



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP
ESCOLA DE NUTRIÇÃO – ENUT



MIRIAM APARECIDA DE ASSIS SILVA

**AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* mart.) NA
MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA ARTRITE
REUMATOIDE EXPERIMENTAL**

Ouro Preto – Minas Gerais - Brasil

Janeiro de 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP
ESCOLA DE NUTRIÇÃO – ENUT

MIRIAM APARECIDA DE ASSIS SILVA

**AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea mart.*) NA
MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA ARTRITE
REUMATOIDE EXPERIMENTAL**

Trabalho de conclusão de curso de Nutrição
da Universidade Federal de Ouro Preto,
como parte integrante dos requisitos para
finalização da graduação sob a orientação da
prof. ^a Dr.^a Joana Ferreira do Amaral.

Ouro Preto – Minas Gerais - Brasil

Janeiro de 2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S586a Silva, Miriam Aparecida De Assis .
Avaliação do consumo de açaí (Euterpe oleracea mart.) na modulação da resposta inflamatória na artrite reumatóide experimental.
[manuscrito] / Miriam Aparecida De Assis Silva. - 2021.
51 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Joana Ferreira Amaral.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Graduação em Nutrição .

1. Açaí. 2. Artrite reumatóide. 3. Inflamação. I. Amaral, Joana Ferreira.
II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 617.7

Bibliotecário(a) Responsável: Sônia Marcelino - CRB/2247



**Ministério da Educação
Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Nutrição**



Ata da Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado:

Ata da Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado:

“Avaliação do consumo de Açai (Euterpe oleracea mart.) na modulação da resposta inflamatória na artrite reumatoide experimental”.

Aos 15 dias do mês de janeiro de 2021, remotamente pela plataforma Google Meet, reuniu-se a Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso da estudante **Miriam Aparecida de Assis Silva**, orientada pela Prof.^a Joana Ferreira do Amaral. A defesa iniciou-se pela apresentação oral feita pela estudante, seguida da arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por aprovar a estudante.

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Joana Ferreira do Amaral
Presidente (DENCS/ENUT/UFOP)

Prof. Renata Adrielle Lima Vieira
Examinadora (DENCS/ENUT/UFOP)

Prof. Nara Nunes Lage
Examinadora (DENCS/ENUT/UFOP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, sem eles nada disso seria possível, foram inúmeras bênçãos e graças ao longo desse caminho. Deus é minha força.

Agradeço aos meus pais, José Geraldo e Maria Eunice, pelo amor, apoio e incentivo todos esses anos. Agradeço aos meus irmãos Marcus Vinícius e Maílson, pelas conversas, conselhos e amor.

Agradeço imensamente a Vovó Maria e Vovô Vitório, por serem tão presentes em minha vida, por rezarem sempre por mim e torcerem pelo meu bem. Não haveria como descrever aqui, toda a gratidão que tenho.

Agradeço a minha madrinha, Tia Aparecida, pelas inúmeras vezes que me aconselhou, que acreditou em mim e rezou por mim.

Agradeço a toda minha família, por ser minha base, a cada um que me incentiva a ser uma pessoa melhor, que me acolhe e que faz parte da minha história.

Agradeço aos meus amigos de longa data, Adriano, Elaine, Fábio, Flávia, Valquíria, Wanessa, por todo apoio, risadas, conversas, conselhos e carinho comigo.

Agradeço a Giulia, Maiara e Tácila, vocês foram essenciais nesses anos de graduação, e serão pra sempre, obrigada por dividirem tantos momentos comigo, como sempre digo, são minha família de Ouro Preto.

Agradeço a todos do 16.2 e demais amigos de graduação, em especial: Aline, Ana Paula, Clécia, Eduardo, Gabriela, Isabela Moreira, Izabela Bittencourt, Jéssica, João Marcos, Juscelino, Kelly, Lara, Lorrana, Luiza, Maria Emília, Rosimara, Thaís Araújo e Victor. Obrigada pelos momentos de estudo, por cada ombro amigo, a presença de vocês tornou essa graduação mais leve.

Agradeço a Aline, Mariana e Renata, por dividirem uma casinha comigo, foram momentos incríveis, choros, risadas, desesperos e festas, obrigada por serem pacientes, carinhosas e compreensivas comigo.

Agradeço a Carla e Daniel, por serem fundamentais na construção desse trabalho, foram inúmeros momentos de apoio e atenção para comigo.

Agradeço a minha orientadora, Joana, por me aceitar como sua aluna, por toda dedicação, compreensão, cuidado, disponibilidade e atenção.

Agradeço a todos meus professores, por dividirem seus conhecimentos comigo, por me ensinarem muito mais do que eu podia imaginar e por sempre me acolherem.

Agradeço a todos BIONUT, por me receberem como aluna de iniciação científica e me proporcionarem tanto conhecimento.

Agradeço a ENUT e todos seus servidores, por me oferecer esse espaço tão acolhedor e permitir a realização desse sonho.

