citrus aurantium* essential oil and limonene in gastric mucosa: role of COX-2 and stimulation of cell proliferation In: XX Simpósio de plantas Medicinais do Brasil e X International congress of Ethnopharmacology, 2008, São Paulo.

Co-orientação em monografia de conclusão de curso

“Avaliação do potencial efeito cicatrizante gástrico e anti-artrítico da mangiferina, uma xantona glicosilada da *Mangifera indica*”

Aluna: Marília do Valle Carneiro

Orientadora: Profª Drª Clélia Akiko Hiruma-Lima

Co-orientador: Thiago de Mello Moraes

Prêmios e Títulos

- **Menção Honrosa** - Avaliação do potencial anti-artrítico do óleo essencial obtido das cascas do fruto de *Citrus aurantium* L.(Moraes, Thiago de Mello; Hiruma-Lima, Clélia A.) XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, no Centro de Convenções do Tropical Hotel Tambaú, na cidade de João Pessoa-PB.

Disciplinas cursadas

- ✓ *Metodologia e Redação Científica* - 4 créditos, 60 horas-aula.
- ✓ *Farmacologia do Sistema Nervoso Autônomo Simpático* - 3 créditos, 60 horas-aula.
- ✓ *Plantas Medicinais: Abordagens de Estudo Interdisciplinar* - 6 créditos, 90 horas-aula.

- ✓ *Métodos de Validação de Novos Fármacos e Tópicos de Atualização em Plantas Medicinais* - 6 créditos, 90 horas-aula.
- ✓ *Farmacologia de Plantas Medicinais com Atividade Antinociceptiva e/ou Anti-inflamatória* - 2 créditos, 30 horas-aula.
- ✓ *Tópicos de Atualização em Ciências* - 4 créditos, 60 horas-aula.

ÍNDICE

I – INTRODUÇÃO	2
1- Processo inflamatório	3
2 - Artrite Reumatóide (AR)	4
3 - Terapêutica atual da AR	7
4 – Úlceras pépticas	9
5 – Plantas Medicinais	11
II – OBJETIVO	15
III – MATERIAL E MÉTODOS	16
1- Animais	16
2- Doses	16
3- Edema de pata induzido por carragenina	16
4- Indução de edema de pata com histamina, serotonina, substância P e bradicinina (BK)	17
5- Modelo de <i>air pouch</i>	17
6- Indução de edema de pata por carragenina para quantificação de citocinas	18
7- Dosagens de IL-1 β , TNF e IL-10	19
8- Modelo de indução de artrite reumatóide (AR)	19
9 - Indução de úlceras agudas induzidas por indometacina (DAINE) em ratos artríticos (RA)	20
10 - Modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético em ratos artríticos (RA)	20
11 - Determinação dos níveis de prostaglandina (PGE ₂) no plasma	21
12 - Determinação do conteúdo de glutathiona total (GSH) na mucosa gástrica	22
13 - Quantificação dos níveis de mieloperoxidase (MPO)	22
14 - Análise de RT-PCR para COX-1	22
15 - Análise Estatística	23
IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
V – CONCLUSÃO	61
VI - REFERÊNCIAS	62
ANEXO I - Effects of limonene and essential oil from <i>Citrus aurantium</i> on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion.	74

RESUMO

Artrite reumatóide (AR) é uma doença auto-imune, crônica, inflamatória e sistêmica cuja etiologia não é totalmente conhecida e até o presente, não existe cura. Esta doença é caracterizada pela inflamação simétrica e progressiva das juntas sinoviais que resulta em uma erosão óssea e da cartilagem. Apesar de todos os inconvenientes causados pelas drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINE), estas constituem a base da pirâmide no tratamento da AR e são os medicamentos mais prescritos no início do tratamento da AR. A prevalência de úlceras gástricas e duodenais, dentre os usuários crônicos das DAINE, está acima de 20%, dentre estes, cerca de 4% desenvolvem complicações graves. Outro fato muito relevante na prevalência da AR é que pacientes com AR e usuários de DAINE são muito mais susceptíveis as úlceras gástricas causadas por DAINE do que os usuários comuns destes anti-inflamatórios. A partir de resultados obtidos anteriormente foi demonstrado que o óleo essencial de *Citrus aurantium* (OEC) e o limoneno (LIM), seu constituinte majoritário, apresentaram atividade gastroprotetora frente á úlceras gástricas induzidas por DAINE além de uma ação cicatrizante na mucosa gástrica de ratos. Sendo assim, os objetivos iniciais deste trabalho foram de avaliar a ação gastroprotetora e cicatrizante do OEC e LIM na mucosa gástrica de ratos artríticos e também avaliar a atividade anti-inflamatória destes compostos *per si* e em associação com uma DAINE em modelos de inflamação aguda e crônica (artrite reumatóide). Para isso foram realizados modelos de inflamação aguda induzida por diferentes agentes pró-inflamatórios (carragenina, histamina, bradicinina, serotonina, e substância P) além do modelo de inflamação crônica (artrite reumatóide) induzida por colágeno. Para avaliar a atividade destes compostos sobre a mucosa gástrica de ratos artríticos foram realizados os modelos de indução de úlceras gástricas por DAINE e ácido acético. Também foi avaliada a ação sobre diferentes mediadores inflamatórios (MPO, PGE₂, IL-1 β , TNF, IL-10, COX-1 e COX-2). A partir dos resultados deste trabalho, podemos concluir que o LIM associado com uma DAINE apresenta uma importante atividade anti-inflamatória, tanto em modelos de inflamação aguda quanto em modelos crônicos de artrite reumatóide. Esta atividade anti-inflamatória parece estar relacionada com a inibição do aumento da expressão de vários fatores pró-inflamatórios envolvidos com a etiologia da AR, tais como: COX-1, COX-2, TNF, IL-1 β e NO. Esta atividade anti-inflamatória e anti-artrítica da associação de LIM com DAINE também pode estar relacionada com o estímulo da produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10. Também ficou evidenciada a potente atividade gastroprotetora do LIM em modelos de lesão gástrica induzidas por DAINE, tanto em ratos não artríticos (normais) quanto em ratos artríticos, vale salientar que esta atividade gastroprotetora foi efetiva mesmo quando o limoneno foi administrado em conjunto com uma DAINE. Sendo assim, podemos concluir que o limoneno pode ser usado como um adjuvante as DAINE no tratamento de doenças inflamatórias com a finalidade de potencializar a ação das mesmas e inibir seus efeitos lesivos sobre a mucosa gástrica.

I - INTRODUÇÃO

1- Processo inflamatório

A inflamação é um complexo processo fisiopatológico mediado por uma grande quantidade de moléculas sinalizadores produzidas por leucócitos, macrófagos, mastócitos, plaquetas e linfócitos (Moilanen & Vapaatalo, 1995). Esse processo acarreta a formação de edema devido ao extravasamento de fluídos, proteínas e ao acúmulo de leucócitos no sítio inflamatório (Vane *et al.*, 1998). Na sua fase aguda é caracterizada pelo aumento no fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular seguido de acúmulo de fluídos, leucócitos e mediadores inflamatórios como citocinas. Na fase sub-aguda/crônica, a inflamação é caracterizada pelo desenvolvimento de resposta humoral específica e resposta celular imune (Carol *et al.*, 1997).

Dentre os mediadores inflamatórios iniciais, destacam-se as ações das ciclo-oxigenases (COX), prostaglandinas (PG), óxido nítrico (NO), histamina e citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas (IL-1 β , IL-6) (Vane *et al.*, 1998).

As ciclo-oxigenases (COX) são enzimas que catalisam a síntese de prostaglandinas e tromboxanos a partir de ácido araquidônico e se apresentam em duas isoformas: a COX-1, que é constitutiva e expressa em uma grande variedade de tecidos e responsável pela síntese basal de prostaglandinas (PG) e tem um papel fundamental na proteção da mucosa gástrica e a COX-2, que constitui a forma induzível da enzima, é expressa em processos inflamatórios e tem ação na síntese de prostanóides que ocorrem em processos inflamatórios, na dor e na febre (Rao *et al.*, 2010).

O óxido nítrico (NO) é sintetizado pela enzima NO-síntase (NOS) a partir da L-arginina e está relacionado tanto com o processo de inflamação aguda como também ao processo crônico (McMicking *et al.*, 1997). O NO também tem um importante papel na modulação da defesa da mucosa gástrica como regulador na secreção de muco (Brown *et al.*, 1993), como vasodilatador (Wallace e Miller, 2000) e na inibição da agregação de neutrófilos (Barnick *et al.*, 1997). A partir da descoberta de que a indução de COX-2 e NOS resultam no aumento de síntese de prostaglandinas e NO respectivamente (McMicking *et al.*, 1997), a modulação da ativação destas enzimas pode representar um alvo terapêutico a ser explorado para controlar o processo inflamatório.

Citocinas como TNF e IL-1 β atuam como importantes mediadores pró-inflamatórios e a exemplo das prostaglandinas e NO, em baixos níveis, essas citocinas tem inúmeras funções biológicas benéficas tais como apoptose, citotoxicidade, imunorregulação e proteção contra infecções, porém, a produção aumentada destas citocinas está associada com a patogênese de várias doenças inflamatórias como por exemplo: doença inflamatória intestinal, esclerose múltipla e artrite reumatóide (AR) (Sekut & Connolly, 1998).

2- Artrite reumatóide

Artrite reumatóide (AR) é uma doença auto-imune, crônica, inflamatória e sistêmica cuja etiologia não é totalmente conhecida e até o presente, não existe cura. Esta doença é caracterizada pela inflamação simétrica e progressiva das juntas sinoviais que resulta em uma erosão óssea e da cartilagem (Doan & Massarotti, 2005).

A incidência da AR é de aproximadamente 0,5% na população mundial o que inclui cerca de 35 milhões de pessoas, as mulheres são as mais afetadas pela doença com uma frequência de cerca de três vezes mais que os homens (Carmona *et al.*, 2010). A doença pode acometer o indivíduo em qualquer idade, mas tipicamente começa a se manifestar entre os 30 e 50 anos (Doan & Massarotti, 2005). Estas manifestações geram um grande comprometimento para a sociedade por se tratar do período etário de maior produtividade do ser humano. A severidade desta doença é muito comprometedora para o indivíduo, pois pode causar desde dores articulares, inflamações, limitações dos movimentos até progredir na destruição completa das juntas e resultar em sua deformação permanente. Também podem ocorrer manifestações extra-articulares como indisposição e fadiga. O tempo de vida dos pacientes acometidos pela AR podem ser reduzidos de 3 a 10 anos (Carmona *et al.*, 2010). Acredita-se que a etiologia da AR está relacionada com múltiplos fatores genéticos e exógenos. Em geral, sabe-se que a AR inicia-se com a ativação dos linfócitos T CD4⁺ que recrutam antígenos artritogênicos no tecido sinovial. Estes linfócitos causam uma estimulação dos monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais que por sua vez irão secretar metaloproteinases, que são enzimas envolvidas na erosão e degradação de ossos e cartilagens (Doan & Massarotti, 2005). Os monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais também produzem citocinas como as interleucinas (IL) do tipo 1 e do tipo 6, além do fator de necrose tumoral (TNF) bem como outros mediadores inflamatórios. As IL-1, IL-6 e TNF são as citocinas mais importantes envolvidas no processo inflamatório da AR (Doan & Massarotti, 2005). Os linfócitos T CD4⁺ também estimulam os linfócitos do tipo B a produzirem imunoglobulinas que também

acabam atuando como um fator reumatóide. Todos esses processos, em conjunto, levam á inflamação sinovial que se torna espessa, inchada e localmente invasiva. Este tecido inflamatório progressivamente penetra na cartilagem e nos ossos das juntas causando a sua destruição (Smith & Haynes, 2002). As células T citotóxicas das juntas reumatóides também produzem IL-2, interferon- γ , IL-10 e IL-12 e a presença destas citocinas podem ser interpretadas como evidências primárias da resposta de células T *helper* 1 (Th1) e das células Th2 auto-imune (Afeltra, 2001). Outro importante fator para a caracterização da etiologia da AR, são as espécies reativas de oxigênio (ERO). Estas ERO são reativos intermediários para outros compostos químicos (óxido nítrico, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila) que têm potencial para iniciar o dano celular nos tecidos das juntas e em especial nos casos de AR (Haliwell & Gutteridge, 1984).

As citocinas pró-inflamatórias mais importantes no desenvolvimento da cascata inflamatória destrutiva da AR são as IL-1 e TNF, poi estas citocinas são encontradas em grande concentração nas juntas sinoviais e no plasma de pacientes com AR (Saxne *et al.*, 1988). Elas exercem sua atividade inflamatória de várias formas como, por exemplo, pela estimulação de fibroblastos e osteoclastos ou pelo aumento da liberação das metaloproteinases. O TNF também induz a produção de outras citocinas como IL-6, IL-8 e estimula os fibroblastos a expressarem moléculas de adesão que tem um importante papel no recrutamento de leucócitos para os locais inflamados (Choi & Panayi, 2001). Como conseqüência, tem-se um ciclo auto-inflamatório instalado nas juntas que tende a se agravar progressivamente.

3- Terapêutica atual da AR

O objetivo do tratamento da AR é mitigar a destruição das juntas, preservar suas funções e prevenir a invalidez das mesmas. Para a maioria dos pacientes não tratados, as lesões irreversíveis das juntas ocorrem em dois anos (Doan & Massarotti, 2005).

Com base em estudos recentes sobre o papel dos mediadores inflamatórios na patogenia da AR, os alvos terapêuticos para o tratamento da AR tem se concentrado na cascata do processo inflamatório, com destaque para a o TNF, IL-1, IL-6 e os sinalizadores celulares das células T e B. Os principais objetivos do tratamento para a AR consistem no alívio da dor, controle da inflamação nas juntas e prevenção da destruição das cartilagens e ossos. Para isto, os pacientes utilizam-se das drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINE), drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (DMARDs) e terapias biológicas (O'Dell, 2004).

As DAINE são comumente prescritas no tratamento da AR, osteoartrites, dor aguda e febre (Kato *et al.*, 2002). Estes fármacos são uma das classes de drogas mais utilizadas no mundo e são freqüentemente prescritas pelos seus efeitos analgésicos e antiinflamatórios (Steen *et al.*, 2001). O principal mecanismo de ação desta classe de drogas é através da inibição das cicloxigenases (COX) que convertem o ácido aracdônico em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanas (Mancur & Willians, 1995). As DAINE também atuam diminuindo a liberação de bradicinina, reduzindo a ativação de linfócitos e diminuindo a migração de monócitos e granulócitos (Mancur & Willians, 1995). Porém, as DAINE não são capazes de inibir ou curar a AR, mas

somente alguns de seus sintomas. Por isso, a terapêutica de longa duração tem a associação de DAIINE com as DMARDs.

As DMARDs (cloroquina, sulfasalazina, ciclosporina, metotrexato, dentre outros) são agentes que mudam a resposta imune de longa duração (Steen *et al.*, 2001). Uma das DMARDs mais utilizadas na terapêutica da AR é o metotrexato (MTX) (O'Dell, 2004). Seu mecanismo de ação anti-inflamatório ainda não foi totalmente esclarecido, mas sabe-se que este fármaco tem a capacidade de interromper a biossíntese das purinas, agindo como antagonista do ácido fólico e assim prejudicando a síntese de DNA. Como consequência desta inibição da síntese de DNA, o MTX promove diminuição das IL-1, IL-2 e IL-6, além de reduzir a liberação de polimorfonucleares no local da inflamação e supressão da proliferação de linfócitos (O'Dell, 2004). As desvantagens do uso da MTX incluem casos de fibrose pulmonar, distúrbios gastrointestinais, hemorragias, redução da imunomodulação e o aumento do risco de infecções (O'Dell, 2004).

Recentemente, têm-se desenvolvido novos medicamentos para a terapêutica da AR que são aqueles denominados de terapias biológicas como os inibidores de TNF e os bloqueadores de IL-1. Porém, estes novos medicamentos tem apresentado muitos efeitos tóxicos graves que comprometem a sua utilização. Além disso, existem relatos de que a utilização desta nova classe de medicamentos torna os pacientes mais susceptíveis às infecções, além de serem medicamentos caros e inacessíveis á grande maioria da população (Yen, 2006).

4- Úlceras pépticas

A úlcera péptica (gástrica e duodenal) é uma doença heterogênea, com múltiplos fatores envolvidos na sua gênese e é uma das doenças crônicas mais comuns do adulto, acometendo de 5% a 10% da população mundial e apesar dos grandes avanços no conhecimento da doença ulcerosa péptica, a sua etiologia ainda não é totalmente conhecida (Carvalho, 2000). O conceito fisiopatológico básico é de que a úlcera péptica resulta da ruptura do equilíbrio existente entre os fatores agressivos (secreção e ação do ácido e da pepsina) e de defesa (secreção e ação do muco, prostaglandinas-PG e bicarbonato). Sabe-se também, que existe uma grande variedade de fatores endógenos relacionados à fisiopatologia da gastroproteção tais como: PG, gastrina, antioxidantes, somatostatina, óxido nítrico e compostos sulfidrílicos (Tsukimi *et al.*, 2001). A etiopatogênese da doença ulcerosa agrupa fatores genéticos, distúrbios fisiopatológicos e fatores ambientais como o álcool, a alimentação, as DAINE, *Helicobacter pylori*, dentre outros (Tsukimi *et al.*, 2001).

A expansão global no consumo de álcool e o uso indiscriminado na automedicação com DAINE têm contribuído para o crescimento da etiopatologia das úlceras gástricas em particular (Andreo *et al.*, 2006). As DAINE estão entre os agentes farmacológicos mais utilizados clinicamente, e a sua habilidade de causar ulceração gastrointestinal foi demonstrada há mais de 60 anos (Wallace, 2001). O efeito ulcerogênico das DAINE é devido à inibição da biossíntese de PG, mais especificamente da PGE₂. A inibição da PGE₂ aumenta a atuação dos secretagogos (histamina, gastrina e acetilcolina) que contribuem para a formação do processo lesivo, além do fato das DAINE promoverem distúrbios na microcirculação gástrica, aumento na infiltração de

neutrófilos, indução da expressão de TNF, desequilíbrio na expressão de NO e apoptose (Konturek *et al.*, 2002).

Nos Estados Unidos, o custo do tratamento da AR gira em torno de U\$6.000/ano por pessoa (Doan & Massarotti, 2005). Entretanto, estima-se que cerca de 30% do custo do tratamento das artrites são gastos relativos, exclusivamente, ao tratamento dos efeitos colaterais das DAINE sobre o trato gastrointestinal, como as úlceras e gastrites formadas na mucosa gástrica (Peura, 2004).

Apesar de todos os inconvenientes causados pelas DAINE, estas constituem a base da pirâmide no tratamento da AR e são os medicamentos mais prescritos no início do tratamento da AR. A sua prescrição é tolerável em tratamentos de curta duração, porém, em tratamentos de longa duração provocam efeitos colaterais graves tais como as freqüentes úlceras gástricas e suas complicações (perfurações e hemorragias) (Doan & Massarotti, 2005). Estudos demonstram que a prevalência de úlceras gástricas e duodenais, dentre os usuários crônicos das DAINE, está acima de 20%. Destes usuários crônicos das DAINE, cerca de 4% desenvolvem complicações mais graves. Nos EUA ocorrem mais de 100.000 hospitalizações e cerca de 15.000 mortes por ano são decorrentes de complicações pelo uso de DAINE (Peura, 2004).