COLABORADORES

Laboratório de Bioquímica Nutricional e Biologia Molecular - BIONUT

Laboratório de Imunoparasitologia - LIP

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - UFOP

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune caracterizada por inflamação sinovial crônica. O processo de destruição da articulação observado na AR ocorre a partir de uma perda da tolerância imune, ativando vias intracelulares que desencadeiam a inflamação. O consumo de alimentos ricos em compostos bioativos, com efeitos funcionais, vem apresentando efeitos benéficos no controle dos sintomas em humanos e modelos experimentais de AR, como diminuição do edema de citocinas inflamatórias. O açaí (*Euterpe oleracea Mart.*), fruto rico em polifenóis, insere-se neste contexto pois apresenta alta capacidade antioxidante e propriedades anti-inflamatórias. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da dieta 2% de açaí sobre o perfil inflamatório de camundongos portadores de AR induzida por antígeno, por meio da quantificação de IL-10. Camundongos C57BL/6 fêmeas foram divididos em cinco grupos experimentais: controle (C), artrite (AR) e açaí tratamento (AÇT) receberam dieta padrão AIN-93M e açaí(AÇ) e açaí prevenção (AÇP) receberam uma dieta com 2% de açaí, ao longo de 2 semanas. Após este período, foi realizada uma imunização na base da cauda dos animais dos grupos AR, AÇP e AÇT, com emulsão composta por mBSA+CFA+*Mycobacterium tuberculosis*. Neste momento, o grupo AÇT passou a receber dieta com 2% de açaí. Novamente, após duas semanas, os mesmos animais receberam um desafio intra-articular contendo mBSA. Os animais foram eutanasiados após 24h desse desafio. Homogenatos dos tecidos periarticulares, do linfonodo mesentérico e linfonodo inguinal foram usados para o teste de ELISA sanduiche para IL-10. Na articulação dos animais, houve um aumento significativo de IL-10, apontando assim, o efeito anti-inflamatório do açaí. Nos linfonodos mesentéricos e inguinais dos animais, o consumo de açaí, não demonstrou um aumento na produção de IL-10. O sistema imune é muito complexo e integrativo, dessa forma, é necessário a realização de mais estudos que melhor esclareçam as vias de atuação do açaí no possível efeito anti-inflamatório na AR experimental, possibilitando sua utilização como estratégia dietética preventiva e/ou terapêutica para a doença.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by chronic synovial inflammation. The joint destruction process observed in RA occurs from a loss of immune tolerance, activating intracellular pathways that trigger inflammation. The consumption of foods rich in bioactive compounds, with functional effects, has been showing beneficial effects in the control of symptoms in humans and experimental models of RA, such as decreased edema of inflammatory cytokines. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.), A fruit rich in polyphenols, fits in this context because it has a high antioxidant capacity and anti-inflammatory properties. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of the 2% açai diet on the inflammatory profile of mice with antigen-induced RA, through the quantification of IL-10. C57BL / 6 female mice were divided into five experimental groups: control (C), arthritis (RA) and açai treatment (AÇT) received a standard diet AIN-93M and açai (AÇ) and açai prevention (AÇP) received a 2% diet of açai, over 2 weeks. After this period, an immunization was performed at the base of the tail of the animals of the AR, AÇP and AÇT groups, with an emulsion composed of mBSA + CFA + *Mycobacterium tuberculosis*. At this time, the AÇT group started to receive a diet with 2% açai. Again, after two weeks, the same animals received an intra-articular challenge containing mBSA. The animals were euthanized after 24 hours of this challenge. Homogenates of the periarticular tissues, the mesenteric lymph node and the inguinal lymph node were used for the sandwich ELISA test for IL-10. In the articulation of the animals, there was a significant increase in IL-10, thus pointing to the anti-inflammatory effect of açai. In the mesenteric and inguinal lymph nodes of the animals, the consumption of açai did not show an increase in the production of IL-10. The immune system is very complex and integrative, therefore, it is necessary to carry out further studies that better clarify the ways in which açai acts in the possible anti-inflammatory effect in experimental RA, enabling its use as a preventive and / or therapeutic dietary strategy for the disease.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACPAs** – Anticorpos proteicos anti-citrulinados.
- ACR**– Colégio Americano de Reumatologia.
- AIA**– Artrite induzida por antígeno.
- ANOVA** – Análise de variância.
- APC** – Célula Apresentadora de Antígenos.
- AR** – Artrite Reumatoide.
- CAT** – Catalase.
- CFA** – Adjuvante completo de Freund
- CIA** – Artrite induzida por colágeno do tipo II.
- ERO** – Espécies reativas de oxigênio.
- EULAR**– Liga Europeia Contra Reumatismo.
- Fc** – Fragmento cristalizável
- FR** – Fator Rematóide.
- FSAR**– Fibroblastos sinoviais da Artrite Reumatoide.
- GPx** – Glutathione peroxidase.
- HLA**– (*Human Leukocyte Antigen*) Antígeno Leucocitário Humano.
- Ig** – Imunoglobulina.
- IL-1 β** : Interleucina 1- β
- IL-10** – Interleucina 10.
- IL-17** – Interleucina 17.
- IL-6** – Interleucina-6.
- INF- γ** – Interferon- γ .
- JNK** – Proteína quinase c-Jun.
- mBSA** – Albumina sérica metilada.
- MDA** – Dialdeído malônico
- MHC** – (*Major Histocompatibility Complex*) Complexo Principal de Histocompatibilidade.
- MAP p38** – proteínas ativadas por mitogênio do grupo p38
- NF κ B**: Fator nuclear Kappa B
- SE** – Anticorpo compartilhado.
- SOD** – Superóxido dismutase.

TGF – (transforming growth factor) Fator de conversao de crescimento.

Th – (linfocitos T helper) linfocitos T auxiliares.

TLR – (Toll-like receptor) receptor do tipo Toll.

TNF – Fator de necrose tumoral.

Treg – (T regulatory cells) células T reguladoras.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Processo inflamatório na artrite reumatoide. -----	15
Figura 2-Fases da evolução da Artrite Reumatóide. -----	16
Figura 3-Mecanismos de supressão das células T reguladoras. -----	21
Figura 4- Açazeiro -----	26
Figura 5- Representação esquemática do delineamento experimental. -----	33
Figura 6- Concentração de IL-10 na articulação. -----	36
Figura 7- Concentração de IL-10 no linfonodo mesentérico. -----	37
Figura 8-Concentração de IL-10 no linfonodo inguinal. -----	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição da composição das dietas experimentais Constituintes(g) 31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Artrite Reumatoide	13
1.2. Inflamação	18
1.3. Regulação	20
1.4. Modelos animais no estudo da AR	23
1.5. Compostos fenólicos e efeito terapêutico	24
1.6. Açai	25
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo geral	29
2.2. Objetivos específicos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Animais	30
3.2. Dietas	30
3.3. Açai	31
3.4. Indução da artrite	31
3.5. Delineamento experimental	32
3.6. Preparo dos tecidos	34
3.7. Interleucina-10	34
3.8. Análises estatísticas	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Articulação	36
4.2. Linfonodo Mesentérico	37
4.3. Linfonodo Inguinal	38
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXO	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, idiopática, caracterizada por uma inflamação sinovial crônica e progressiva. A AR compromete, principalmente, as articulações periféricas e destrói o tecido ósseo e cartilaginoso em um processo insidioso que resulta em deformidades. O curso da AR é marcado por períodos de remissão e exacerbação, sempre com lesão tecidual que pode afetar todas as articulações e, direta ou indiretamente, alguns órgãos (ALAMANOS & DROSOS, 2005). O progresso da doença muitas vezes leva à rigidez das articulações, conhecida como anquilose fibrosa. A anquilose fibrosa é o estágio final do processo de destruição articular, no qual calcificação do tecido fibroso termina em imobilização total (MCINNE IB & SCHETT G, 2011.)

A AR é uma doença que possui impacto socioeconômico devido à sua morbimortalidade. Grande parte dos pacientes apresenta dificuldade de realizar atividades de sua rotina, diminuindo assim, seu grau de independência (SOKKA et al., 2003). Os pacientes apresentam sintomas como: dor e inchaço nas articulações, rigidez, fadiga, incapacidade funcional e distúrbios de sono e estão relacionados com a redução da qualidade de vida (GOES et al., 2017; SARIYILDIZ et al., 2014). Sokka e colaboradores (2003), demonstraram um índice de 60% de afastamento no trabalho após 15 anos do diagnóstico da doença.

Estima-se que a prevalência da doença na população mundial seja de 0,5 a 1%, sendo 2,5 vezes maior em mulheres do que em homens e o pico de incidência ocorre entre a quarta e sexta década de vida (ALAMANOS & DROSOS, 2005). No Brasil a prevalência varia de 0,2 a 1%, acometendo, principalmente, pacientes entre a quarta e a sexta décadas de vida (GOELDNER et al., 2011).

Por ser uma doença de etiologia desconhecida, diversos fatores são considerados para o início da AR como a predisposição genética e fatores ambientais como tabagismo, o sedentarismo, a dieta e a obesidade. A associação com tabagismo parece ser dependente da dose. O tabagismo também contribui para o aumento dos anticorpos proteicos anti-citrulinados (ACPAs) em pacientes que carregam o epítipo compartilhado, uma região conservada de aminoácidos na subunidade beta das moléculas do antígeno leucocitário humano. Em pacientes com AR que possuem o epítipo compartilhado, a presença dos ACPAs está associada a danos articulares mais graves na progressão da doença. Os

fatores de estilo de vida e alimentação adequados, como o consumo de peixe, azeite e legumes cozidos, sugerem efeito protetor. ALAMANOS & DROSOS, 2005; AREND & FIRESTEIN, 2012).

Os critérios de classificação da AR atuais foram desenvolvidos em 2010 pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) e pela Liga Europeia Contra Reumatismo (EULAR) substituindo os critérios recomendados pela ACR de 1987. A principal alteração nos critérios foi a melhora da sensibilidade para o diagnóstico precoce da AR. Os novos critérios são divididos em: Avaliação das articulações, sorologia, provas de fase aguda por meio de testes e por fim, a duração dos sintomas (VILLENEUVE et al., 2010).

A busca contínua pela melhor compreensão da patogênese da doença tem possibilitado a identificação precoce da AR, com a melhora dos critérios para o diagnóstico. O diagnóstico precoce é essencial para desenvolvimento de terapias, visando a remissão ou redução da atividade da doença. Isto irá melhorar a qualidade de vida do paciente e evitar a progressão do dano articular, além de otimizar o funcionamento físico, o trabalho e a participação social (SMOLEN et al., 2016; HAZES & LUIJME, 2011).

O desenvolvimento da AR ocorre pela perda da tolerância a proteínas presentes na cartilagem, uma mudança histológica que é considerada por alguns autores “artrite precoce”, por preceder aos sinais clínicos da doença (TARNER et al., 2005).

Dentre as diversas manifestações apresentadas na AR, é observado a inflamação da sinóvia, uma camada de tecido conjuntivo que cobre a superfície interna das articulações, bainhas tendíneas e bursas, tecidos responsáveis pela nutrição e produção do líquido sinovial. O revestimento sinovial é composto por sinovócitos, sendo eles macrófagos e fibroblastos. Na AR, o tecido sinovial perde sua característica fisiológica e apresenta hiperplasia - aumento da vascularização e o surgimento de um infiltrado de células inflamatórias. Esta mudança das características do tecido é chamada *pannus*, processo crônico com vários estágios, ilustrado na figura 1 (TARNER et al., 2005; CHOY & PANAY, 2001).