Outro fato muito relevante na prevalência da AR é que pacientes com AR usuários de DAINE são muito mais susceptíveis as úlceras gástricas causadas por DAINE do que os usuários comuns destes anti-inflamatórios (Kato *et al.*, 2002). Além disso, Kato e colaboradores (2000) relatam que em modelos animais de AR, as lesões gástricas provocadas por DAINE são mais severas em animais portadores AR do que em animais não artríticos. Kato e

colaboradores (2002) demonstraram também que as drogas anti-inflamatórias conhecidas como inibidores seletivos da COX-2 (que não causam úlceras gástricas em ratos normais) são capazes de ocasionar úlceras gástricas em ratos com AR o que inviabiliza a sua utilização na terapêutica da AR.

Foi demonstrado também que o processo de cicatrização das úlceras crônicas em ratos com AR é bem menos eficiente do que em ratos não artríticos. Também foi observado que a administração de DAINÉ retarda ainda mais o processo de cicatrização das úlceras crônicas nestes animais (Kato *et al.*, 1999). Portanto, a descoberta que um fármaco capaz de mitigar os efeitos deletérios das DAINÉ sobre o trato gastrointestinal sem prejudicar seu efeito terapêutico seria de grande utilidade no tratamento da AR.

Segundo Yen (2006), os custos dos tratamentos modernos para a AR são muito elevados e por isso são limitados a poucos pacientes, principalmente nos países em desenvolvimento. Portanto, é plenamente justificável, relevante e urgente a busca e o desenvolvimento de novas opções terapêuticas mais eficientes e seguras para o tratamento da AR.

5- Plantas medicinais

Plantas e seus derivados são as maiores fontes de novos fármacos da atualidade, movimentando cerca de 30% do mercado farmacêutico (Kirkpatrick *et al.*, 2002). De acordo com Newman *et al.* (2003), entre os anos de 1981 a 2002, foram introduzidas 877 novas moléculas no mercado farmacêutico. Destas novas moléculas, em torno de 49% eram substâncias isoladas de produtos naturais, semi-sintéticos, derivados de produtos naturais ou então moléculas sintetizadas que utilizaram como protótipos, estruturas de origem

natural. Além disso, dos fármacos descobertas em estudos com produtos naturais, 25% pertencem ao grupo das plantas superiores (Gurib-Fakim, 2006). Portanto, a possibilidade de se encontrar novas moléculas a partir de produtos naturais é imensurável (GürBüz *et al.*, 2003).

Dentre as várias opções de espécies medicinais, nosso grupo de pesquisas multidisciplinar vem estudando a espécie *Citrus aurantium* L. (família Rutaceae), popularmente conhecido como laranja-amarga ou laranja-azeda (Santos *et al.*, 1988; Sanguinetti, 1989; Vieira, 1992). Esta espécie é uma das espécies vegetais mais empregadas para usos medicinais (Corrêa, 1978). As partes mais utilizadas para fins medicinais, são as cascas dos frutos, flores e folhas. A espécie é utilizada popularmente para o tratamento de distúrbios do trato gastrointestinal, além de apresentar ação diurética, antiespasmódica e anti-taquicárdica (Santos *et al.*, 1988; Sanguinetti, 1989; Vieira, 1992; Cordeiro *et al.*, 1996). Merece destaque, dentre as suas indicações populares não comprovadas, a propalada ação anti-reumática (Santos *et al.*, 1988; Sanguinetti, 1989; Vieira, 1992).

A caracterização fitoquímica do óleo essencial obtido das cascas do fruto de *Citrus aurantium* (parte mais utilizada na etnofarmacologia desta espécie) apontou a presença de três constituintes majoritários: d-limoneno (97,8%), mirceno (1,43%) e octanal (0,45%) (Moraes *et al.*, 2009).

Em estudos anteriores, (Moraes *et al.*, 2009), mostramos que o óleo essencial das cascas de *C. aurantium* (OEC) e o limoneno (LIM), seu constituinte majoritário (97%), possuem potentes ações gastroprotetoras e cicatrizantes das úlceras gástricas em roedores e que o OEC e o LIM, são capazes de promover uma excelente gastroproteção, inclusive em úlceras

gástricas induzidas por DAINE. Constatamos também que esta atividade antiulcerogênica do OEC e do LIM são decorrentes de uma ação conservativa dos níveis de PGE₂ na mucosa gástrica de ratos tratados com DAINE. Considerando que PGE₂ é um fator protetor da mucosa gástrica, bem como um acelerador da cicatrização da mucosa, podemos concluir que o OEC e o LIM atuam sobre a modulação dos níveis de PGE₂ (Moraes *et al.*, 2009).

O d-limoneno, é um dos terpenos mais comuns na natureza. Devido a sua agradável fragrância cítrica é comumente usado como flavorizante em alimentos e bebidas (Sun, 2007). Este terpeno está listado no *Code of Federal Regulation* dos EUA como uma molécula segura para ser usada como flavorizante. Em média, uma pessoa de 60 kg dos EUA ingere cerca de 16,2 mg de d-limoneno por dia na alimentação (Manufacture's Association, 1991). O consumo de doses diárias deste terpeno por mais de um ano em humanos, apresentou baixíssima toxicidade (Sun, 2007). Além disso, este composto é rapidamente e quase que completamente absorvido pela via oral tanto em humanos quanto em animais experimentais (Igimi *et al.*, 1974). A DL₅₀ (dose letal capaz de causar mortalidade em 50% dos animais) de d-limoneno em ratos machos e fêmeas é de 4,4 e 5,1 g/kg, respectivamente (Limonene Monograph, 1999). Estes dados comprovam, portanto, a baixa toxicidade deste composto em ensaios *in vivo*. Testes em animais também têm comprovado a eficácia do d-limoneno contra vários tipos de câncer como os de mama, adenoma pulmonar, fígado e gástrico (Sun, 2007).

Gerhäuser e colaboradores (2003) e Wei & Shibamoto (2007) demonstraram que d-limoneno possui comprovada ação antioxidante ao inibir a expressão das espécies reativas ao oxigênio (ERO) em ensaios *in vitro*.

Lieshout *et al.*, (1998) demonstraram que o d-limoneno foi capaz de aumentar os níveis de glutathione S-transferase (GST), enzima com atividade antioxidante e anticâncer. Souza *et al.*, (2003) e Toro-Arreola *et al.* (2005) comprovaram que a atividade imunoreguladora do d-limoneno é decorrente de uma redução da reação de hipersensibilidade e também da inibição da produção de óxido nítrico (NO) e das citocinas inflamatórias (IL-4 e interferon- γ). O limoneno também tem comprovada atividade antiasmática, pois diminuiu o infiltrado inflamatório perivascular e peribronquiolar em ratos asmáticos (Keinan *et al.*,2005).

A partir dos resultados obtidos no trabalho anterior (Moraes *et al.*, 2009) demonstramos que tanto o óleo essencial de *Citrus aurantium* (OEC) quanto o limoneno (LIM) apresentaram atividade gastroprotetoras frente á úlceras gástricas induzidas por DAINÉ. Também foi observado anteriormente que tanto o OEC quanto LIM foram capazes de manter os níveis basais de PGE₂ na mucosa gástrica mesmo com a administração de DAINÉ (Moraes *et al.*, 2009). Os efeitos gastrointestinais lesivos das DAINÉ são ainda um dos maiores complicadores do uso destes fármacos no tratamento de doenças inflamatórias (Avila *et al.*, 1995). Portanto, um medicamento que possua ação anti-inflamatória associada a uma ação gastroprotetora seria extremamente útil. Em vista disso, neste trabalho foi avaliada a possibilidade do OEC e LIM atuarem como possíveis adjuvantes utilizados em associação com as DAINÉ a fim de evitar seus efeitos colaterais lesivos no trato gastrointestinal sem prejudicar a ação anti-inflamatória da mesma.

II - OBJETIVO

Considerando a vasta literatura disponível sobre as ações biológicas do limoneno e os resultados anteriores obtidos em nosso laboratório sobre as atividades gastroprotetora e cicatrizante do OEC e do limoneno, (Moraes *et al.*, 2009; Moraes 2008), os objetivos deste trabalho foram:

- 1- Avaliar a ação cicatrizante e gastroprotetora do limoneno na mucosa gástrica de ratos artríticos;
- 2- Avaliar a atividade anti-inflamatória do limoneno *per si* e em associação com uma DAINÉ em modelos de inflamação aguda e crônica (artrite reumatóide).

III - MATERIAL E MÉTODOS

1- Animais

Para os modelos experimentais *in vivo*, foram utilizados ratos Wistar machos (150 a 200g) obtidos do Centro de Bioterismo da UNESP-Botucatu e, aclimatados ao Biotério Setorial do Depto. de Fisiologia do Instituto de Biociências UNESP-Botucatu por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, mantidos sob temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e submetidos ao ciclo de claro-escuro controlado de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração Guabi[®] e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram aos protocolos experimentais aprovados, previamente, pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu- SP.

2- Doses

A dose do OEC utilizada foi de 250 mg/kg, pois se trata da menor dose mais efetiva do óleo, de acordo com Moraes *et al.*, (2009). A dose do LIM (245 mg/kg) foi calculada levando consideração a composição do OEC que é de aproximadamente 97% de limoneno.

3- Edema de pata induzido por carragenina

Os animais foram submetidos a jejum prévio de 12 horas e em seguida foram tratados oralmente com: veículo (tween 80 a 8%), DAINE (Piroxicam 30 mg/kg), OEC (250 mg/kg), LIM (245 mg/kg), DAINE + LIM (30 + 245 mg/kg) e DAINE + OEC (30 + 250 mg/kg). Os tratamentos foram feitos 1 hora antes da injeção subcutânea de 50 μL /pata de carragenina (Sigma) a 1% na região

subplantar da pata posterior direita e 50 µL de solução salina a 0,9% na pata contralateral, de acordo com o método (Levy, 1969). Decorridas 1, 2, 3 e 4 horas após a administração do agente flogístico, o volume das patas (abaixo da articulação tíbio-társica) foi medido com o auxílio do pletismômetro (Ugo-Basile, Itália). Os resultados foram calculados pela diferença de volume deslocado entre as patas posteriores em ml.

4- Indução de edema de pata com histamina, serotonina, substância P e bradicinina (BK)

Após 12 horas de jejum, os animais foram tratados (v.o) com veículo (tween 80 a 8%) e LIM (245 mg/kg) uma hora antes da administração dos agentes inflamatórios. O edema de pata foi induzido na pata direita de ratos através de uma injeção sub-plantar de histamina (100nmol), substância P (30 nmol/pata), serotonina (100 nmol/pata), bradicinina BK (3 nmol/pata) diluído em salina e na pata esquerda foi injetado 50 µL de salina por pata (Tratsk *et al.*, 1997). Para os experimentos com BK os animais foram pré-tratados com Captopril (5 mg/kg, s.c) uma hora antes do experimento para prevenir a ação das quinases (Correa e Calixto, 1993). Os volumes das patas foram mensurados com o auxílio de um pletismômetro (Ugo-Basile, Itália) 30, 60, 90 e 120 minutos após a aplicação dos agentes inflamatórios. Os resultados foram calculados pela diferença de volume deslocado entre as patas posteriores em ml.

5- Modelo de *air pouch*

O modelo de *air pouch* foi realizado em camundongos Swiss machos (30-40g) de acordo com a metodologia descrita por Sin e Wong (1992), com algumas modificações. Para a implementação da bolsa de ar no dorso dos

animais os camundongos foram anestesiados e 5 ml de ar estéril foi injetado (s.c.) no dia 0, seguido por uma segunda injeção de 3 ml de ar estéril 3 dias depois (dia 3). No dia 6, 1 ml de solução de carragenina (Sigma) a 0,5% foi injetado dentro da cavidade. Os animais foram sacrificados 24h após a injeção de carragenina, a bolsa de ar foi lavada com 1 ml de PBS (tampão fosfato salino), o exudato foi coletado, e a atividade da mieloperoxidase de neutrófilos foi mensurada como descrito abaixo. Os animais foram tratados via oral com veículo (tween 80 a 8%), OEC (250 mg/kg) e LIM (245 mg/kg) ou injeção *intra-pouch* de 10 µl de OEC ou LIM 1 hora antes da injeção de carragenina.

6- Indução de edema de pata por carragenina para quantificação de citocinas

O edema de pata induzido por carragenina é um modelo comumente utilizado para avaliar a ação anti-inflamatória de novas drogas (Vinegar *et al.*, 1969; Fernandes *et al.*, 2007). O edema foi induzido em ratos através de uma injeção intra-plantar de 50 µL de solução de carragenina (Sigma) 1% na pata esquerda posterior. Uma hora antes da indução do edema os animais foram tratados via oral com veículo (tween 80 a 8%), OEC (250 mg/kg) e LIM (245 mg/kg). O grupo Dexa (controle positivo) foi tratado com dexametasona (0,5 mg/kg) quatro horas antes da indução (Fernandes *et al.*, 2007). Os animais de um quinto grupo receberam injeção de 50 µL de salina na pata, ao invés da carragenina e serviram como controle basal. Quatro horas após a indução do edema os animais foram mortos e o tecido subcutâneo das patas foi coletado para dosagem das citocinas TNF e IL-1β.

7- Dosagens de IL-1 β , TNF e IL-10

Para a realização da dosagem dessas citocinas foram coletados os seguintes tecidos: subcutâneo da pata ou mucosa gástrica. Em seguida foram homogeneizados individualmente em um mixer Polytron, com volume de tampão PBS (tampão fosfato salino) igual a quatro vezes o peso da amostra. A solução obtida foi centrifugada e o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80°C para posterior realização das dosagens. As dosagens foram realizadas utilizando-se kits DuoSet ELISA Development System, da R&D Systems e a leitura foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm.

8- Modelo de indução de artrite reumatóide (AR)

A artrite foi induzida por injeção subcutânea na base da cauda de 100 μ l de emulsão de colágeno bovino a 2 mg/ml dissolvido em solução de ácido acético 0,1 M e adjuvante completo de Freund, na proporção 1:1. Os ratos receberam a aplicação da emulsão no primeiro e no décimo dias do experimento. Um grupo de animais controle (sem artrite) foi mantido nas mesmas condições, para a observação e comparação das características dos animais com a artrite implantada. A inflamação crônica e sistêmica da AR foi confirmada pelo desenvolvimento de edema nas patas traseiras dez dias após a segunda injeção de colágeno (Durie *et al.*, 1994), e a avaliação do edema foi realizada durante 14 dias através da mensuração do volume da pata em pletismômetro (Ugo Basile, Itália).

9 - Indução de úlceras agudas induzidas por indometacina (DAINE) em ratos artríticos (RA)

Este experimento teve a finalidade de avaliar o efeito da indução de úlceras agudas por indometacina em animais artríticos e normais. Os ratos artríticos (RA) foram utilizados para a metodologia 10 dias após a segunda injeção da emulsão de colágeno bovino e só foram utilizados os animais com diagnóstico positivo para artrite (manifestação de edema nas patas traseiras). O experimento foi realizado segundo a metodologia descrita por Puscas *et al.*, (1997), com modificações. Os animais foram divididos em quatro grupos: veículo (tween 80 a 8%), IB (Ibuprofeno 100 mg/kg), LIM (245 mg/kg) e LIB (245 + 100 mg/kg). Outros quatro grupos de animais sem artrite receberam os mesmos tratamentos para servirem como comparativo aos animais artríticos. Trinta minutos após os tratamentos, as lesões gástricas foram induzidas através da administração oral de indometacina 100 mg/Kg. Os animais foram mortos 5 horas após o estímulo lesivo tendo seus estômagos removidos e abertos ao longo da maior curvatura para a contagem e classificação das lesões gástricas determinadas (área), em seguida foram coletadas amostras dos estômagos para posteriores quantificações de citocinas e fatores protetores da mucosa gástrica.

10 - Modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético em ratos artríticos (RA)

A lesão gástrica foi implantada após a manifestação da artrite reumatóide, evidenciada pela presença de edema nas patas traseiras. Após 12 horas de jejum, os ratos artríticos foram anestesiados e seu abdômen foi aberto abaixo da apófise xifóide para exposição do estômago. Um tubo de 4,2 mm de diâmetro interno foi mantido firmemente em contato com a superfície serosa da

parede do estômago para delimitar a região exposta ao agente lesivo. Em seguida, 70 µl de ácido acético (100%) foram aplicados na superfície do estômago durante 20 segundos e em seguida removidos completamente. A superfície serosa do estômago foi lavada abundantemente com salina para assegurar a total remoção do agente lesivo antes da sutura do abdômen. O processo resultou em ulceração crônica da mucosa e submucosa na região da junção do fundo com o antro. A metodologia foi realizada com base no método descrito por Okabe *et al.* (1971), modificado por Konturek *et al.* (1988). Transcorridas 24 horas do procedimento cirúrgico de implantação da úlcera gástrica, os animais foram tratados por via oral, uma vez ao dia durante catorze dias, com: veículo (tween 80 a 8%), IB (ibuprofeno, 100 mg/kg), LIM (245 mg/kg) e limoneno + ibuprofeno LIB (245 + 100 mg/kg). No 14º dia após o início do tratamento os animais foram mortos e coletou-se o tecido subcutâneo da pata, plasma e o estômago de cada animal para avaliação dos parâmetros relacionados à artrite e à lesão gástrica.

11- Determinação dos níveis de prostaglandina (PGE₂) no plasma

Após o tratamento de 14 dias, os animais submetidos ao modelo de indução de úlcera por ácido acético, foram mortos por guilhotinamento para a coleta do sangue, que foi centrifugado e teve o plasma coletado. A quantificação dos níveis de PGE₂ no plasma foi realizada com base no método descrito por Curtis *et al.*, (1995). O nível de prostaglandina foi mensurado com o auxílio de um “kit” de dosagem imunoenzimático de prostaglandina E₂ (RPN222-Amersham, EUA) e a leitura foi realizada em leitor de ELISA Biossistem a 490nm.

12- Determinação do conteúdo de glutathiona total (GSH) na mucosa gástrica

A determinação do conteúdo de glutathiona total foi realizado de acordo com o método descrito por Anderson (1985) que se baseia na oxidação total da glutathiona reduzida (GSHr) presente em uma amostra na sua forma oxidada (GSSG), mediante a incubação da amostra com o ácido ditiobisnitrobenzólico (DTNB). A determinação do conteúdo de glutathiona total foi realizado em amostras da mucosa gástrica de ratos submetidos aos modelos de indução de úlcera gástrica. As amostras foram homogeneizadas com uma solução de ácido tri-cloro-acético (TCA) 5% em uma proporção final de 1:20. A concentração de glutathiona foi calculada a partir da pendente da curva obtida por interpolação em uma curva-padrão realizada com glutathiona (GSH) e os resultados foram expressos como nmol/g de tecido.

13- Quantificação dos níveis de mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima peroxidase produzida por células da linhagem mielóide, principalmente neutrófilos. O objetivo deste método foi o de avaliar a atividade da MPO na mucosa gástrica de ratos submetidos aos diferentes modelos experimentais de úlcera gástrica e também no exsudato coletado no modelo de *air-pouch*. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato com brometo hexadeciltrimetilamonia e sua atividade medida através da reação entre a mieloperoxidase e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), sendo revelado pela o-dianisidina e quantificado em leitor de placa de ELISA pelo comprimento de onda de 450 nm (Krawisz *et al.*, 1984).

14- Análise de RT-PCR para COX-1

Para análise de “*Reverse transcription polymerase chain reaction*” (RT-PCR) em tempo real, o RNA total foi isolado de amostras dos estômagos de ratos normais e artríticos submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por indometacina usando reagente Trizol (Invitrogen) e incubados de 3-6 horas na concentração de 25.0 mg/mL. O RNA foi submetido a primeira cadeia de síntese de cDNA com transcriptase reversa SuperScript III (Invitrogen). As quantificações da expressão gênica foram realizadas por PCR tempo real com Platinum SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) com ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). β -actina foi utilizada como gene endógeno. Os *primers* específicos utilizados para amplificação de foram: COX-1, senso 5'-AGC CCC TCA TTC ACC CAT CAT TT-3', anti-senso 5'-CAG GGA CGC CTG TTC TAC GG-3'; β -actinA, senso 5'-GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AGG-3', anti-senso 5'-TTG TAA CCA ACT GGG ACG ATA TGG-3. As condições de amplificação foram 50° C durante 2 min e 94°C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de 94°C durante 15 s e 60°C durante 1 min. A curva de dissociação foi obtida da seguinte forma: 95°C durante 15 s, 60°C durante 30 s e 95°C durante 15 s. Os níveis relativos de mRNA foram calculados de acordo com a Pfaffl *et al.*, (2001).

15- Análise Estatística

A avaliação estatística dos resultados foi realizada empregando-se análise de variância (ANOVA) paramétrica, com nível crítico igual ou menor a 0.05 para rejeição da hipótese de nulidade. Na presença de significância, foram procedidas à análise de contraste entre as médias aplicando-se os testes a

posteriori (Dunnet ou Tukey) adequados para cada parâmetro obtido com nível de significância igual ou menor a 0.05.

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1- Modelos de inflamação aguda.

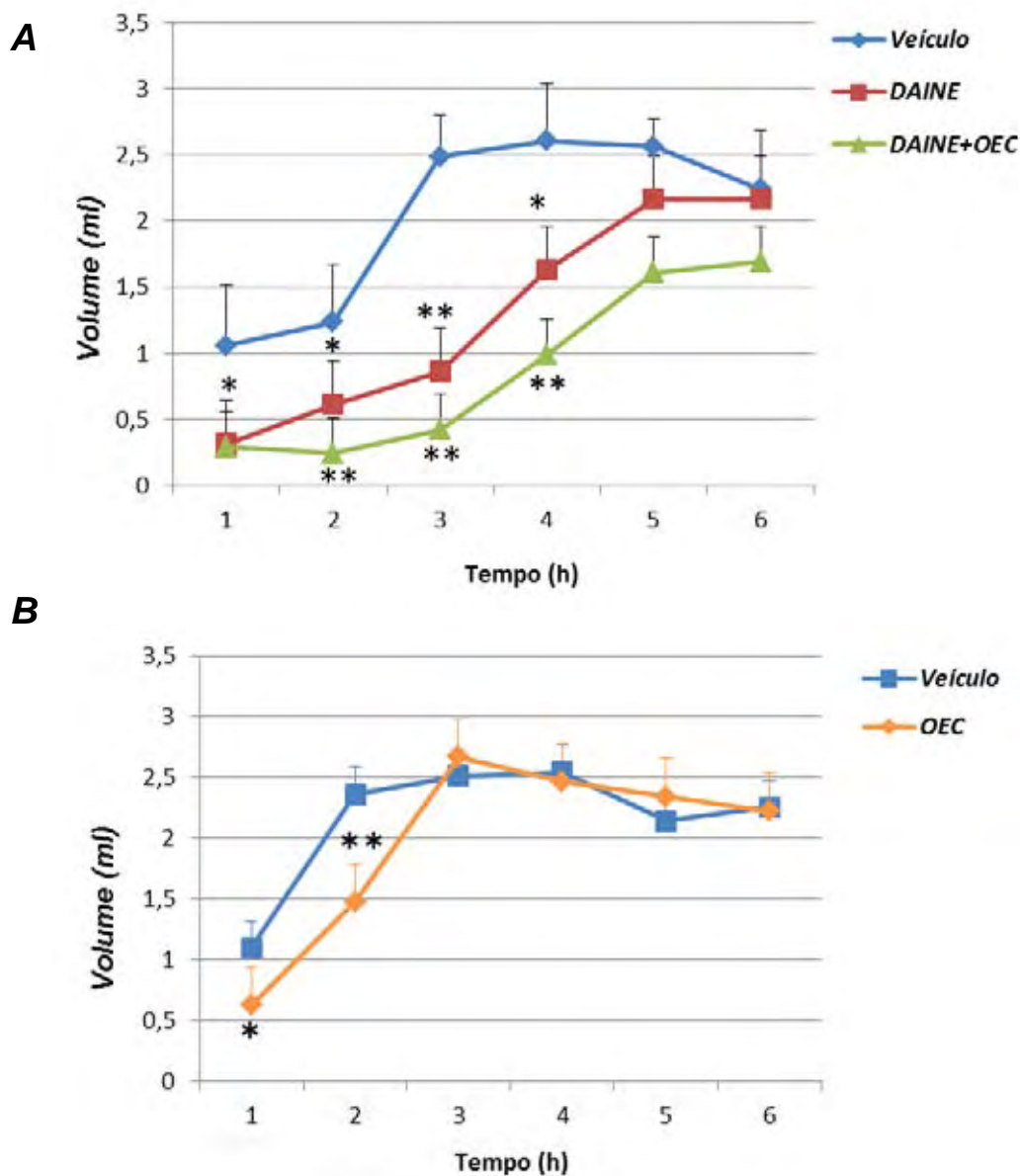
A partir dos resultados obtidos no trabalho anterior (Moraes *et al.*, 2009) demonstramos que tanto o óleo essencial de *Citrus aurantium* (OEC) quanto o limoneno (LIM) apresentaram atividade gastroprotetoras frente á úlceras gástricas induzidas por DAINÉ. Também foi observado anteriormente que tanto o OEC quanto LIM foram capazes de manter os níveis basais de PGE₂ na mucosa gástrica mesmo com a administração de DAINÉ (Moraes *et al.*, 2009). Os efeitos gastrointestinais lesivos das DAINÉ são ainda um dos maiores complicadores do uso destes fármacos no tratamento de doenças inflamatórias (Avila *et al.*, 1995). Portanto, um medicamento que possua ação anti-inflamatória associada a uma ação gastroprotetora seria extremamente útil. Em vista disso, neste trabalho foi avaliada a possibilidade do OEC e LIM atuarem como possíveis adjuvantes utilizados em associação com as DAINÉ a fim de evitar seus efeitos colaterais lesivos no trato gastrointestinal sem prejudicar a ação anti-inflamatória da mesma. Para avaliar esta hipótese, utilizou-se o modelo de indução de edema de pata em ratos, visto que este modelo é comumente utilizado para avaliar a ação anti-inflamatória de novas drogas (Vinegar *et al.*, 1969; Fernandes *et al.*, 2007).

A partir dos resultados expressos na figura 1A é possível observar que o tratamento conjugado de DAINÉ+OEC foi capaz de reduzir significativamente a ação edematogênica do agente flogístico carragenina nas 4 primeiras horas de observação. Também pode-se observar que esta ação antiinflamatória conjunta entre OEC e DAINÉ foi relativamente mais intensa do que somente o

tratamento com DAINE, que também apresentou ação anti-inflamatória nas 4 primeiras horas de avaliação, ou seja, os resultados demonstram que a associação do OEC com DAINE foi capaz de intensificar a atividade antiinflamatória destas drogas.

Considerando o resultado apresentado pelo tratamento conjugado de DAINE+OEC, foi realizada a avaliação da ação do OEC isoladamente no mesmo modelo experimental. Os resultados expressos na figura 1B mostram que o OEC por si possui significativa atividade anti-inflamatória nas 2 primeiras horas após a indução do edema de pata.

Figura 1 – Avaliação da atividade anti-inflamatória do piroxicam (DAINE) e do conjugado (DAINE + OEC) (gráfico A) e do OEC (gráfico B) no modelo de indução de edema de pata em ratos por carragenina.



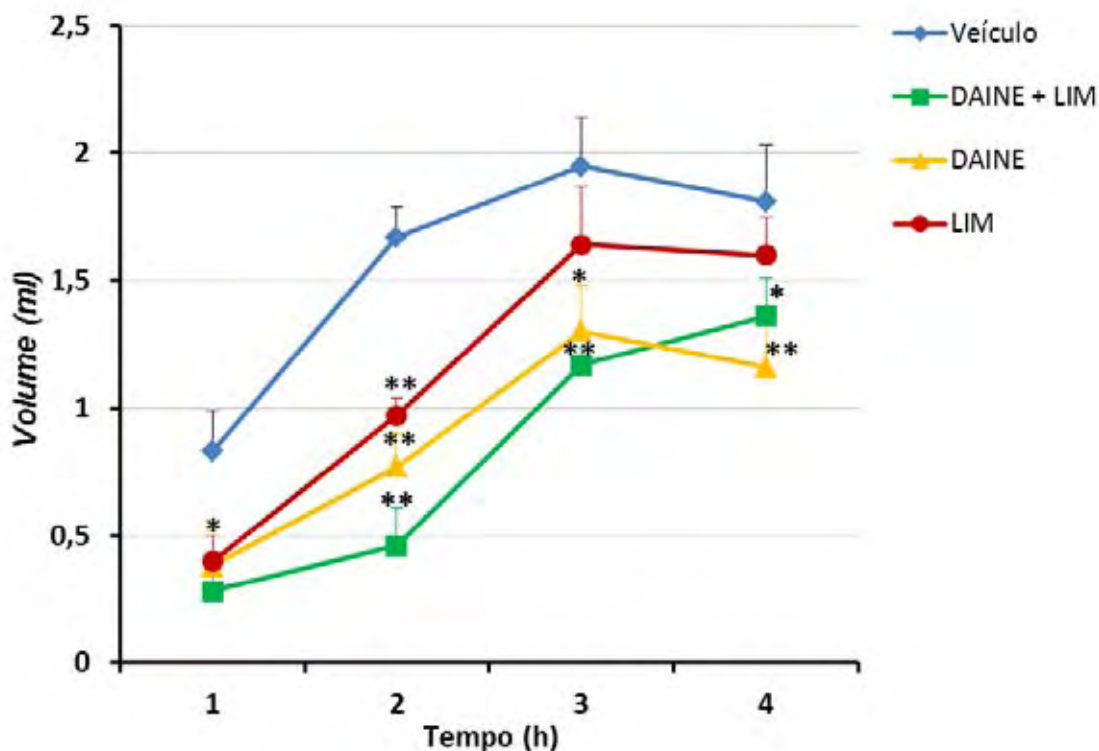
Os resultados expressam as diferenças nos volumes das patas em ml, média \pm d.p. ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Tukey * $p < 0,05$ e ** $p < 0.01$ (n=7).

A partir dos resultados observados, podemos concluir que o OEC além de ser capaz de neutralizar os efeitos lesivos das DAINÉ no estômago (Moraes *et al.*, 2009), também é capaz de exercer uma ação anti-inflamatória.

Sendo assim, a próxima etapa do trabalho foi a avaliar a contribuição do limoneno (LIM), constituinte majoritário do OEC, sobre o efeito anti-inflamatório observado com o OEC no modelo de indução de edema de pata por carragenina.

Os resultados estão expressos na figura 2 e mostram que o LIM (245 mg/kg) por si tem uma atividade anti-inflamatória nas 2 primeiras horas após a indução do edema de pata, porém este efeito não se manteve nos demais períodos observados. Já nos animais tratados com DAINE (piroxicam 30 mg/kg) foi observada uma redução da inflamação nas 4 primeiras horas de avaliação. O mesmo resultado anti-inflamatório foi constatado nos animais tratados com o conjugado DAINE+LIM (30 + 245 mg/kg). Porém podemos observar que os animais deste último grupo apresentaram resultados mais expressivos, visto que seus edemas foram os menores observados dentre os grupos avaliados, esta ação foi muito semelhante ao que foi observado nos animais tratados com DAINE+OEC.

Figura 2 – Avaliação da atividade anti-inflamatória do piroxicam (DAINE), limoneno (LIM) e do conjugado (DAINE + LIM) no modelo de indução de edema de pata por carragenina em ratos.



Os resultados expressam as diferenças nos volumes das patas em ml, média \pm d.p. ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Tukey * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (n=7).

A análise comparativa das figuras 1 e 2 mostra que tanto o OEC quanto o LIM são capazes de inibir a ação edematogênica da carragenina nas 2 primeiras horas de avaliação, bem como ambos são capazes de exercer a atividade anti-inflamatória em conjunto com as DAINÉ através de uma ação sinérgica.

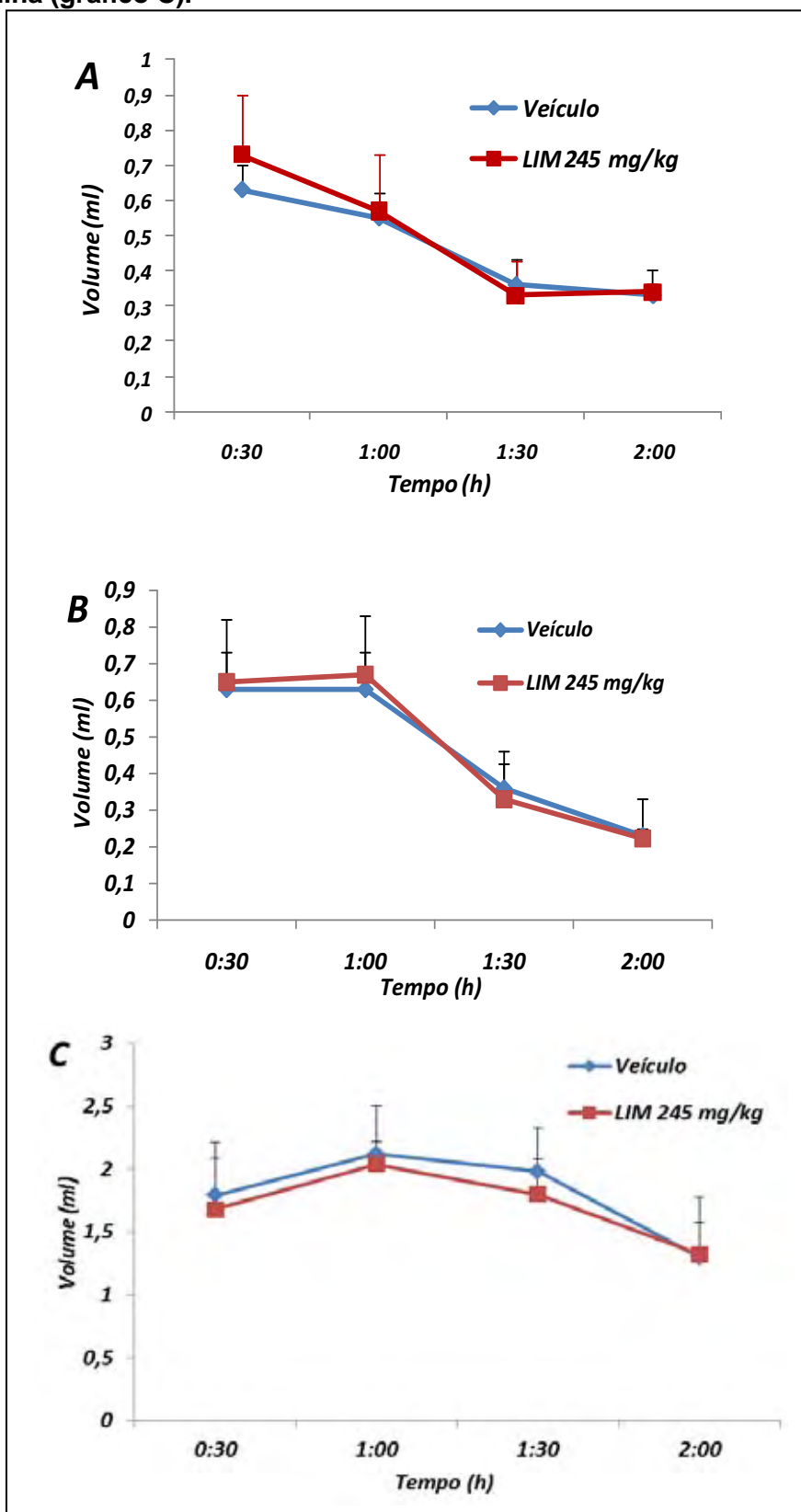
O modelo de indução de edema de pata por carragenina em ratos é uma metodologia amplamente utilizada para avaliação de atividade anti-inflamatória de novos fármacos (Posadas *et al.*, 2004) e já foi muito bem descrita no passado (Di Rosa *et al.*, 1971; Garcia Leme *et al.*, 1973). Segundo

Di Rosa *et al.*, (1971), o processo inflamatório gerado pela administração de carragenina forma um edema na pata de ratos e este edema é caracterizado por duas fases: a imediata nas duas primeiras horas, que é caracterizada pela liberação de histamina, bradicinina, serotonina (5-hidroxitriptamina) e substância P (Gilligan *et al.*, 1994) e a fase tardia, a partir da terceira hora, que é sustentada pela liberação de prostaglandinas no local. Outro importante mediador inflamatório da fase imediata é o óxido nítrico (NO) que é produzido em condições fisiopatológicas pela iNOS (Moncada & Higgs, 1991). Esses mediadores, tanto da fase da fase imediata quanto da tardia, promovem o aumento da permeabilidade vascular que é seguido de uma infiltração celular, predominantemente de neutrófilos, que contribuem com a resposta inflamatória produzindo outros mediadores, ânions superóxidos e radicais hidroxílicos (Fantone & Ward, 1982).

Considerando que o tratamento com OEC (250 mg/kg) e LIM (245 mg/kg) resultou no mesmo tipo de resposta (ação anti-inflamatória restrita as 2 primeiras horas de avaliação do edema de pata), avaliamos a ação do LIM sobre os mediadores (histamina, serotonina, substância P e bradicinina) envolvidos com a fase imediata da inflamação no modelo de edema de pata.

A figura 3 ilustra a avaliação da atividade anti-inflamatória do LIM no modelo de indução de edema de pata por histamina (gráfico A), substância P (gráfico B) e serotonina (gráfico C) e podemos observar que o LIM não foi efetivo em reduzir o edema causado por estes diferentes agentes edematogênicos mais específicos.