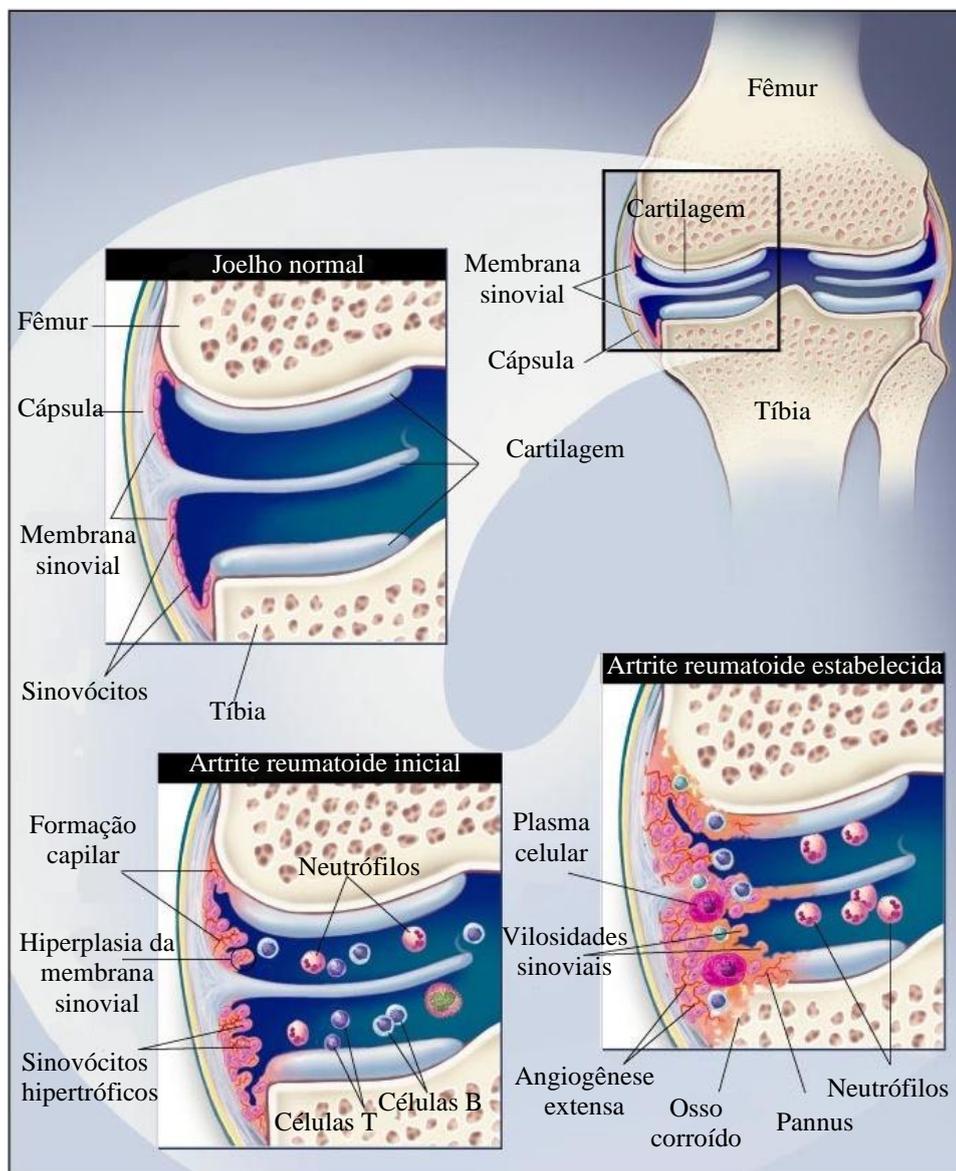


Figura 1-Processo inflamatório na artrite reumatoide (traduzida). Fonte: CHOY & PANAYI (2001)

A progressão da doença é classificada em cinco fases: Predisposição genética, inflamação assintomática, artrite inflamatória sintomática, doença bem desenvolvida e curso recorrente. As fases são exemplificadas a seguir na figura 2 (GIRDLER et al., 2019; AREND & FIRESTEIN, 2012).

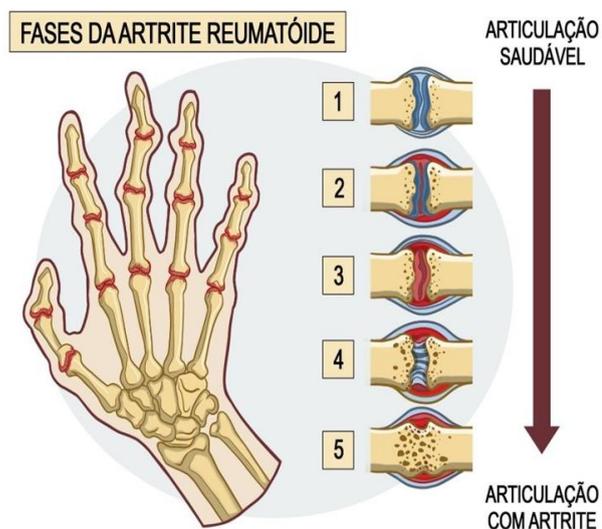


Figura 2-Fases da evolução da Artrite Reumatóide.

A primeira fase corresponde a predisposição genética, o fator genético está associado com a prevalência do diagnóstico da doença entre as famílias e contribui para 40% do risco de se desenvolver AR. Além disso, há associação com o epítipo compartilhado e a mais de 100 genes da AR, que contribuem para 5% do risco genético de desenvolvimento da doença (KEVIN et al., 2017). Os fatores de risco genético para AR incluem genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC do inglês *Major Histocompatibility Complex*). O risco mais importante é atribuído à região de classe II (AREND & FIRESTEIN, 2012).