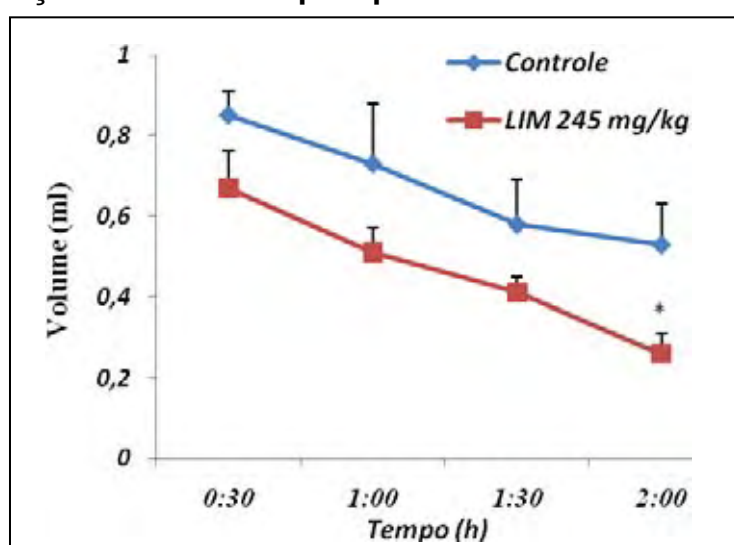
Figura 3 – Avaliação da atividade anti-inflamatória do limoneno (LIM) no modelo de indução de edema de pata por histamina (gráfico A), substância P (gráfico B) e serotonina (gráfico C).



Os resultados expressam as diferenças nos volumes das patas em ml, média \pm d.p. ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Tukey, $p > 0,05$ ($n = 7$).

A figura 4 ilustra ação do LIM (245 mg/kg) frente ao modelo de indução de edema de pata por bradicinina. O LIM foi efetivo em reduzir a ação edematogênica da bradicinina na última avaliação (2 h). Nota-se também que nos animais tratados com LIM o processo inflamatório induzido pela bradicinina foi menos intenso durante todo o período das avaliações.

Figura 4 – Avaliação da atividade anti-inflamatória do limoneno (LIM) no modelo de indução de edema de pata por bradicinina.



Os resultados expressam as diferenças nos volumes das patas em ml, média \pm d.p. ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Tukey * $p < 0,05$ (n=7).

As cininas, das quais o membro mais conhecido é a bradicinina, têm sido relacionadas como importantes mediadores inflamatórios. As cininas são sintetizadas periféricamente no sistema nervoso central e também nos locais de lesão tecidual, onde participam da resposta inflamatória aguda, na reparação tecidual e na cura do processo inflamatório (Aluwalia *et al.*, 1999). Além disso, as cininas têm efeitos aparentemente sem relação com seus papéis como mediadores inflamatórios, incluindo por exemplo a participação no controle da pressão arterial (Hall, 1992).

O nome bradicinina (BK) foi cunhado por Rocha e Silva em 1949 e atribuído à substância produzida a partir da atividade de tripsina sobre globulinas do plasma que causou reduções na pressão arterial em cães e contração de íleo de cobaia. Na década de 1960, a BK foi purificada e em seguida estudos demonstraram suas propriedades inflamatórias (Aluwalia *et al.*, 1999). Conseqüentemente, a relevância da BK como mediador em processos inflamatórios se demonstrou com a comprovação de sua capacidade de promover vasodilatação, formação de edema, extravasamento celular e dor (Lewis, 1963).

Segundo Hall (1997) o efeito pró-inflamatório da BK está relacionado à sua capacidade de estimular a produção de NO nas células endoteliais dos capilares sanguíneos, promovendo vasodilatação e conseqüentemente aumento do extravasamento de plasma e células pró-inflamatórias ocasionando assim o edema. Yoon *et al.* (2010), demonstrou em macrófagos (RAW 264.7), que o limoneno é capaz de inibir a produção de NO bem como diminuir a expressão de iNOS, sendo assim podemos inferir que o LIM foi efetivo no modelo de indução de edema de pata por BK devido a sua capacidade de inibir a expressão de iNOS e conseqüentemente a produção de NO, evitando assim o extravasamento de fluídos e células e diminuindo a formação de edema.

2 – Avaliação do potencial anti-artrítico do OEC e LIM.

Após a constatação do efeito anti-inflamatório do OEC e do LIM em modelos de inflamação aguda quando administrados isoladamente ou em combinação com DAINE e somada a capacidade destes compostos em

promover a proteção da mucosa gástrica frente à ação lesiva das DAINÉ (Moraes *et al.*, 2009) foi levantada a hipótese de que estes compostos poderiam ser utilizados como adjuvantes as DAINÉ no tratamento de doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatóide.

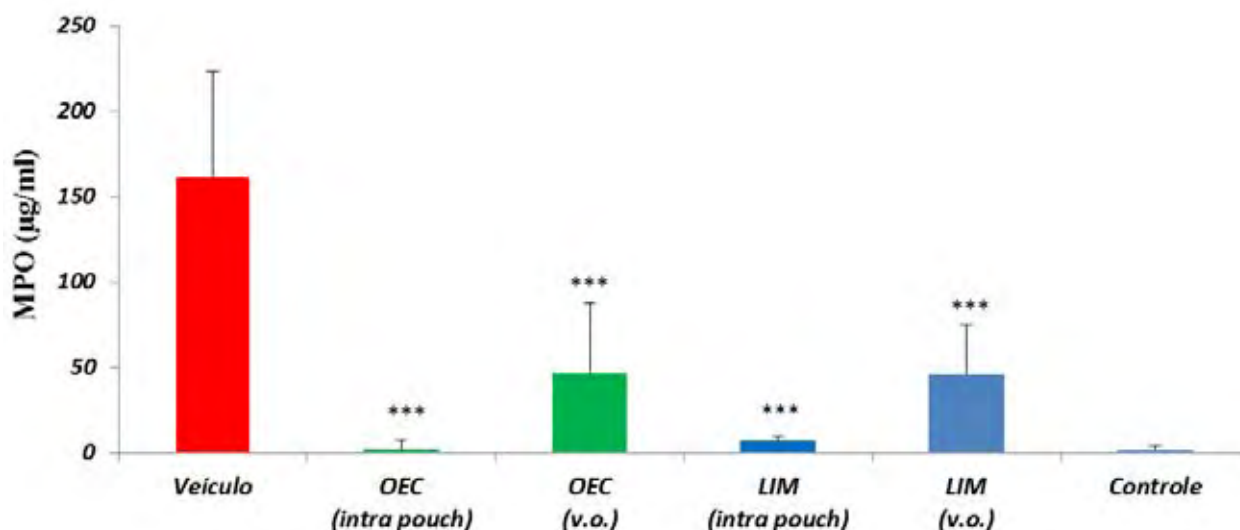
Em vista disso, foram realizados 2 modelos experimentais (*air-pouch* e ação sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 β) para avaliar uma possível atividade anti-artrítica do OEC e LIM.

O modelo de *air-pouch* é uma valiosa ferramenta experimental para avaliação de novas drogas anti-artríticas, considerando que o revestimento da bolsa de ar (*air-pouch*) produzida neste procedimento experimental é muito semelhantes às membranas sinoviais que são drasticamente comprometidas na artrite (Edwards *et al.*, 1981)

A figura 5 ilustra a atividade da enzima MPO no exsudato coletado nas bolsas de ar implantadas em camundongos. Todos os grupos, com exceção do grupo controle, receberam carragenina 0,5% (*intra pouch*), dentro da bolsa de ar para a instalação da inflamação. O grupo controle, neste modelo experimental, representa a atividade basal de MPO sem a ação do agente pró-inflamatório (carragenina). Os animais que foram tratados com OEC (250 mg/kg) ou LIM (245 mg/kg) pela via oral ou *intra pouch* apresentaram uma redução significativa nos níveis de MPO em relação ao grupo que recebeu apenas a carragenina. Este resultado demonstra que tanto o OEC quando o LIM são capazes de inibir a migração de neutrófilos aos sítios inflamatórios, quando administrados por via oral ou quando administrados localmente (*intra pouch*). O tratamento *intra pouch* com OEC e LIM demonstrou a ausência de

atividade irritante destes compostos, contrariando dados relatados na literatura que muitos monoterpenos possuem ação irritante.

Figura 5 – Avaliação da ação do OEC (250 mg/kg) e LIM (245 mg/kg) na níveis da MPO no modelo de *air pouch*.



Níveis de MPO média \pm d.p. Diferença significativa do grupo veículo, ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet *** $p < 0.001$.

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada primordialmente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos sendo comumente usada como marcador para avaliação da infiltração de neutrófilos nos tecidos e sua inibição é um importante indicador de atividade anti-inflamatória (Bradley *et al.*, 1982, Faurischou & Borregaard, 2003). Os neutrófilos apresentam papel efetivo na defesa contra bactérias, mas também estão associados aos processos de injúria e a sintomas de uma variedade de processos inflamatórios devido a sua capacidade de lesionar células e tecidos. Ao serem estimulados, os neutrófilos liberam espécies reativas de oxigênio e uma variedade de grânulos de proteínas. Sugere-se que influxo de neutrófilos ativos nos sítios de inflamação governa o processo inflamatório de diversas doenças (Carlson *et al.*, 2002). A figura 5 mostra que o OEC e LIM, administrados via oral ou local, foram

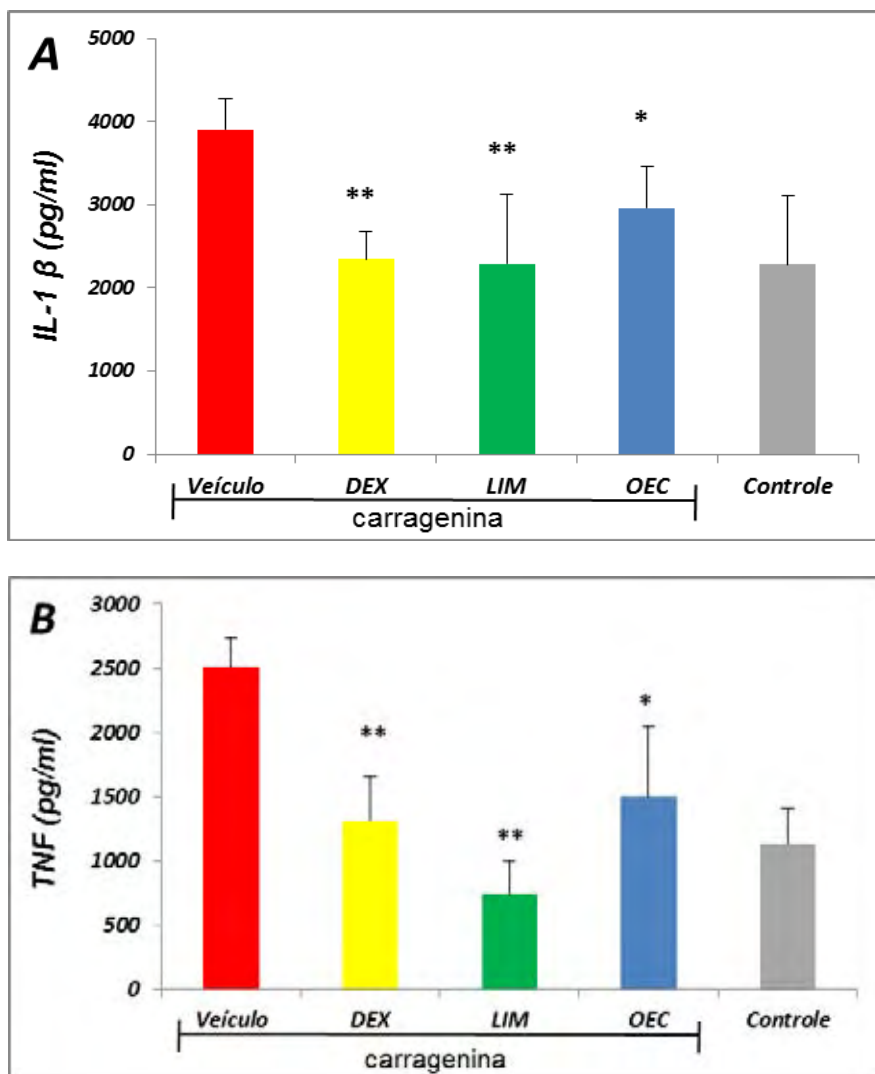
capazes de inibir a infiltração de neutrófilos em relação ao grupo controle tratado apenas com veículo. Uma possível explicação para esse resultado é a capacidade do limoneno em inibir a produção de NO (Yoon *et al.*, 2010), sendo assim, não ocorreria vasodilatação capilar e conseqüentemente o extravasamento celular de neutrófilos para o sítio inflamatório seria inibido.

Estudos sobre a patogênese da artrite reumatóide (AR) e sobre o papel das citocinas demonstram que o aumento do TNF e da IL-1 β são um dos principais fatores implicados na inflamação e na destruição da matriz celular que ocorrem na doença (Tracey *et al.*, 2008) e ambas as citocinas têm sido usadas como indicadores da severidade dos sintomas da artrite reumatóide (Sekiguchi *et al.*, 2010). TNF e IL-1 β são citocinas pró-inflamatórias produzidas normalmente pelo organismo e envolvidas na iniciação da inflamação. O TNF apresenta importante papel no desenvolvimento de tecidos linfóides e no sistema imune, incluindo a estimulação da inflamação (Atzeni *et al.*, 2010), enquanto a IL-1 β é produzida por diversos tipos celulares e está relacionada à ativação de leucócitos e à liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, como o próprio TNF (Netea *et al.*, 2010). Pinheiro & Calixto (2002), demonstraram que a injeção intra-plantar de carragenina em ratos leva a um proeminente aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias no tecido subcutâneo, particularmente IL-1- β e TNF. Sendo assim, neste trabalho foi avaliado os efeitos do tratamento com o OEC e LIM sobre a produção dessas citocinas pró-inflamatórias.

A figura 6 ilustra a quantificação das citocinas IL1- β (gráfico A) e TNF (gráfico B) realizada na pata dos animais submetidos ao modelo de edema de pata induzido por carragenina. Os resultados demonstraram que tanto o LIM

(245 mg/kg) quanto o OEC (250 mg/kg) foram efetivos em reduzir os níveis de IL1- β e TNF quando comparados com o grupo que recebeu apenas o veículo. O grupo controle, neste modelo experimental, representa o grupo de animais onde se avaliou o parâmetro basal destas citocinas, visto que os animais não receberam a aplicação do agente pró-inflamatório (carragenina) na pata.

Figura 6: Quantificação dos níveis de IL-1 β (gráfico A) e TNF (gráfico B) na pata de ratos no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos.



Resultados expressos em média \pm d.p. ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (n=5).

Na avaliação da possível atividade anti-artrítica do OEC e do LIM os resultados obtidos indicaram que ambos são capazes de inibir a migração de neutrófilos ao sítio inflamatório (*air-pouch*) bem como são efetivos na redução da produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL1- β e o TNF, confirmando assim, o potencial anti-artrítico dos compostos analisados.

Considerando a semelhança nas ações gastroprotetoras (Moraes *et al.*, 2009) e anti-inflamatórias promovidas pelo tratamento com OEC e LIM e também o fato do OEC ser composto basicamente por limoneno (97%), optou-se a partir deste momento dar continuidade aos estudos com ratos artríticos apenas com o limoneno.

3 – Modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina em ratos artríticos.

A primeira linha de tratamento clínico para doenças as inflamatórias são as DAINE e dentre elas o Ibuprofeno é um dos mais utilizados. De acordo com Peura (2004), fármacos como o ibuprofeno e a aspirina, matam cerca de 16500 norte-americanos a cada ano e provocam cerca de 103 mil hospitalizações devido a complicações como sangramento gastrointestinal. Considerando o importância clínica deste fármaco e sua comprovada atividade anti-artrítica em modelos experimenatis (Singh *et al.*, 2007) foi utilizado neste trabalho o ibuprofeno como controle positivo em nosso experimento na dose de 100 mg/kg. A administração do ibuprofeno nos diferentes modelos experimentais aconteceu isoladamente (IB 100 mg/kg) ou em associação com o limoneno (LIB) (245 + 100 mg/kg).

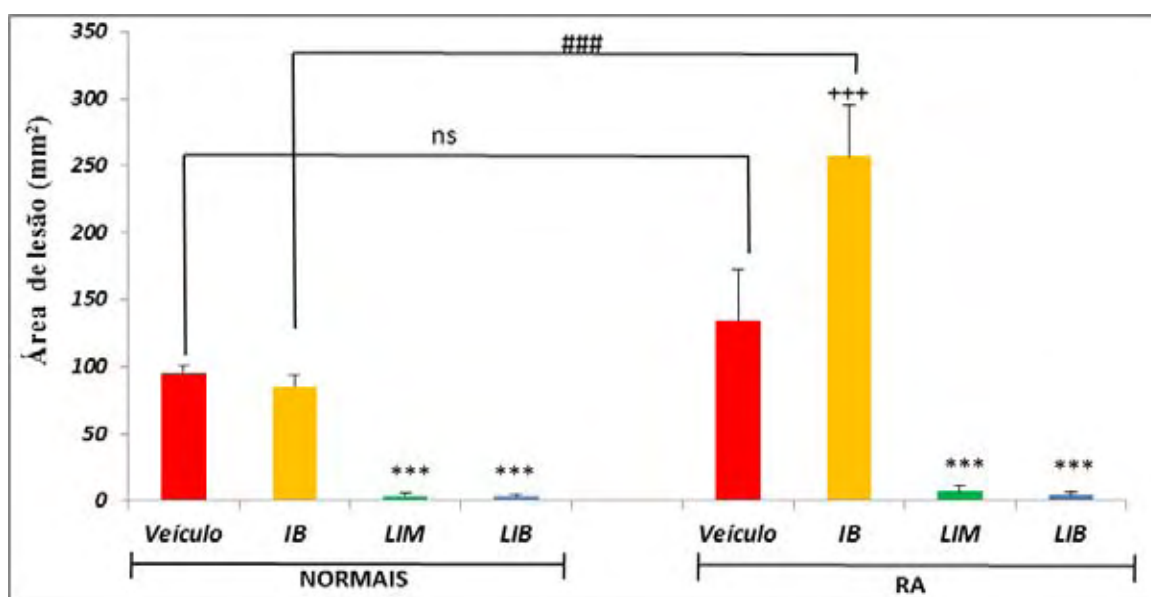
Segundo Fries *et al.* (1989) pacientes com artrite reumatóide (AR) e usuários de DAINE são muito mais susceptíveis as úlceras gástricas causadas por DAINE do que os usuários comuns destes antiinflamatórios. Além disso, Kato e colaboradores (1999) relatam que as lesões gástricas provocadas por DAINE são mais severas em animais portadores AR do que em animais normais. Kato e colaboradores (2002) demonstraram que as drogas anti-inflamatórias conhecidas como inibidores seletivos da COX-2 (que não causam úlceras gástricas em ratos normais) são capazes de ocasionar úlceras gástricas em ratos com AR.

Considerando os fatos acima, foi realizado o modelo experimental de indução de úlceras gástricas por DAINE (Indometacina 100 mg/kg) em ratos sem artrite (normais) e ratos artríticos (RA). Antes da administração do agente lesivo gástrico os animais foram previamente tratados (1 h) com: veículo (tween 80 a 8%), ibuprofeno IB (100 mg/kg), limoneno LIM (245 mg/kg) e limoneno + ibuprofeno LIB (245+100 mg/kg).