O MHC classe II é um conjunto de genes localizados no cromossomo 6 que codificam genes do sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês *Human Leukocyte Antigen*), responsáveis pela apresentação de antígenos por células B às células T e associados a maior agressividade da doença. As moléculas HLA são heterodímeros $\alpha\beta$, cujas cadeias β são polimórficas, mas com uma região conservada (aminoácidos 70 a 74). Essa região é conhecida como epítipo compartilhado. Essas moléculas determinam a especificidade de ligação ao antígeno e são codificadas pelos loci *HLADRBE*. Os alelos *HLADRBI* codificam as especificidades clássicas de HLA-DR, incluindo os subtipos de DR4, que são estabelecidos por grandes diferenças de sequência na terceira região hipervariável de *HLADRBI*. A AR está associada ao HLA-DR4, HLA-DR1, HLA-DR10 ou HLA-DR14 (AREND & FIRESTEIN, 2012; WATAD

& AMITAL, 2016; DELGADO & ANAYA, 2007). Portanto, a primeira fase é caracterizada pelos fatores genéticos que predisõem indivíduos a desenvolver a AR.

A segunda fase é assintomática e corresponde a geração inicial da autoimunidade. É caracterizada pela presença de autoanticorpos no soro e no líquido sinovial, com destaque para os autoanticorpos direcionados a proteínas citrulinadas (ACPAs), específico da AR e também a presença do fator reumatoide (FR). Estes compostos são detectáveis antes do início dos sintomas da AR. Os autoanticorpos podem formar complexos imunes que ativam o sistema imunológico inato e levam ao desenvolvimento da sinovite inicial (GIRDLER et al., 2019; ALARCON et al., 2007; SOLBRITT et al., 2003).

A apresentação de antígenos a células B e T por meio do MHC de classe II leva a produção de autoanticorpos contra a imunoglobulina G, ou seja, FR e ACPAs, e sugerem o início da inflamação (SMOLEN et al., 2018). Fatores reumatóides são autoanticorpos que reconhecem a porção constante de outras imunoglobulinas (Ig) e podem ser encontrados na circulação. Nas doenças reumatóides ocorrem de diferentes formas, mas os mais proeminentes são os FR IgM e IgA ligação à parte do fragmento cristalizável (Fc) da IgG (HOLM BE et al., 2015).

A terceira fase apresenta os sintomas iniciais e a inflamação característica que será abordada com mais detalhes no tópico seguinte. É nessa fase que ocorre a perda da tolerância das células B e células T levando ao infiltrado de células estromais e produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias na sinóvia. O tratamento nesta fase pode impedir danos irreversíveis (GIRDLER et al., 2019; SMOLEN et al., 2018).

A quarta fase é a de diagnóstico. Critérios, como tamanho da articulação, teste positivo do FR ou ACPAs, proteína C reativa elevada e a taxa de sedimentação de eritrócito, presença de sintomas a mais de seis semanas e, por fim, a exclusão do diagnóstico de doenças com manifestações semelhantes são importantes de serem considerados em conjunto (GIRDLER et al., 2019). Um fator de confusão no diagnóstico é presença do FR também em pacientes com outras enfermidades que não a AR como lúpus, hepatite B, fibrose pulmonar idiopática, síndrome de Sjogren, malária e entre outras (AREND & FIRESTEIN, 2012; IMBODEN et al., 2014).

O FR por muito tempo foi o autoanticorpo sérico principal da AR e descrito como primeiro composto autoimune que ocorre em aproximadamente 70% dos pacientes de AR (CHIURCHIU & MACCARRONE, 2011). No entanto, atualmente, o teste sérico para

AR também inclui a detecção de ACPAs. A presença de ACPA também é um fator de prognóstico para AR. Os peptídeos citrulinados reconhecidos pelo soro desses pacientes são derivados da queratina, fibronectina, fibrinogênio, colágeno e α -enolase, (CHATFIELD et al., 2009). A combinação de ACPAs e FR é um melhor preditor de AR subsequente do que o autoanticorpo sozinho (VANDER CRUYSSSEN et al., 2007).

O tecido no qual essas células imunes são ativadas ainda é incerto, mas o pulmão é alvo de estudo, correlacionando com a função de tabagismo na artrite reumatoide e presença de ACPAs compartilhados nas biópsias de pulmão e tecido sinovial (SMOLEN et al., 2016). Estes compostos podem ser encontrados no soro de indivíduos assintomáticos até 10 anos antes do aparecimento da doença (NIELEN et al., 2004).

A quinta fase apresenta exacerbações e remissões que causam danos graves a um número maior de articulações e ao tecido ósseo (GIRDLER et al., 2019). A AR também pode levar a outras comorbidades, como a inflamação difusa no pulmão, pericárdio, pleura e lesões nodulares que são mais comuns no tecido subcutâneo (ALAMANOS & DROSOS, 2005; TARNER et al., 2005).

Manifestações extra-articulares presente na AR podem ser até fatais e envolvem manifestações cutâneas, pulmonares, oftalmológicas, cardíacas, neurológicas e renais (IMBODEN et al., 2014). Estas manifestações podem variar a suas gravidades, e se apresentam geralmente no período subclínico mais longo. A existência de manifestações extra-articulares está associada com o agravamento da doença. Afeta, principalmente, pacientes com altos níveis séricos de FR e ACPAs em regiões sinoviais e extra-articulares, inclusive no pulmão, tendo em vista que são encontrados ACPAs IgA em escarro de indivíduos com risco de desenvolver AR (PRETE et al., 2011; WNAG, 2019; WILLIS et al., 2013).