A figura 7 ilustra a quantificação da área de lesão da mucosa gástrica de ratos normais e ratos artríticos (RA) no modelo de úlceras gástricas induzidas por indometacina. No grupo de animais normais (sem artrite) foi demonstrado que o tratamento com LIM e LIB promoveu a proteção da mucosa gástrica e diminuiu significativamente a área de lesão em relação ao grupo veículo. Os animais tratados apenas com IB apresentaram severas lesões gástricas, semelhante ao grupo controle tratado somente com veículo. Já no grupo de ratos artríticos (RA), notamos que o tratamento com LIM e LIB também diminuiu significativamente a área de lesão, porém, o grupo tratado apenas com ibuprofeno (IB) apresentou um expressivo aumento da área de lesão

significativamente maior do que o grupo veículo. Observou-se que os animais artríticos (RA) tratados com IB apresentaram uma área de lesão 3 vezes maior do que os animais não artríticos (normais) que receberam o mesmo tratamento.

Figura 7: Quantificação da área de lesão gástrica no modelo de úlcera induzida por indometacina em ratos normais e ratos artríticos (RA).



Resultados expressos em área de lesão (mm²) média ± e.p.m. Diferença significativa do grupo controle, ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet ###p<0,001, +++p<0,001 e ***p<0,001 (n=5).

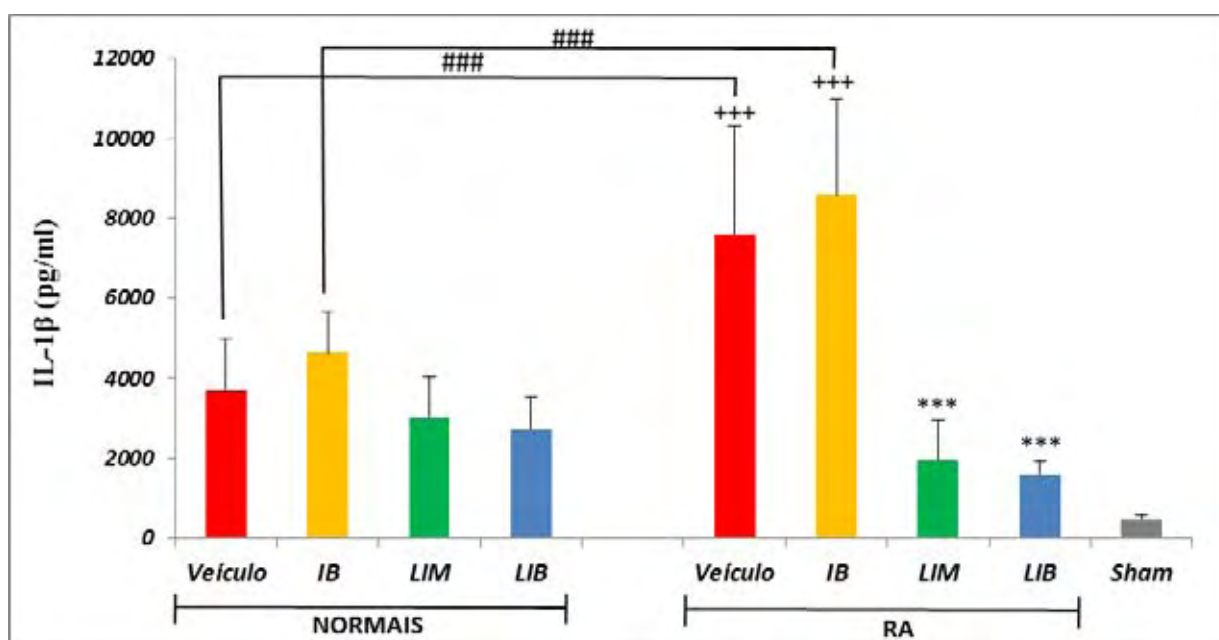
As figuras 8 e 9 ilustram a quantificação das citocinas IL-1 β e TNF respectivamente, presentes na mucosa gástrica de ratos não artríticos (normais) e artríticos (RA) que foram submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por indometacina.

No grupo dos animais não artríticos (normais), foi observado que nenhum dos tratamentos (IB, LIM e LIB) foi capaz de alterar significativamente os níveis de IL-1 β e TNF presentes na mucosa gástrica quando comparados com o grupo veículo. Porém, no grupo dos animais artríticos (RA), foi evidenciado que o tratamento prévio com LIM e LIB diminuiu significativamente

os níveis de IL-1 β e TNF (figuras 8 e 9) na mucosa destes animais em relação ao grupo dos animais que receberam apenas veículo. Dentro do grupo de animais artríticos, também foi observado que o tratamento com IB não foi capaz de alterar os níveis de nenhuma das citocinas analisadas.

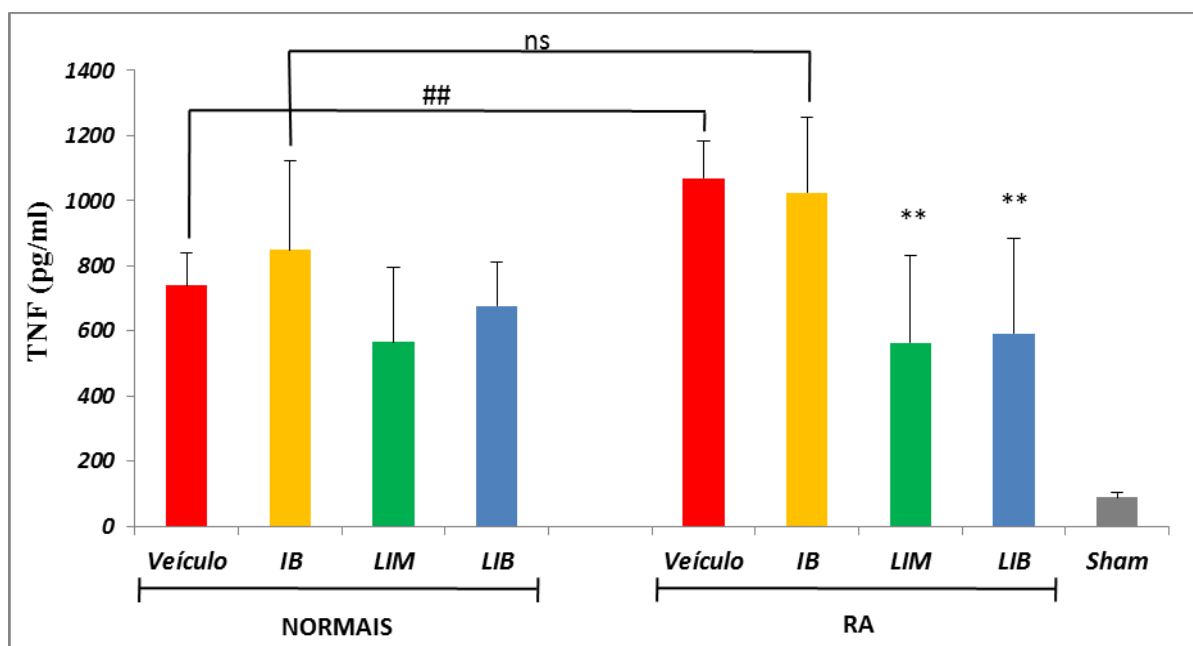
Ainda com relação à figura 8, a comparação entre os diferentes grupos de animais (normais e RA), destaca que a mucosa gástrica dos ratos artríticos (RA) tratados com veículo e IB apresentaram os níveis de IL-1 β significativamente maiores em relação aos mesmos grupos de tratamento dos animais não artríticos (normais). Com relação aos níveis de TNF figura 9, apenas o grupo de animais artríticos tratado com veículo apresentou níveis dessa citocina significativamente maiores em relação ao grupo veículo dos animais não artríticos.

Figura 8: Quantificação dos níveis de IL-1 β na mucosa gástrica de ratos normais e artríticos (RA) submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por indometicina.



Resultados expressos em média \pm d.p. Diferença significativa do grupo controle, ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet ###p<0,001, +++p<0,001 e ***p<0,001 (n=5).

Figura 9: Quantificação dos níveis de TNF na mucosa gástrica de ratos normais e artríticos (RA) submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por indometicina.



Resultados expressos em média \pm d.p. Diferença significativa do grupo controle, ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet ## $p < 0,01$ e ** $p < 0,01$ (n=5).

A depleção das prostaglandinas endógenas, principalmente a PGE_2 , é o principal fator desencadeante do desenvolvimento de lesões gástricas provocadas por drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINE). Porém em ratos artríticos, o principal fator envolvido no agravamento das lesões gástricas provocadas por DAINÉ é o aumento da produção de óxido nítrico (NO) que ocorre na mucosa gástrica destes animais (Kato *et al.*, 2002). Essa produção exacerbada de NO é causada pela estimulação da isoenzima induzível da NO sintase (iNOS) (Kato *et al.*, 1999). Outros estudos também relacionaram o envolvimento de iNOS em distúrbios gastrontestinais tais como doença inflamatória intestinal e úlceras induzidas por DAINÉ (Whittle *et al.*, 1995). A iNOS não é expressa constitutivamente, mas induzida por vários fatores tais como citocinas e lipopolissacarídeo (Nathan, 1992). As citocinas pró-

inflamatórias mais importantes no desenvolvimento da cascata inflamatória destrutiva da AR são as IL-1 e TNF, e estas citocinas são encontradas em grande concentração nas juntas sinoviais e no plasma de pacientes com AR (Saxne *et al.*, 1988). Portanto, o aumento destas citocinas estimula a expressão de iNOS que por sua vez é responsável pelo aumento da produção de NO presente na mucosa gástrica de ratos artríticos. Sabe-se também que o TNF é liberado após a administração de indometacina ocasionando o aumento da expressão de ICAMs (moléculas de adesão intercelular), conduzindo a adesão de leucócitos e conseqüentemente levando à danos na mucosa gástrica (Appleyard *et al.*, 1996). A inibição da síntese de TNF resulta na redução do efeito nocivo de agentes lesivos como *Helicobacter pylori*, DAINÉ e etanol (Martin *et al.*, 2006; Brzozowska *et al.*, 2004). Segundo Watanabe *et al.*, (2001) altos níveis de IL-1 β promovem a recorrência de úlceras gástricas, pois elevam a expressão de moléculas de adesão na mucosa gástrica e assim aumentam drasticamente a infiltração de leucócitos e o processo inflamatório na área afetada.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, foi evidenciado que a mucosa gástrica dos animais artríticos tratados com DAINÉ (IB 100 mg/kg) apresentou níveis mais elevados de IL-1 β e TNF do que os animais não artríticos. Este resultado está de acordo com a literatura, pois estas citocinas provavelmente ocasionaram a expressão de iNOS que aumentou a síntese de NO e tornou assim, a mucosa de ratos artríticos, mais susceptíveis às lesões causados por DAINÉ (Kato *et al.*, 1999; Kato *et al.*, 2000). O tratamento com LIM (245 mg/kg) diminuiu significativamente os níveis das citocinas (IL-1 β e TNF) na mucosa e assim não houve aumento da produção de NO, impedindo

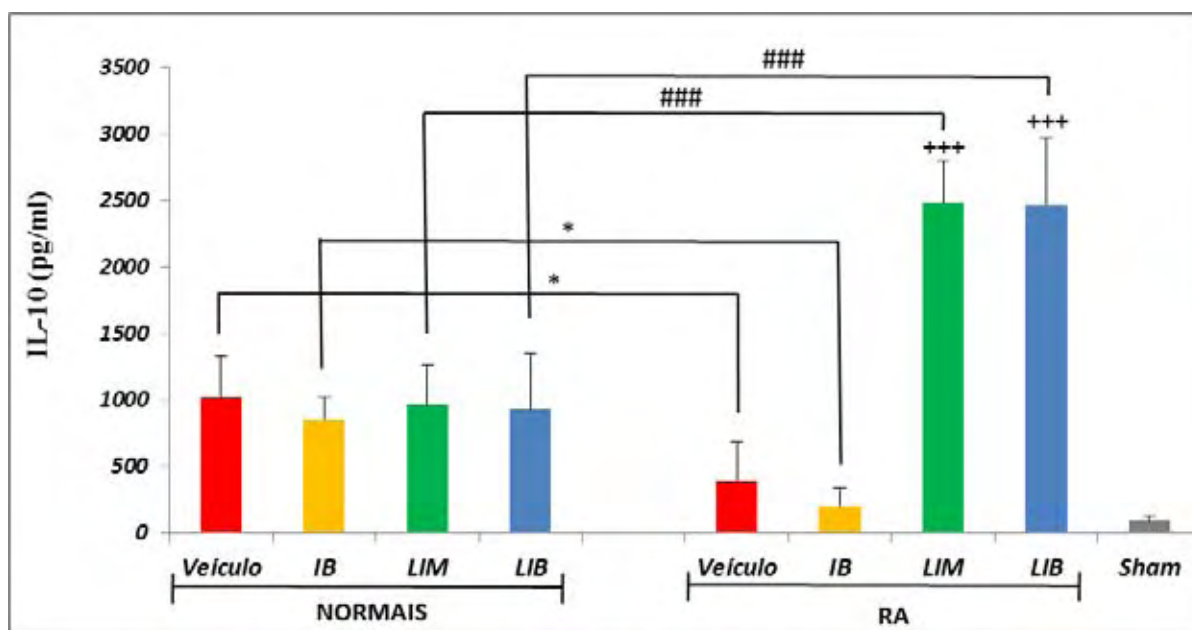
que a mucosa gástrica dos animais artríticos se tornasse mais susceptível as lesões provocadas por DAINE (indometacina). Vale ressaltar que mesmo quando administrado em conjunto com o ibuprofeno (LIB), o limoneno foi capaz de impedir a ação lesiva do ibuprofeno na mucosa gástrica dos ratos artríticos destacando assim o benefício desta associação entre LIM e IB.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória com importantes funções de regulação imune (Moore *et al.*, 2001). Tem uma potente ação anti-inflamatória e é utilizada como importante marcador em vários modelos de doenças auto-imunes, incluindo o modelo de indução de artrite reumatóide por colágeno (Johansson *et al.*, 2001). A função da IL-10 é suprimir a expressão de citocinas inflamatórias, como TNF, IL-6 e IL-1 sintetizados por macrófagos, além também de afetar a proliferação das células T (Fiorentino *et al.*, 1991). Segundo Robinson *et al.*, (2008) a produção de IL-10 confere proteção a mucosa gástrica frente à agentes lesivos.

A figura 10 ilustra a quantificação dos níveis de IL-10 na mucosa gástrica de ratos não artríticos (normais) e artríticos (RA) submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por indometicina. Podemos notar que dentro do grupo dos animais não artríticos nenhum dos tratamentos alterou os níveis de IL-10 na mucosa gástrica dos animais. Entretanto no grupo dos animais artríticos (RA) ficou evidente que o tratamento com LIM e LIB promoveu um aumento expressivo nos níveis de IL-10 quando comparados com os animais que receberam apenas veículo. Na comparação entre os grupos normais e RA os animais do grupo RA que foram tratados com veículo e IB apresentaram uma redução significativa dos níveis de IL-10 em relação aos animais normais que receberam o mesmo tratamento. Os animais artríticos que foram tratados com

LIM e LIB apresentaram um aumento significativo dos níveis desta citocina em relação aos animais normais que receberam o mesmo tratamento.

Figura 10: Quantificação dos níveis de IL-10 na mucosa gástrica de ratos normais e artríticos (RA) submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por indometicina.



Resultados expressos em média \pm d.p. Diferença significativa do grupo controle, ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet ### $p < 0,001$, +++ $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ (n=5).

Desta forma, os resultados deste trabalho mostram que o tratamento com LIM é capaz de estimular a produção de IL-10 em ratos artríticos mesmo quando administrado em combinação com ibuprofeno (LIB).

Sendo assim, podemos concluir que o aumento de IL-10 na mucosa gástrica de ratos artríticos promovido pelo limoneno é um dos fatores responsáveis, pela diminuição de IL-1 β e TNF observados nas [figuras 8 e 9](#). Considerando que o aumento da susceptibilidade da mucosa gástrica de ratos artríticos a ação lesiva das DAINE está relacionada com o aumento dos níveis de NO (Kato *et al.*, 2002) os resultados apresentados apontam para o provável mecanismo pelo qual o limoneno promove a proteção da mucosa gástrica de

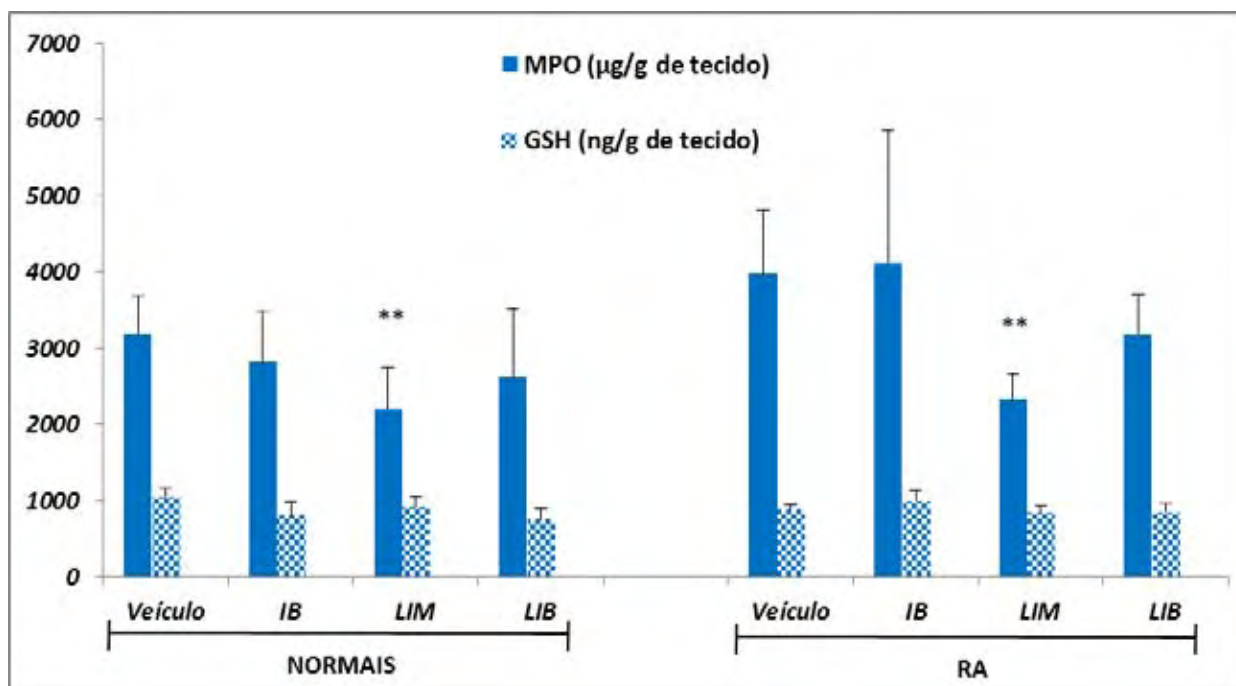
ratos artríticos, este mecanismo está relacionado com o aumento dos níveis de IL-10 e conseqüentemente diminuição de TNF, IL-1 β e NO, além do fato de Yoon *et al.*, (2010) já ter comprovado que o limoneno é capaz de inibir a síntese de NO *in vitro*.