Na apresentação clínica das complicações para paciente com AR a mais comum é o aparecimento da doença pulmonar intersticial (DPI). Nódulos reumatoides, doença pleural, hipertensão pulmonar, bronquite e outros quadros que envolvam as vias aéreas também podem surgir (WNAG, 2019). A complicação cardíaca advém da formação de nódulos reumatoides no miocárdio e nas valvas cardíacas. As lesões provocadas pelo desenvolvimento dos nódulos levam a distúrbios de condução, arritmias e insuficiência cardíaca (IMBODEN et al., 2014).

1.2. Inflamação

Embora os mecanismos precisos do início da AR não sejam completamente esclarecidos, como já foi mencionado no tópico anterior, sabe-se que a apresentação de antígenos das células B às células T, por meio do MHC de classe II, leva a produção de autoanticorpos, sugerindo, assim, o início da inflamação (SMOLEN et al., 2018).

As moléculas HLA, descritas anteriormente, têm um papel fundamental na resposta imune específica para o antígeno, interagindo com o mesmo na superfície das células apresentadoras de antígenos, dando origem a um complexo. Este complexo liga-se a um receptor na superfície da célula T (TRC) e inicia-se a resposta celular contra o antígeno estranho para a célula, levando à proliferação das células T, diferenciação e produção de citocinas. Após reconhecimento do antígeno, as células T entram no seu ciclo celular, produzindo células T específicas para o antígeno e células de memória (BÉRTOLO et al., 2001; PARK, 2005; WEYAND & CORONZY, 2006; DELGADO-VEJA & ANAYA, 2007; KOENDERS, 2010; BETTENCOURT et al., 2015).

Os linfócitos T desempenham importante papel na patogênese da AR, sendo bem caracterizados na AR humana e experimental, principalmente, os subconjuntos dos linfócitos T CD4+, embora ainda não seja completamente esclarecido (FIRESTEIN, 2005). Quando os linfócitos T CD4+ imaturos são polarizados, ou seja, eles entram em contato com o antígeno, estes se desenvolvem em células Th1, Th2, Th17, células foliculares Th (Thf) ou células T reguladoras (Tregs). (O'GARRA & ROBINSON, 2004; PARK, 2005; KOENDERS, 2010)

A AR, por um longo período, foi associada a falhas em relação as células Th1 (ANDERSON et al., 2008; FIRESTEIN, 2003). Os Linfócitos Th1 secretam IL-2 e o interferon- γ (INF- γ) que são as citocinas ativadoras da patogênese. A IL-2 atua na proliferação de Th1 e estimula a diferenciação dos linfócitos B e a produção de anticorpos. O INF- γ promove a ativação dos monócitos/macrófagos, aumentando a secreção de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases com grande potencial destrutivo das estruturas articulares. Além de estimular a maior expressão de moléculas de MHC-II cuja principal função é apresentar peptídeos antigênicos ao linfócito T CD4+, a INF- γ , também estimula a secreção de fator de necrose tumoral, (TNF- α) e IL-1. O TNF- α tem papel em várias fases da patogênese da AR, como ativação da angiogênese, proliferação de fibroblastos sinoviais, e a destruição da cartilagem e do osso (BAERWALD et al., 2000; O'GARRA & ROBINSON, 2004).

No entanto, tem sido mais evidente a participação das células Th17 na autoimunidade. As células Th17 consistem em um grupo distinto das células T CD4+, que produzem a interleucina IL-17. A IL-17 está envolvida no processo de inflamação ao induzir outras quimiocinas inflamatórias por meio de uma cascata de ativação intracelular. (KOENDERS, 2010; PARK et al., 2005).

Raza e colaboradores (2005) analisaram os níveis de citocinas e quimiocinas de pacientes com sinovite precoce como marcador de desenvolvimento de AR e em pacientes com outras artrites inflamatórias precoces. Quando comparados aos níveis de outras artrites inflamatórias precoces, os níveis de IL-2, IL-4, IL-13, IL-17 e citocinas de células estromais encontrados na AR precoce apresentaram-se elevados.

A IL-17 tem efeito em diversas células como macrófagos, fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais e células mesenquimais. Além disso induz a produção de quimiocinas e citocinas neutrófilas, como TNF, IL-1 β , IL-6 e fator estimulador de granulócitos de macrófagos, por essas células. Como resultado dessa cascata de ativações, são observados destruição da cartilagem e inflamação na AR (ANDERSON et al., 2008).

1.3. Regulação

A AR é iniciada pela falha de mecanismos na tolerância imune. Qualquer alteração nas células T pode desencadear uma doença autoimune, portanto são células muito importantes para a regulação da inflamação (WEYAND et al., 2006). Os subconjuntos das células T CD4+ apresentam propriedades diferentes, onde Th1, Th2 e Th17 são células efetoras e as células T reguladoras (Tregs) atuam na regulação. Sendo vias de produção de Th17 e Tregs, células de função antagônica, se interconectam (NOAK et al., 2014).

As Tregs são subconjunto de células T CD4+ e são importantes para manterem a autoimunidade e a proteção contra infecções e células tumorais. São responsáveis por modular negativamente a resposta imune pró-inflamatória. As células Tregs apresentam quatro mecanismos de supressão como mostrado na figura 3. Os mecanismos são: Supressão por citocinas inibitórias, incluindo IL-10, IL-35 e crescimento de transformação fator- β ; supressão por citólise, que inclui mecanismos de morte dependentes de granzimas e perforina; supressão por perturbação metabólica e supressão

por modulação de células dendríticas (DC) maturação ou função (VIGNALI et al., 2008; NOAK et al., 2014).

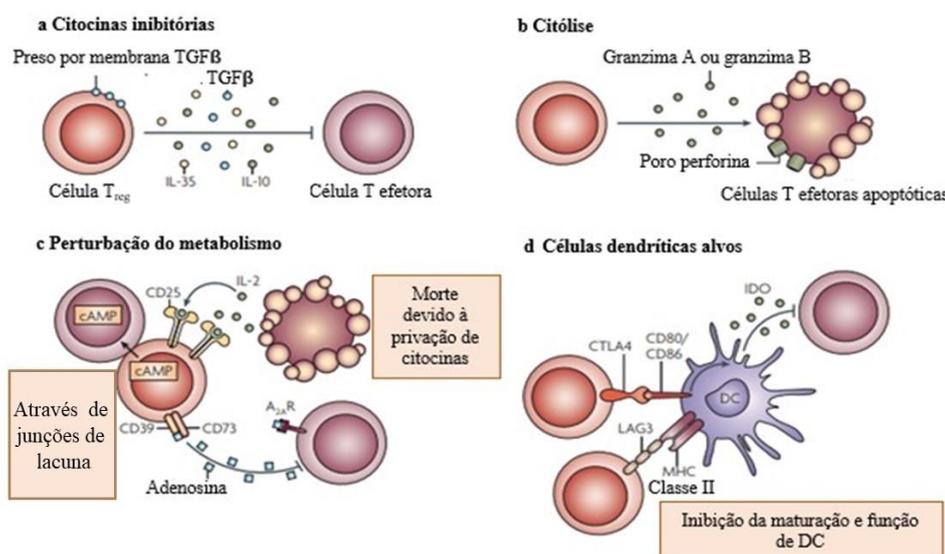


Figura 3-Mecanismos de supressão das células T reguladoras (traduzida). Fonte: (VIGNALI et al., 2008)

A deficiência de células Tregs pode gerar autoimunidade e imunopatologia mediadas por células T (SAKAGUCHI et al., 2008). As células Tregs são divididas em duas classes, as originadas no timo são classificadas com naturais, são mais expressivas, representando mais de 10% de todos os T CD4+ circulantes. As suas características genéticas e fenotípicas são expressas durante sua maturação, no timo. A segunda classe que são as Tregs adaptativas as células T com características normais e que passam a desenvolver fenótipo regulador quando induzidas por IL-2 e TGF-β, periféricamente (BACCHETTA et al., 2007; YAGI et al., 2004; SAKAGUCHI, 2005).

As Tregs são identificadas pela expressão de CD4+, a cadeia IL-2Rα (CD25) e o fator de transcrição da família *forkhead* (Foxp3). O Foxp3 é o principal fator de transcrição que induz a diferenciação das células T em Tregs. Dessa forma, a expressão desse fator está diretamente relacionada a função das Tregs e para modular a expressão de genes que também codificam mediadores imunossupressores (FARIA & WEINER, 2006; RUDENSKY, 2011).

A atuação das Tregs na AR ainda é conflitante. Alguns estudos apontam, principalmente, para a interação com outros compostos presentes na inflamação como TNF, que é indicado como o principal fator que compromete a atividade de Tregs por meio da redução da fosforilação de FoxP3. Como medida terapêutica, busca-se o

equilíbrio na relação Th-17/ Tregs como meio eficaz de imunoterapia, procurando a inibição de citocinas inflamatórias, como o TNF, IL-6 e IL-17, através de medicamentos (NOAK et al., 2014).

Outra citocina envolvida na regulação é a citocina IL-10, apresenta tanto funções anti-inflamatória como pro-inflamatória. As razões para atuações opostas ainda não são completamente claras. Um fato é que IL-10 pode promover respostas imunes, apoiando células B e ativação de células T CD8 +. Porém, a IL-10 é amplamente conhecida pela sua capacidade anti-inflamatória mantendo e reestabelecendo a homeostase imune. Prevenindo, doenças inflamatórias imunomediadas e respostas imunes exuberantes a patógenos (COUPER et al., 2008; BEDKE et al., 2019). Diferentes células do sistema inato e adaptativo são capazes de produzir e responder a IL-10. As células Th2 e Tregs são as principais produtoras de IL-10. A sinalização da interleucina-10 nas células T reguladoras é necessária para a supressão da inflamação através de um loop de feedback positivo e suprime a função pró-inflamatória das células APCs e Th17 (BEDKE et al., 2019).

A falha na produção de IL-10 por meio de mutações e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nas subunidades de IL-10R ou IL-10, está relacionado ao surgimento de doenças inflamatórias mediadas por imunidade. São exemplos: A AR, doença inflamatória intestinal (DII) e lúpus eritematoso sistêmico (LES), o que assegura a importância de IL-10 como citocina supressora da inflamação (BEDKE et al., 2019; ENGELHARDT & GRIMBACHER, 2014; CHONG et al., 2004).

A partir das importantes funções efetuadas pela IL-10, existem estudos sobre seu potencial terapêutico em algumas doenças autoimunes. Como já mencionado, mutações e polimorfismos no nucleotídeo único (SNPs) nos genes IL10 e IL10RA / IL10RB estão associados ao desenvolvimento de doença inflamatória intestinal (DII). Portanto, a IL-10 seria um meio interessante para o tratamento da doença. (KÜHN, 1993; ENGELHARDT & GRIMBACHER, 2014; GLOCKER, 2011; BEDKE et al., 2019).