A figura 11 apresenta os resultados das quantificações de mieloperoxidase (MPO) e glutathiona (GSH) realizadas na mucosa gástrica de ratos normais e artríticos submetidos ao modelo de indução de lesão gástrica por indometacina.

De acordo com os resultados, foi constatado que o tratamento com LIM promoveu uma diminuição significativa da quantidade de MPO tanto na mucosa gástrica dos ratos normais como também na mucosa dos animais artríticos (RA). Os demais tratamentos (IB e LIB), não alteraram significativamente os níveis de MPO. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos de ratos normais e artríticos.

Com relação aos níveis de glutathiona, nenhum dos tratamentos (IB, LIM e LIB) foi capaz de alterar significativamente a quantidade de GSH presente na mucosa gástrica, tanto dos animais normais quanto dos animais artríticos.

Figura 11: Quantificação dos níveis de MPO e GSH na mucosa gástrica de ratos normais e artríticos (RA) submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por indometicina.



Resultados expressos em média \pm e.p.m. Diferença significativa do grupo controle, ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet ** $p < 0,01$ (n=5).

Glutathiona (GSH) é um importante fator antioxidante não enzimático que está presente em todas as células, este componente na sua forma reduzida (GSH) pode se ligar a compostos tóxicos, como os radicais livres, em reações dependentes ou não de enzimas (Li *et al.*, 2009). Experimentos anteriores (Moraes *et al.*, 2009), já haviam demonstrado que o LIM era incapaz de manter os níveis de glutathiona na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por etanol e os atuais resultados demonstram que o LIM também não tem ação conservativa sobre os níveis de GSH no modelo de úlcera induzida por indometacina em ratos normais e artríticos.

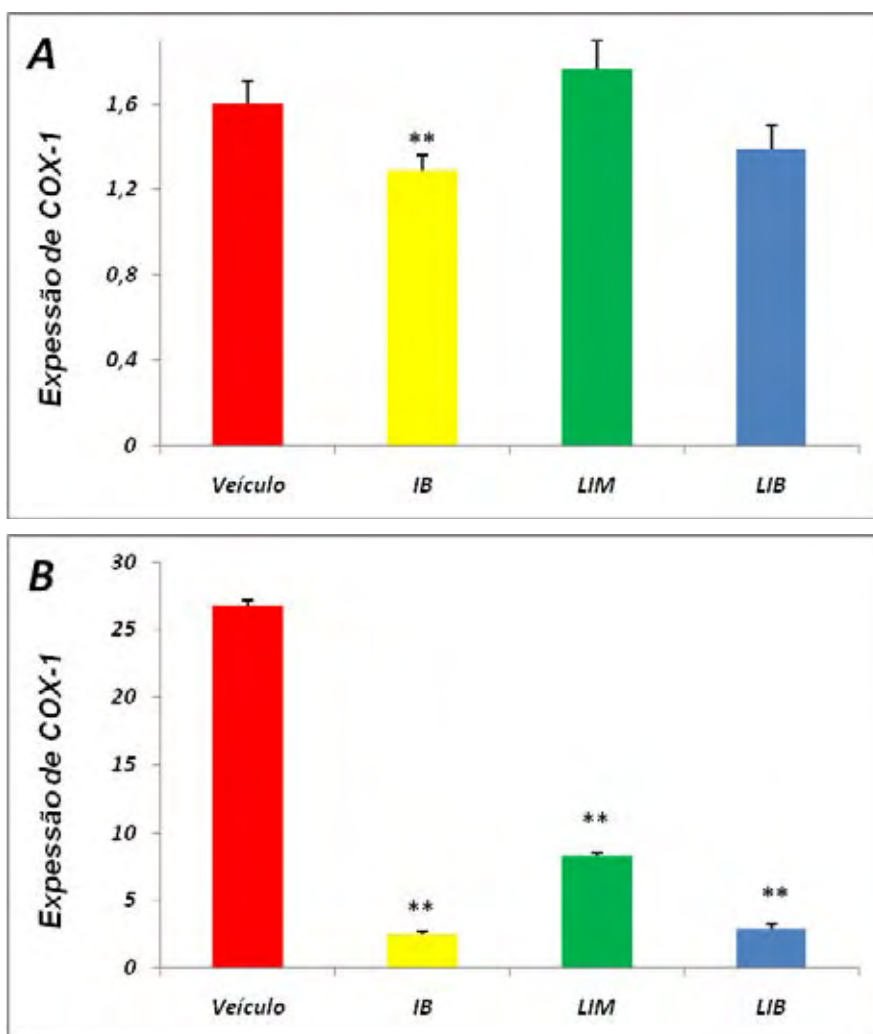
A mieloperoxidase (MPO) é considerada como um indicador da infiltração de neutrófilos em lesões gástricas experimentais (Halice *et al.*, 2005; Bayir *et al.*, 2006). Um aumento significativo nos níveis de MPO foi observado

no mucosa gástrica de ratos tratados com indometacina em comparação com ratos não tratados, este aumento no nível de MPO corresponde a um aumento da infiltração de neutrófilos provocado pela ação lesiva da indometacina na mucosa (Polat *et al.*, 2011). Muitos fármacos com atividade antiulcerogênica geralmente atuam inibindo a concentração de MPO na mucosa gástrica e conseqüentemente diminuindo a área de lesão provocada pela ação de diferentes agentes lesivos (Polat *et al.*, 2011). Os neutrófilos são responsáveis pela lesão endotelial na mucosa observada logo após a administração de DAINÉ (Rainsford *et al.*, 1982; Wallace *et al.*, 1990). Nossos resultados mostram que o tratamento com LIM foi capaz de diminuir os níveis de MPO tanto em animais normais quanto nos artríticos, porém este efeito não se manteve quando o LIM foi administrado em associação com ibuprofeno (LIB). Este resultado está de acordo com o resultado anterior (figura 4), em que o LIM foi capaz de inibir a infiltração de neutrófilos no sítio inflamatório e desta forma podemos concluir que um dos mecanismos de proteção do LIM frente a úlceras induzidas por indometacina é a diminuição da infiltração de neutrófilos, além da conservação dos níveis de PGE₂ já observado anteriormente em nosso laboratório (Moraes *et al.*, 2009).

A figura 12 demonstra a quantificação de COX-1 (RNAm) na mucosa gástrica de ratos normais (A) e artríticos (B) submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por indometacina. Nos animais normais o tratamento com IB reduziu significativamente a expressão de COX-1 na mucosa de ratos quando comparado com o grupo veículo. É possível observar também que o limoneno quando administrado junto com o Ibuprofeno (LIB) foi capaz de reverter essa inibição. No grupo dos ratos artríticos (B) todos os tratamentos (IB, LIM e LIB)

diminuíram significativamente a expressão de COX-1. Notamos também que o grupo tratado apenas com veículo dos RA apresentou um aumento da expressão de COX-1 em relação ao grupo veículo dos ratos normais (não artríticos).

Figura 12: Quantificação da expressão de RNAm de COX-1 na mucosa gástrica de ratos normais (A) e artríticos (B) submetidos ao modelo de lesão gástrica induzida por indometicina.



Os dados são apresentados como da média de quantidades relativas de COX-1 em relação ao controle sham. Média \pm d.p. , ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet **p<0,01 (n=4).

A COX-1 é expressa constitutivamente e pode encontrada em vários tecidos, incluindo o estômago, onde desempenha um papel crítico na manutenção da integridade da mucosa gástrica (Tanaka *et al.*, 2001). A

inibição da COX-1 e conseqüentemente diminuição de PGE₂ é um dos principais fatores que ocasionam as lesões gástricas decorrentes do uso de DAINE (Walace *et al.*, 2000). Os resultados apresentados no gráfico 12 estão de acordo com nossos resultados anteriores (Moraes *et al.*, 2009) em que foi demonstrado a efetividade do OEC e do LIM na proteção da mucosa gástrica frente a úlceras induzidas por DAINE e que essa proteção é decorrente da manutenção dos níveis de PGE₂ na mucosa. Podemos ver na figura 12 gráfico A que o LIM foi capaz de conservar os níveis de COX-1 na mucosa de ratos não artríticos (normais) mesmo quando administrado em conjunto com uma DAINE (LIB).

Sabe-se que PGE₂ são expressas em altas quantidades em pacientes artríticos e em modelos animais de artrite reumatóide e que essa exacerbação da expressão é decorrente do aumento das enzimas COXs (Anguita *et al.*, 2002; Westman *et al.*, 2004). Nosso resultado apresentado na figura 12 B está de acordo com a literatura, podemos observar que o animais artríticos tratados apenas com veículo apresentaram um aumento da expressão de COX-1 em comparação com animais não artríticos. Os tratamentos com IB, LIM e LIB reverteram esse aumento da expressão de COX-1, esse resultado aponta para uma possível ação moduladora do limoneno sobre COX-1, visto que não afeta sua expressão em ratos normais porém é capaz de inibir a exacerbação de sua expressão em ratos artríticos.

4 – Avaliação do potencial anti-artrítico e cicatrizante do OEC e LIM em ratos artríticos submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético.

A indução de úlceras por ácido acético é o modelo mais similar de úlceras gástricas em humanos (Okabe & Agamase, 2005). O processo de cicatrização das úlceras pode ser dividido em 3 fases: 0-3 dias, fase do desenvolvimento da úlcera com necrose do tecido, implantação da úlcera, infiltração inflamatória e formação da margem da úlcera; 3-10 dias, fase rápida da cicatrização envolvendo migração de células epiteliais e contração da base da úlcera; 10-20 dias, fase lenta da cicatrização que compreende angiogênese, remodelação dos tecidos de granulação e completa re-epitelização da cratera da úlcera (Schmassmann, 1998).

Sabe-se que mesmo em baixas doses (que não causam lesões) as DAINE retardam o processo de cicatrização em ratos com úlcera gástrica induzidas por ácido acético. Esse efeito é causado devido a supressão da síntese de prostaglandinas e pode ser revertido com o tratamento de PGE₂ exógena (Wang *et al.*, 1989). Já comprovamos também que devido ao fato do tratamento com limoneno (LIM) manter os níveis normais de PGE₂ na mucosa gástrica de ratos tratados com indometacina ele é capaz de acelerar o processo de cicatrização da mesma (Moraes 2008).

O processo de cicatrização das úlceras crônicas induzidas por ácido acético em ratos com artrite reumatóide é bem menos eficiente do que em ratos normais, além do que, foi observado que a administração de DAINE retarda ainda mais o processo de cicatrização das úlceras crônicas nestes animais (Kato *et al.*, 2002).

Considerando que tanto o OEC quanto LIM apresentaram atividade cicatrizante em ratos normais submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético (Moraes, 2008), avaliamos a ação cicatrizante do limoneno (LIM) *per si* e em associação com ibuprofeno (LIB) na mucosa gástrica de ratos artríticos submetidos ao modelo de ácido acético.

A tabela 1 ilustra a ação do ibuprofeno IB (100 mg/kg), limoneno LIM (245 mg/kg) e limoneno + ibuprofeno LIB (245+100 mg/kg) sobre o processo de cicatrização da mucosa gástrica de ratos artríticos submetidos ao processo de lesão gástrica induzida por ácido acético. Os animais foram tratados diariamente durante 14 dias e foi observado que nenhum dos tratamentos foi capaz de alterar significativamente os parâmetros analisados (tamanho da lesão, níveis de glutathiona total e MPO).

Tabela 1: Efeito do ibuprofeno (IB), limoneno (LIM) e limoneno + ibuprofeno (LIB) sobre o processo de cicatrização, níveis de glutathiona e MPO em lesões causadas por ácido acético em ratos artríticos tratados durante 14 dias.

<i>Tratamentos</i>	<i>Doses (mg/kg)</i>	<i>Área lesão (mm²)</i>	<i>Glutathiona (ng/g de tecido)</i>	<i>MPO (µg/g de tecido)</i>
<i>Veículo</i>	-	20,30 ± 1,90	1086,51 ± 234,02	3575,86 ± 482,82
<i>IB</i>	100	23,13 ± 1,98	1077,33 ± 138,53	4313,15 ± 1006,33
<i>LIM</i>	245	19,12 ± 1,87	1061,03 ± 235,74	4173,94 ± 884,42
<i>LIB</i>	245+100	19,34 ± 1,67	895,86 ± 85,33	4414,20 ± 938,61

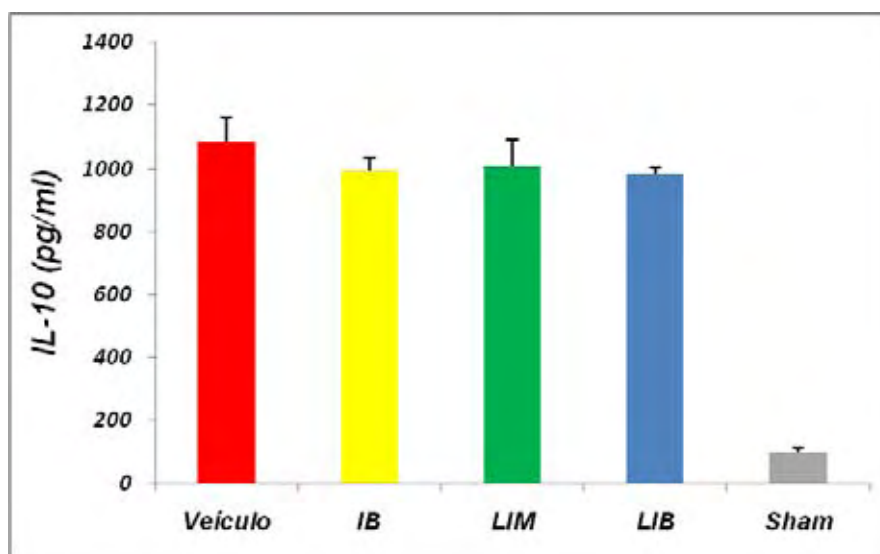
Resultados expressos em média ± d.p. ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet p>0,05 (n=5).

Kato *et al.*, (2001) demonstrou que o processo de cicatrização da mucosa gástrica de ratos em ratos artríticos é mais lento devido à diminuição da expressão de fator de crescimento de fibroblastos (bFGF) e principalmente devido a fato do estômago dos ratos artríticos apresentarem uma menor

síntese do fator de crescimento insulínico (IGF). Também foi relatado que o atraso na cicatrização da mucosa gástrica de ratos artríticos não está relacionada com a produção de prostaglandinas e NO (Kato *et al.*, 1999), logo podemos concluir que o LIM não tem ação sobre a síntese de bFGF e IGF e como a ação do LIM está associada às prostaglandinas e diminuição de NO, o mesmo não foi capaz de acelerar o processo de cicatrização da mucosa em ratos artríticos.

Como anteriormente havíamos visto que o LIM foi capaz de aumentar os níveis de IL-10 na mucosa gástrica de ratos artríticos submetidos ao modelo de indução de úlceras por indometacina, resolveu-se avaliar a ação do LIM sobre este parâmetro no modelo de úlcera crônica. A [figura 13](#) demonstra a ação dos diferentes tratamentos (IB, LIM e LIB) sobre os níveis de IL-10 presentes na mucosa gástrica dos animais artríticos submetidos ao modelo de lesão por ácido, nenhum dos tratamentos avaliados foi capaz de alterar a expressão de IL-10 na mucosa dos animais artríticos.

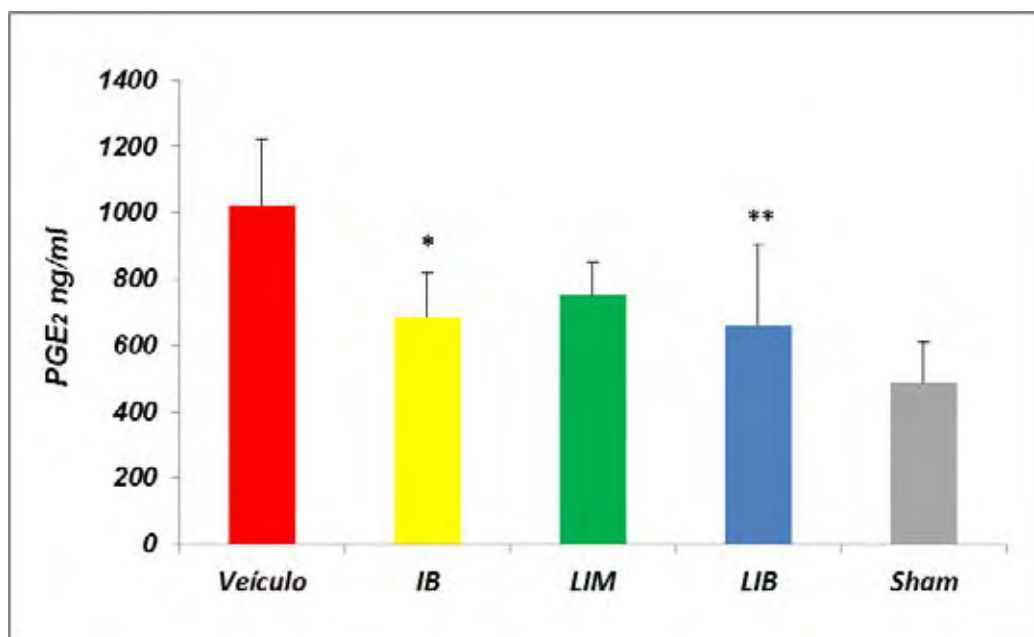
Figura 13: Quantificação dos níveis de IL-10 na mucosa gástrica de ratos artríticos submetidos ao modelo de lesão gástrica provocada por ácido acético.



Resultados expressos em média \pm d.p. ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet $p > 0,05$ (n=5).

A figura 14 ilustra a quantificação dos níveis de PGE_2 no plasma dos animais artríticos e ulcerados tratados durante 14 dias, pode-se observar que os animais tratados com ibuprofeno (IB) e limoneno + ibuprofeno (LIB) apresentaram redução significativa dos níveis plasmáticos deste mediador inflamatório.

Figura 14: Quantificação dos níveis de PGE₂ no plasma dos animais artríticos tratados durante 14 dias.



Resultados expressos em média \pm d.p. ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (n=5).

Foi demonstrado que a mucosa gástrica de ratos artríticos apresenta níveis de PGE₂ mais elevados do que a mucosa de ratos normais, porém esse aumento é totalmente revertido pela administração oral de indometacina (Kato *et al.*, 2000), sabe-se também que prostaglandinas, particularmente a PGE₂, desempenha um complexo papel no processo inflamatório, visto que *in vitro*, ela reduz a expressão de fatores pró-inflamatórios como citocinas e quimiocinas sintetizados pelas células dendríticas (Harizi *et al.*, 2005), porém em doenças auto-imunes, como artrite reumatóide, PGE₂ desempenha um papel pró-inflamatório, em camundongos com artrite reumatóide induzida por colágeno o tratamento com misoprostol, um análogo sintético de PGE₂, promoveu um aumento da severidade da doença (Sheibanie *et al.*, 2007).

COX-2 e PGE síntase-1, ambas envolvidas na síntese de PGE₂, são expressas em altas quantidades em pacientes artríticos e em modelos animais de artrite reumatóide (Anguita *et al.*, 2002; Westman *et al.*, 2004) e

considerando que em ratos artríticos a PGE₂ está aumentada e esse aumento está associado com fatores deletérios como atividade pró-inflamatória (Sheibanie *et al.*, 2007), foi realizada a quantificação de PGE₂ no plasma dos animais artríticos tratados durante 14 dias com IB, LIM e LIB. Foi constatado que o LIM, quando administrado sozinho, não é capaz de diminuir os níveis de PGE₂ no plasma, porém o tratamento com IB e LIB foi capaz de reduzir significativamente os níveis deste parâmetro, quando comparado com animais que receberam apenas veículo. Este resultado está de acordo com o que foi discutido anteriormente, em que o LIM tem uma ação modulatória sobre os níveis de PGE₂ na mucosa gástrica (Moraes *et al.*, 2009). O papel da PGE₂ neste caso é muito ambíguo, visto que o aumento de sua expressão tem atividade pró-inflamatória enquanto que sua inibição por DAINÉ provoca lesões gástricas mais severas em ratos artríticos. Sheibanie *et al.* (2007) concluiu que embora a PGE₂ tenha efeitos pró-inflamatórias através do estímulo de produção de citocinas, ela também pode apresentar atividade anti-inflamatória que é mediada principalmente através da liberação de IL-10 a partir de células T ativadas, células dendríticas e macrófagos sendo que a prevalência do efeito pró-inflamatório ou anti-inflamatório depende em grande parte da presença e dos tipos de células ativadas e também do saldo local de fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios.

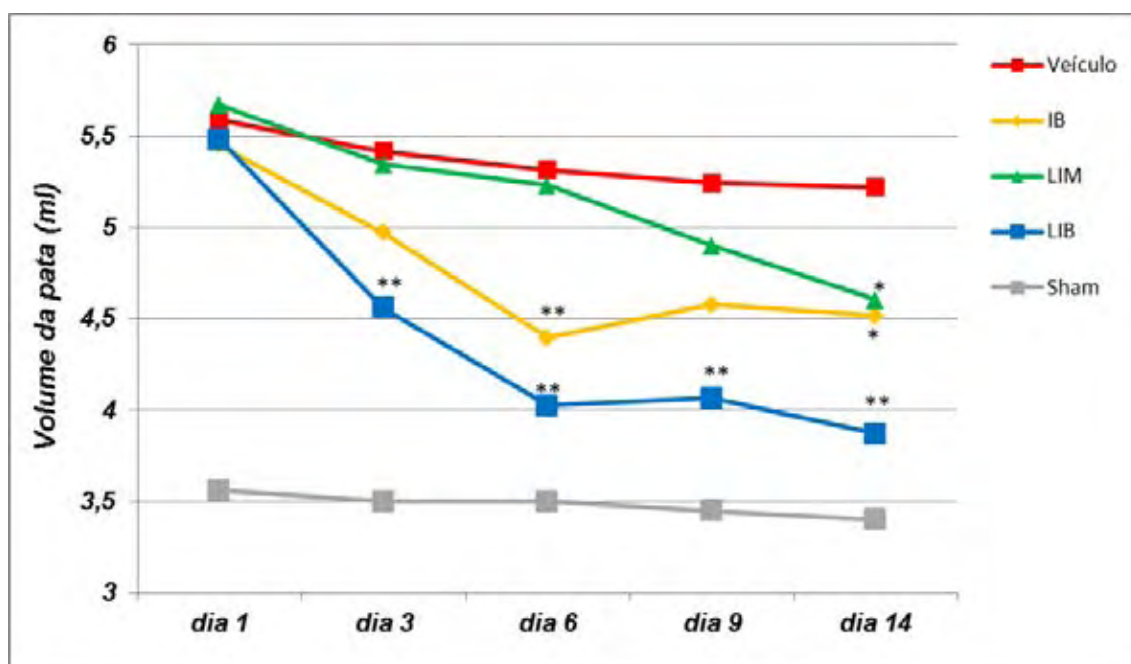
Nesta situação, o ideal seria um composto com ação modulatória em que a expressão de PGE₂ não é exacerbada nem drasticamente reduzida, podemos observar que o LIM teve este tipo de ação (figuras 12 e 14) e também como demonstrado por Moraes *et al.*, (2009), essa ação modulatória do LIM sobre a PGE₂ também pode ser sustentada pelo aumento expressivo de IL-10

observado em ratos artríticos no modelo de lesão gástrica por indometacina (figura 10).

Como os animais artríticos submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica foram tratados diariamente durante 14 dias, neste período também foi avaliado o efeito anti-artrítico dos diferentes tratamentos sobre o processo inflamatório (edema) instalado na pata dos animais. A avaliação foi feita a cada 3 dias através da mensuração do volume da pata com auxílio de um pletismômetro.

A figura 15 demonstra a avaliação do desenvolvimento do edema de pata nos animais artríticos tratados durante 14 dias com IB (ibuprofeno 100 mg/kg), LIM (limoneno 245 mg/kg) e LIB (245 mg/kg+100 mg/kg). O grupo sham são animais sem artrite. Todas as comparações são feitas em relação ao grupo veículo (tween 80 a 8%). Podemos notar que o tratamento com LIB foi efetivo em reduzir o volume das patas dos animais artríticos a partir do terceiro dia de avaliação e este efeito permaneceu durante todo o período de tratamento. Enquanto que o Ibuprofeno (IB) só se mostrou efetivo nos dias 6 e 14 e o limoneno (LIM) apresentou efeito apenas no último dia de avaliação (dia 14).

Figura 15: Avaliação do edema de pata em ratos artríticos durante os 14 dias de tratamento.

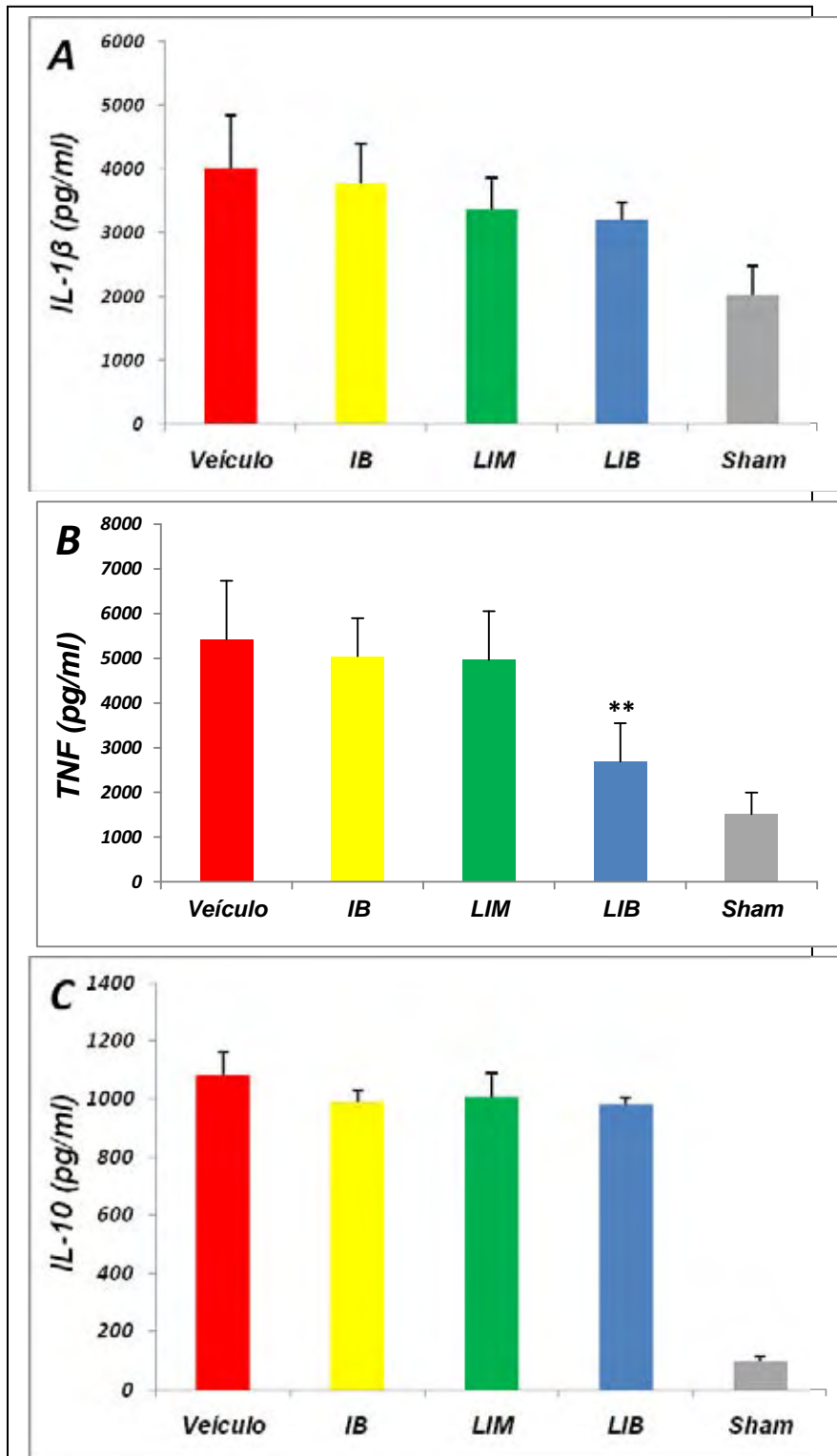


Resultados expressos em média \pm d.p. ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (n=5).

Considerando o positivo efeito anti-artrítico do tratamento com LIM e LIB evidenciado através da redução do volume de pata dos animais artríticos, foram realizadas as quantificações dos níveis das citocinas mais relacionadas com o processo artrítico (IL-1 β e TNF) e também da IL-10 que se mostrou elevada em experimentos anteriores.

De acordo com a [figura 16](#), nota-se que os níveis de IL-1 β (gráfico A), TNF (gráfico B) e IL-10 (gráfico C) presente nas patas dos ratos artríticos não foram alterados significativamente após o tratamento durante 14 dias com IB e LIM, já o tratamento conjugado de Ibufrofeno + limoneno (LIB) diminuiu significativamente os níveis de TNF (gráfico B), porém não alterou a quantidade de IL-1 β e IL-10 expressa nas patas dos animais artríticos.

Figura 16: Quantificação dos níveis de IL-1 β (gráfico A), TNF (gráfico B) e IL-10 (gráfico C) na pata de ratos artríticos tratados durante 14 dias.



Resultados expressos em média \pm d.p. ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnet
** $p < 0,01$ (n=5).

Diferentemente do que se foi observado anteriormente no estômago de ratos artríticos submetidos no modelo de indução de úlceras por DAINÉ, na avaliação da ação do LIM sobre a pata dos animais artríticos tratados durante 14 dias foi observado que este não foi capaz de reduzir significativamente os níveis de de IL-1 β (gráfico A) e TNF (gráfico B) nem de aumentar os níveis de IL-10 (gráfico C) nas patas destes animais.

O tratamento com LIB foi capaz de reduzir significativamente os níveis de TNF presente na pata dos animais artríticos. O fato de não interferir nos níveis de IL-1 β não desqualifica a ação anti-artrítica do LIB, na verdade, uma série de estratégias terapêuticas capaz de inibir a produção de TNF vem sendo utilizadas com sucesso no tratamento clínico para a gestão de doenças crônicas inflamatórias, particularmente em artrite reumatóide (Van Assche e Rutgeerts, 2000; Feldmann *et al.*, 2002).

Além disso, também foi observado uma redução no volume da pata dos animais artríticos tratados com LIM e LIB (figura 15), isso nos mostra que a ação anti-artrítica evidenciada pode estar mais relacionada com a inibição de outros fatores pró-inflamatórios, como por exemplo, COX-1 (figura 12), COX-2 e iNOS (Yoon *et al.*, 2010).

V - CONCLUSÃO

A partir dos resultados deste trabalho, podemos concluir que o LIM associado com uma DAINE apresenta uma importante atividade anti-inflamatória, tanto em modelos de inflamação aguda quanto em modelos crônicos de artrite reumatóide. Esta atividade anti-inflamatória parece estar relacionada com a inibição do aumento da expressão de vários fatores pró-inflamatórios envolvidos com a etiologia da AR, tais como: COX-1, COX-2, TNF, IL-1 β e NO. Esta atividade anti-inflamatória e anti-artrítica da associação de LIM com DAINE também pode estar relacionada com o estímulo da produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10. Também ficou evidenciada a potente atividade gastroprotetora do LIM em modelos de lesão gástrica induzidas por DAINE, tanto em ratos não artríticos (normais) quanto em ratos artríticos, vale salientar que esta atividade gastroprotetora foi efetiva mesmo quando o limoneno foi administrado em conjunto com uma DAINE (ibuprofeno).

Sendo assim, podemos concluir que o limoneno pode ser usado como um adjuvante as DAINE no tratamento de doenças inflamatórias com a finalidade de potencializar a ação das mesmas e inibir seus efeitos lesivos sobre a mucosa gástrica.

VI - REFERÊNCIAS

- AFELTRA, A. *Treatment of rheumatoid arthritis: new therapeutic approaches with biological agents. Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 2001; 1: 45-65.
- AHLUWALIA, A., PERRETTI, M. *B1 receptors as a new inflammatory target. Could this B the 1? Trends Pharmacol Sci.* 1999; 20(3):100-4.
- AKIBA, H., KEHREN, J., DUCLUZEAU, M.T., KRASTEVA, M., HORAND, F., KAISERLIAN, D., et al. *Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8+T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis.* J. Immunol. 2002; 168(6): 3079– 87.
- ANDERSON, M.E. *Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Methods Enzymol.* 1985;113:548-55.
- ANDREO, M.A, BALLESTEROS, K.V, HIRUMA-LIMA, C.A, MACHADO DA ROCHA, L.R, SOUZA BRITO, A.R, VILEGAS, W. *Effect of Mouriri pusa extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection.* J. Ethnopharmacol. 2006; 107(3):431-41.
- ANGUITA, J., SAMANTA, S., ANANTHANARAYANAN, S.K., REVILLA, B., GEBA G.P., et al. *Cyclooxygenase 2 activity modulates the severity of murine Lyme arthritis. FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 34:187–91.
- APPLEYARD, C.B., MCCAFFERTY, D.M., TIGLEY, A.W., SWAIN, M.G., WALLACE, J.L. *Tumor necrosis factor mediation of NSAID-induced gastric damage: role of leukocyte adherence. Am J Physiol.* 1996;270(1):G42-8.
- AVILA, J.R, DE LA LASTRA, C.A., MARTIN, M.J., MOTILVA, V., LUQUE, I., DELGADO, D. HERRERIAS, J. *Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. Inflamm Res.* 1995; 45(2):83-8.
- ATZENI, F., STRAUB, R.H., CUTOLO, M., SARZI-PUTTINI, P. *Anti-TNF therapy restores the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Ann N Y Acad Sci.* 2010;1193(1):179-81.
- BAYIR, Y., ODABASOGLU, F., CAKIR, A., ASLAN, A., SULEYMAN, H., HALICI M., KAZAZ, C. *The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. Phytomedicine,* 2006; 13, 584–590.

- BERGONZELLI, G.E., DONNICOLA, D., PORTA, N., CORTHÉSY-THEULAZ, I.E. *Essential oils as components of a diet-based approach to management of Helicobacter infection*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2003;47: 3240-3246.
- BRADLEY, P.P., PRIEBAT, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., *Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker*. *The Journal of Investigative Dermatology* 1982; 78:206–209.
- BROWN, J.F., HANSON, P.J., WHITTLE, B.J. *The nitric oxide donor, S-nitroso-N-acetylpenicillamine, inhibits secretory activity in rat isolated parietal cells*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Sep 30;195(3):1354-9.
- BRZOZOWSKA, I., TARGOSZ, A., SLIWOWSKI, Z., KWIECIEN, S., DROZDOWICZ, D., PAJDO, R., KONTUREK, P. C., BRZOZOWSKI, T., PAWLIK, M., KONTUREK, S. J., PAWLIK, W. W., HAHN, E. G. *Healing of chronic gastric ulcers in diabetic rats treated with native aspirin, nitric oxide (NO)- derivative of aspirin and cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor*. *J. Physiol. Pharm.* 2004; 55: 773–790.
- CALIXTO, J.B., YUNES, R.A., 1991. Natural bradykinin antagonists. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 86 Suppl 2:195-202.
- CARLSON, M., RAAB, Y., SEVEUS, L., XU, S., HALLGREN, R., VENGE, P. *Human neutrophil lipocalin is a unique marker of neutrophil inflammation in ulcerative colitis and proctitis*. *Gut* 2002; 50: 501-506.
- CARMONA, L., CROSS, M., WILLIAMS, B., LASSERE, M., MARCH, L. *Rheumatoid arthritis* *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010; 24(6):733-45.
- CAROL, A.F., TIMOTHY M. *Cytokines in acute and chronic inflammation*. *Wright Frontiers in Bioscience*. 1997; 12: 12-26.
- CARVALHO, A.S.T. *Artigo de Revisão: Úlcera Péptica* *Jornal de Pediatria* V. 2000; 76, Supl. 2; 127-134.
- CHOY, E.H., PANAYI, G.S. *Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis*. *N. Engl. J. Med*. 2001; 344: 907-916.
- CORDEIRO, R., NUNES, V.A., ALMEIDA, C.R. *Plantas que Curam*. 1. ed. Três, 1996.

- CORREA, C.R., CALIXTO, J.B., 1993. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *British Journal of Pharmacology* 110, 193–198.
- CORRÊA, M.P. *Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1978. pág.1926.
- CURTIS, G.H., MACNAUGHTON, W.K., GALL, D.G., WALLACE, J.L. *Intraluminal pH modulates gastric prostaglandin synthesis*. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1995; 73: 130-134.
- DI ROSA, M., GIROUD, J.P., WILLOUGHBY, D.A. *Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine*. *Journal of Pathology*. 1971; 104(1): 15-29.
- DOAN, T., MASSAROTTI, E. *Rheumatoid arthritis: An overview of new and emerging therapies*. *J. Clin. Pharmacol.* 2005; 45: 751-762.
- DURIE, F.H., FAVA, R.A., NOELLE, R.J. *Collagen-induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis*. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994;73(1):11-8.
- EDWARDS, J.C., SEDGWICK, A.D., WILLOUGHBY, D.A. *The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system*. *Journal of Pathology* 1981; 134:147–156.
- FANTONE, J.C. & WARD, P.A. (). *Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions*. *Am. J. Pathol.*, 1982;107: 395–418.
- FAURSCHOU, M., BORREGAARD, N. *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*. *Microbes and Infection* 2003; 5: 1317–1327.
- FELDMANN, M., 2002. *Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis*. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2: 364–371.
- FENG, L., SUN, W., XIA, Y., TANG, W.W., CHANMUGAM, P., SOYOOLA, E., WILSON, C.B., HWANG, D. *Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; 307(2): 361-8.
- FERNANDES, E.S., PASSOS, G.F., MEDEIROS, R., CUNHA, F.M., FERREIRA, J., CAMPOS, M.M. *Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-*

caryophyllene isolated from the essential oil of Cordia verbenacea. Eur J Pharmacol. 2007;569(3):228-36.

FIETZ, S., EINSPANIER, R., HOPNER, S., HERTSCH, B., BONDZIO, A. *Determination of MMP-2 and -9 activities in synovial fluid of horses with osteoarthritic and arthritic joint diseases using gelatin zymography and immunocapture activity assays. Equine Vet J.* 2007; 35-38.

FIORENTINO, D.F., ZLOTNIK, A., MOSMANN, T.R., HOWARD, M., O'GARRA A. *IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol* 1991;147:3815-3822.

GARCIA LEME, J., HAMAMURA, L., LEITE, M.P. & ROCHA E SILVA, M. *Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and by heating. Br. J.Pharmacol.* 1973;48, 88–96.

GERHÄUSER, C., KLIMO, K., HEISS, E., NEUMANN, I., GAMAL-ELDEEN, A., KNAUFT, J., LIU, GY., SITTHIMONCHAI, S., FRANK, N. *Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. Mutat. Res.* 2003; 523: 163-172.

GILLIGAN, J.P., LOVATO, S.J., ERION, M.D., JENG, A.Y. *Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. Inflammation.* 1994;18(3):285-92.

GÜRBÜZ, I.; ÜSTÜN, O.; YESILADA, E.; SEZİK, E.; AKYÜREK, N. *In vivo gastroprotective effects of live Turkish folk remedies against ethanol-induced lesions. Journal of Ethnopharmacology,* 2002; 83, 241-244.

GURIB-FAKIM, A. *Medicinal plants: traditions of yesterday. Molecular Aspect of Medicine,* 2006; 27, 1-93.

HALICI, M., ODABASOGLU, F., SULEYMAN, H., ÇAKIR, A., ASLAN, A., BAYIR, Y. *Effects of water extract of Usnea longissima on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. Phytomedicine,* 2005; 12: 656–662.

HALL, J. M. Bradykinin receptors: *Pharmacological properties and biological roles. Pharmacol. Ther.* 1992; 56: 131-190.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M. *Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. Lancet.* 1984; 1(8391):1396-7.

- HARIZI, H., GUALDE, N. *The impact of eicosanoids on the crosstalk between innate and adaptive immunity: the key roles of dendritic cells. Tissue Antigens* 2005; 65:507–14.
- HASHIMOTO, A., HAYASHI, I., MURAKAMI, Y., SATO, Y., KITASATO, H., MATSUSHITA, R., IIZUKA, N., URABE, K., ITOMAN, M., HIROHATA, S. *Antiinflammatory mediator lipoxin A4 and its receptor in synovitis of patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol.* 2007; 34(11): 2144-53.
- HENRIQUES, M.G., SILVA, P.M., MARTINS, M.A., FLORES, C.A., CUNHA, F.Q., ASSREUY-FILHO, J., ET AL. Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Braz J Med Biol Res.* 1987;20(2):243-9.
- IGIMI, H., HISATSUGU, T., NISHIMURA, M. *"The use of d-limonene preparation as a dissolving agent of gallstones. Am. J. Dig. Dis.* 1976; 21: 926-939.
- JOHANSSON, A.C., HANSSON, A.S., NANDAKUMAR, K.S., BACKLUND, J., HOLMDAHL, R. IL-10-deficient B10.Q mice develop more severe collagen induced arthritis, but are protected from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies. *J Immunol* 2001; 167:3505- 3512.
- KATO, S., OGAWA, Y., KANATSU, K., TAKEUCHI, K. *Ulcerogenic influence of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in the rat stomach with adjuvant-induced arthritis. J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 303: 503-509.
- KATO, S., TANAKA, A., KUNIKATA, T., MIZOGUCHI, H., TAKEUCHI, K. *The roles of nitric oxide and prostaglandins in alterations of ulcerogenic and healing responses in adjuvant-induced arthritic rat stomachs. Aliment. Pharmacol. Ther.* 2000; 14:18-25.
- KATO, S., TANAKA, A., KUNIKATA, T., NISHIJIMA, M., TAKEUCHI, K. *Changes in gastric mucosal ulcerogenic responses in rats with adjuvant arthritis: role of nitric oxide. Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 833-840.
- KATO, S., TANAKA, A., OGAWA, Y., KANATSU, K., TAKEUCHI, K. *Effect of polaprezinc on impaired Healing of chronic gastric ulcers in adjuvant-induced arthritic rats – role of insulin-like growth factors (IGF)-1. Med. Sci. Monit.* 2001; 7: 20-25.
- KEINAN, E., ALT, A., AMIR, G., BENTUR, L., BIBI, H., SHOSEYOV, D. *Natural ozone scavenger prevents asthma in sensitized rats. Bioorg. Med. Chem.* 2005;13: 557-562.

- KIMPEL, D., DAYTON, T., FUSELER, J., GRAY, L., KANNAN, K., WOLF, R.E., GRISHAM, M. *Splenectomy attenuates streptococcal cell wall-induced arthritis and alters leukocyte activation*. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 3557-67.
- KIRKPATRICK, P. *Stitching together naturally*. *Nature* 2002; 1: 748.
- KONTUREK, P.C, KONTUREK, S.J, CZESNIKIEWICZ, M, PLONKA, M, BIELANSKI, W. *Interaction of Helicobacter pylori (Hp) and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) on gastric mucosa and risk of ulcerations*. *Med. Sci. Monit.* 2002; 9:197-209.
- KONTUREK, S.J., BRZOZOZWSKI, T., MAJIK A J., DEMBINSKI, A. *Transforming growth factor and epidermal growth factor in protection and healing of gastric mucosal injury*. *Scandinavian Journal Gastroenterology* 1992; 27: 649-655.
- KRAWISZ, J.E., SHARON, P., STENSON, W.F. *Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in the rat and hamster model*. *Gastroenterology*, 1998; 487: 1344-1350.
- LEVY, L. Carrageenan paw edema in the mouse. *Life Sci.* 1969;8(11):601-6.
- LEWIS, G. P. *Ann. New York Acad. Sci.* 1963;104: 236–249
- LI, B., DONALDSON, P.J., LIM, J.C. *Dynamic regulation of GSH synthesis and uptake pathways in the rat lens epithelium*. *Exp Eye Res.* 2010 Feb;90(2):300-7.
- LIESHOUT, E.M., POSNER, G.H., WOODARD, B.T., PETERS, W.H. *Effects of the sulforaphane analog compound 30, indole-3-carbinol, D-limonene or relafen on glutathione S-transferases and glutathione peroxidase of the rat digestive tract*. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1379: 325-36.
- LIMONENE MONOGRAPH. *Cri. Rev. Food Sci. Nutr.* 39: 260-265, 1999.
- LOMONTE, B., LUNGREN, J., JOHANSSON, B., BAGGE, U.,. *The dynamics of local tissue damage induced by Bothrops asper snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle; an intravital*. *Toxicon* 1994; 32, 41-55.
- MACMICKING, J., XIE, Q.W., NATHAN, C. *Nitric oxide and macrophage function*. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:323-50.

- MANCUR, C., WILLIAMS, H.J. *Rheumatoid arthritis: Status of drug therapies. Physical Therapy.* 1995; 75: 511-525.
- MANUFACTURERS' ASSOCIATION *D-Limonene Monograph*, 1 -4, Flavor and Extract Manufacturers' Association; Washington, DC: 1991.
- MARTIN, G. R., WALLACE, J. L. *Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defence and repair. Exp. Biol. Med. (Maywood)* 2006; 231: 130–137.
- MOILANEN, E., VAPAATALO, H. *Nitric oxide in inflammation and immune response. Ann Med.* 1995 Jun;27(3):359-67
- MONCADA, S. & HIGGS, E.A. *Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. Eur. J. Clin. Invest.*, 1991; 21: 361–374.
- MOORE, K.W., DE WAAL MALEFYT, R., COFFMAN, R.L., O'GARRA, A. *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol* 2001; 19:683-765.
- MORAES, T.M., 2008. *Determinação do mecanismo de ação antiulcerogênico do óleo essencial e dos compostos majoritários de Citrus aurantium L. (Rutaceae).* Dissertação de mestrado defendido pelo programa de pós-graduação em Farmacologia, UNESP/Botucatu, p.150.
- MORAES, T.M., KUSHIMA, H., MOLEIRO, F.C., SANTOS, R.C., ROCHA, L.R., MARQUES, M.O., VILEGAS, W., HIRUMA-LIMA, C.A. *Effects of limonene and essential oil from Citrus aurantium on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. Chem Biol Interact.* 2009; 180(3):499-505.
- MORRIS, G.P., BECK, P.L., HERRIDGE, M.S., DEPEW, W.T., SZEWCZUK, M.R., WALLACE, J.L., 1989. *Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. Gastroenterology.* 96(3):795-803.
- NATHAN, C. *Nitric oxide as a secretory product of mammalian cell. FASEB J* 1992; 6: 3051-3064.
- NETEA, M.G., SIMON, A., VAN DE VEERDONK, F. KULLBERG, B.J., VAN DER MEER, J.W., JOOSTEN, L.A. *IL-1 β processing in host defense: beyond the inflammasomes. PLoS Pathog.* 2010; 6:100-106.

- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. *Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. Journal of Natural Product*, 2003; 66, 1022-1037.
- O'DELL, J.R. *Therapeutics strategies for rheumatoid arthritis. N. Engl. J. Med.* 2004; 350: 2591-602.
- OKABE, S., AGAMASE, K. *An overview of acetic acid ulcer models the history and state of the art of peptic ulcer research. Biological Pharmaceutical Bulletin.* 2005; 28(8), 1321-1341.
- OKABE, S., ROTH, J.L., PFEIFFER, C.J. *A method for experimental, penetrating gastric and duodenal ulcers in rats. Observations on normal healing. Am J Dig Dis.* 1971;16(3):277-84.
- PASSOS, G.F., FERNANDES, E.S., CAMPOS, M.M., ARAÚJO, J.G., PESQUERO, J.L., SOUZA, G.E., ET AL. *KININ B₁ receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. J Immunol.* 2004;172(3):1839-47.
- PEURA, D.A. *Prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug associated gastrointestinal symptoms and ulcer complications. Am J Med.* 2004; 117: 63-71.
- PFAFFL, M.W. *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45.
- PINEUS, T., CALLAHAN, L.F. *Taking mortality in rheumatoid arthritis seriously-predictive markers, socioeconomic status and comorbidity. J Rheumatol.* 1986; 13: 841-845.
- PINHEIRO, R.M., CALIXTO, J.B. *Effect of the selective COX-2 inhibitors celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. Inflammation Research* 2002; 51: 603–610.
- POLAT, B., ALBAYRAK, Y., SULEYMAN, B., DURSUN, H., ODABASOGLU, F, YIGITER, M., HALICI, Z., SULEYMAN, H. *Antiulcerative effect of dexmedetomidine on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. Pharmacol Rep.* 2011;63(2):518-26.
- POSADAS, I., BUCCI, M., ROVIEZZO, F., ROSSI, A., PARENTE, L., SAUTEBIN, L., CIRINO, G. *Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression Br J Pharmacol.* 2004;142(2):331-8.

- PUSCAS, I., PUSCAS, C., COLTAU, M., PASCA, R., TORRES, J. MARQUEZ M, HERRERO, E., FILLAT, O., ORTIZ, J.A. *Comparative study of the safety and efficacy of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam-induced gastroduodenal lesions. Arzneimittelforschung*, 1997; 47: 568-72.
- RAINSFORD, K.D., WILLIS, C. *Relationship of gastric mucosal damage induced in pigs by anti-inflammatory drugs to their effects on prostaglandin production. Dig Dis Sci* 1982; 27: 624–635.
- RAO, P.N., GROVER, R.K. Apricoxib, a COX-2 inhibitor for the potential treatment of pain and cancer. *IDrugs*. 2009 Nov;12(11):711-22.
- REN, K., TORRES, R. *Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. Brain Res Rev*. 2009;60(1):57-64.
- ROBINSON, K., KENEFECK, R., PIDGEON, E.L. *Helicobacter pylori-induced peptic ulcer disease is associated with inadequate regulatory T cell responses. Gut* 2008; 57: 1375–85.
- SANGUINETTI, E.E. *Plantas que curam*. 2.ed. Porto Alegre, 1989.
- SANTOS, C.A.M., TORRES, K.R., LEONART, R. *Plantas medicinais* (herbarium, flora et Scientia). 2.ed. São Paulo, Ícone, 1988.
- SAXNE, T., PALLADINO M.A., WOLLHEIM F.A. *Detection of tumor factor necrosis (alpha) but not tumor factor necrosis (beta) in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. Arthritis Rheum*. 1988; 31: 1041-1045.
- SCHMASSMANN, A. *Mechanisms of ulcer healing and effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. American Journal Medicinal*. 1998; 104(3A), 43S-51S; discussion 79S-80S.
- SEKIGUCHI, Y., MANO, H., NAKATANI, S., SHIMIZU, J., WADA, M. *Effects of the Sri Lankan medicinal plant, Salacia reticulata, in rheumatoid arthritis. Genes Nutr*. 2010; 5(1):89-96.
- SEKUT. L., CONNOLLY, K. Anti-TNF-alpha agents in the treatment of inflammation *Expert Opin. Investig. Drugs*. 1998;7(11):1825-39.
- SHEIBANIE, A.F., KHAYRULLINA, T., SAFADI, F.F., GANEA, D., SMADAR, S., NADIR, A. *Prostaglandin E2 exacerbates collagen-induced arthritis in mice through the inflammatory interleukin-23/interleukin-17 axis. Arthritis Rheum*. 2007;56(8):2608-19.

- SIN, Y.M., WONG, M.K., 1992. Effect of sodium aurothiomalate on carrageenan induced inflammation of the air pouch in mice. *Annals of the Rheumatic Diseases* 51, 112–116.
- SMITH, J.B., HAYNES M.K. *Rheumatoid arthritis: a molecular understanding. Ann. Inter. Med.* 2002; 136: 908-922.
- SOUZA, M. H. P., LEMOS, H. P., OLIVERIA, R. B., CUNHA, F. Q. *Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumor necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficient mice. Gut.* 2004; 53: 791-796.
- SOUZA, M.C., SIANI, A.C., RAMOS, M.F., MENEZES-DE-LIMA, O.J., HENRIQUES, M.G. *Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. Pharmazie.* 2003; 58: 582-586.
- STEEN, K.S.S., LEMS, W.F., AERTSEN, J., BEZEMER, D., DIJKMANS B.A.C. *Incidence of clinically manifest ulcers and their complications in patients with rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis.* 2001; 60: 443-447.
- SUN, J. *D-Limonene: Safety and clinical applications. Altern. Med. Rev.* 2007; 12: 259-264.
- TAKAGI, K., OKABE, S., SAZIKI, R. *A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. Jpn. J. Pharmacol.* 1969; 19(3):418-26.
- TAKEEDA, M., HAYASHI, Y., YAMATO, M., MURAKAMI, M., TAKEUCHI, K. *Roles of endogenous prostaglandins and cyclooxygenase isoenzymes in mucosal defense of inflamed rat stomach. J. Physiol. Pharmacol.* 2004; 55:193-205.
- TORO-ARREOLA, S., FLORES-TORALES, E., TORRES-LOZANO, C., DEL TORO-ARREOLA, A., TOSTADO-PELAYO K, DANERI-NAVARRO, A. *Effect of D-limonene on immune response in BALB/c mice with lymphoma. Int Immunopharmacol.* 2005; 5: 829-38.
- TRACEY, D., KLARESKOG, L., SASSO, E.H., SALFELD, J.G., TAK, P.P. *Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. Pharmacol. Ther.* 2008; 117: 244-279.
- TRATSK, K.S., CAMPOS, M.M., VAZ, Z.R., FILHO, V.C., SCHLEMPER, V., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B., 1997. Anti-allergic effects and oedema inhibition caused by the extract of *Drymis winteri*. *Inflammation Research* 46, 509–514.

- TSUKIMI, Y., NAKAI, H., ITOH, S., AMAGASE, K., OKABE, S. *Involvement of heat shock proteins in the healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats.* J. Physiol. Pharmacol. , 2001; 52(3): 391-406.
- VAN ASSCHE, G., RUTGEERTS, P. *Anti-TNF agents in Crohn's disease.* *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2000; 9:103–111.
- VAN DER VEEN. B.S., DE WINTHER, M.P., HEERINGA, P. *Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease.* *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(11):2899-937.
- VANE SJ. Differential inhibition of cyclooxygenase isoforms: an explanation of the action of NSAIDs. *J Clin Rheumatol.* 1998 Oct;4(5 Suppl):s3-10.
- VANE, J.R., BOLTING, R.M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflam. Res.*, 1995; 44: 1-10,
- VIEIRA, L.S. *Fitoterapia da Amazônia: manual de plantas medicinais.* 2.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1992.
- VINEGAR, R., SCHREIBER, W., HUGO, R. *Biphasic development of carrageenin edema in rats.* *J Pharmacol Exp Ther.* 1969;166(1):96-103.
- WALLACE, J. L. *Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury.* *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2000; 15 (5): 691-703.
- WALLACE, J.L., KEENAN, C.M., GRANGER, D.N. *Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process.* *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1990; 259: G462–G467.
- WANG, J.Y., YAMASAKI, S., TAKEUCHI, K., OKABE, S. *Delayed healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats by indomethacin.* *Gastroenterology.* 1989 Feb;96(2 Pt 1):393-402.
- WATANABE, T., HIGUCHI, K., TOMINAGA, K., FUJIWARA, Y., ARAKAWA, T. *Acid regulates inflammatory response in a rat model of induction of gastric ulcer recurrence by interleukin 1beta.* *Gut.* 200; 48(6):774-81.
- WEI, A., SHIBAMOTO, T. *Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils.* *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 1737-42.

WESTMAN, M., KOROTKOVA, M., KLINT, E., STARK, A., AUDOLY, L.P., KLARESKOG, L. et al. *Expression of microsomal prostaglandin E synthase 1 in rheumatoid arthritis synovium. Arthritis Rheum* 2004;50:1774–80.

WHITTLE, B.J. *Nitric oxide in physiology and pathology. Histochem J.* 1995 Oct;27(10):727-37.

YEN, J.H. *Treatment of early rheumatoid arthritis in developing countries. Biologics or disease-modifying anti-rheumatic drugs? Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2006; 60: 688-692.

YOON, W.J., LEE, N.H., HYUN, C.G. *Limonene suppresses lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, prostaglandin E₂, and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. J Oleo Sci.* 2010;59(8):415-21.

ANEXO I

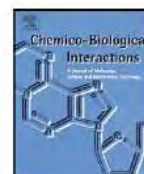
Chemico-Biological Interactions 180 (2009) 499–505



Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint



Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion

Thiago M. Moraes^a, Hélio Kushima^a, Fábio C. Moleiro^a, Raquel C. Santos^a, Lúcia R. Machado Rocha^a,
Márcia O. Marques^b, Wagner Vilegas^c, Clélia A. Hiruma-Lima^{a,*}

^a São Paulo State University (UNESP), Department of Physiology, Rubião Junior, cp 510, CEP 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brazil

^b Center for Research and Development of Plant Genetic Resources, Agronomic Institute of Campinas (IAC), Campinas, São Paulo, Brazil

^c São Paulo State University (UNESP), Institute of Chemistry, cp 355, CEP 14801-970, Araraquara, São Paulo, Brazil