A IL-10 humana recombinante (rhu IL-10) foi testada para o tratamento da DII em vários estudos clínicos. Porém os resultados não levaram a uma melhora clínica significativa, apresentando eficácia heterogênea entre os pacientes. Houve melhora em pacientes com alta atividade da doença e baixos níveis séricos endógenos de IL-10 em comparação com pacientes com baixa atividade da doença e altos níveis de IL-10. A aplicação de doses baixas a moderadas de rhu IL-10 apresentaram resultados mais

interessantes do que comparado a doses altas, visto que doses altas de rhu IL-10 foram associadas ao aumento de citocinas pró-inflamatórias (FEDORAK et al., 2000; SCHREIBER et al., 2000; TILG et al., 2002; BEDKE et al., 2019).

Como revisado por Saxena e colaboradores (2015), a eficácia do tratamento com rhu IL-10 também foi baixa na AR, esclerose múltipla (EM) e diabetes tipo 1. Alguns estudos têm buscado a melhora do efeito da IL-10, como o desenvolvimento dos anticorpos "armados", que permitem ligação específica e entrega de IL-10 à célula-alvo. A utilização de Dekavil (IL-10 fundida à cadeia variável anti-EDA - fibronectina) para o tratamento da AR e da DII tem sido promissora (SCHWAGER et al., 2009; GALEAZZI et al., 2014; BEDKE et al., 2019).

1.4. Modelos animais no estudo da AR

Modelos animais são importantes para que seja possível a compreensão dos mecanismos da doença articular. Não existe um modelo universal para investigação da doença devido a heterogeneidade molecular e manifestação clínica complexa da AR. Dessa forma, existem diferentes modelos experimentais pra cada subtipo da doença. (KOLLIAS et al., 2011). Nenhum modelo animal único de artrite é capaz de representar, verdadeiramente, a doença humana, porém esses modelos reproduzem vários aspectos e podem ser usados como meio para entender caminhos específicos da doença (VAN DEM BERG et al., 2009).

Os modelos animais de indução da AR são divididos em modelos de imunização e transferência. O primeiro modelo consiste em imunização ativa com constituinte articulares normais, como por exemplo, o colágeno. Dentre os modelos de indução, o mais conhecido é a injeção intradérmica de colágeno tipo II heterólogo no adjuvante completo de Freund na cauda de ratos e camundongos. Na artrite induzida por antígeno (AIA), a injeção contém albumina sérica metilada (mBSA), juntamente com o adjuvante completo de Freund, na base da cauda ou na articulação do animal, desenvolvendo artrite monoarticular. Esse modelo leva a uma inflamação desencadeada por complexo imune e respostas de células T. Já o modelo de transferência consiste na injeção de determinados autoanticorpos patogênicos e levam a fase efetora da AR (HONG et al., 2020; BAS et al., 2016).

Na AIA, modelo utilizado neste trabalho, existe a dependência das células T e a resposta leva às características da artrite como hiperplasia sinovial, infiltrado inflamatório, *pannus* e destruição articular. A mBSA é uma molécula catiônica e, por isso, é o antígeno escolhido, pois é atraída pela cartilagem e fica então retida no local (VAN DEN BERG et al., 1984).

1.5. Compostos fenólicos e efeito terapêutico

Os compostos fenólicos são produzidos no metabolismo secundário de plantas, micronutrientes abundantes em nossa dieta e são constituintes de frutas, verduras, legumes e bebidas, tais como café, chá e vinho. Definidos por suas estruturas químicas como substâncias que apresentam anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Detêm de estrutura variável e com isso, são multifuncionais. Encontram-se cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (LEE et al., 2005; ANGELO & JORGE, 2007).

Diversos estudos têm se concentrado em caracterizar as propriedades medicinais potenciais das plantas, que podem incluir efeitos anti-inflamatórios, antitumorais, antidiabéticos e antioxidantes (LAMBERT et al., 2005; VITA, 2005; SCAPAGNINI et al., 2010). Uma variedade de medicamentos comumente utilizados nos dias atuais é de origem vegetal devido esse potencial terapêutico que, possivelmente é associado a presença dos compostos fenólicos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de 80% da população mundial depende da medicina tradicional usando plantas para satisfazer suas necessidades primárias de saúde (RASKIN et al., 2002; VEIGA et al., 2020; WHO, 2013).

Frutas comumente disponíveis, como mirtilos, framboesas e morangos, e romãs têm mostrado resultados promissores na redução da dor e inflamação em modelos experimentais e em estudos clínicos de artrite em humanos. Existem também algumas evidências sobre o papel de polifenóis específicos de frutas, como a quercetina e os flavonóides cítricos no alívio dos sintomas da AR (BASU et al., 2018).

O estudo de Gonsalves e colaboradores (2015) verificou a possível ação do extrato de chá verde sobre a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) em mitocôndrias isoladas no fígado de ratos com artrite induzida por adjuvante (CFA, *Mycobacterium*

tuberculosis e óleo mineral). O extrato de chá verde é rico em polifenóis, especialmente as catequinas. Foram administradas doses diárias de 250 mg/kg durante 23 dias. Os animais eram ratos da linhagem Holtzman, e foram divididos em dois grupos, controle e com artrite induzida. Os resultados apresentados foram que, mitocôndrias isoladas de animais artríticos apresentaram maior produção de ERO. O extrato de chá verde diminuiu a produção de ERO tanto de mitocôndrias de animais controle como de animais artríticos, e tendeu a ter um efeito maior sobre as mitocôndrias de animais artríticos (GONSALVES et al., 2015).

Visando o conhecimento sobre o efeito do extrato de polifenóis do azeite de oliva extra virgem na AR, em modelo de artrite induzida por colágeno em camundongos, Risolo e colaboradores (2014) realizaram um experimento onde, no dia um, os camundongos foram imunizados com colágeno bovino tipo II e no 21 receberam injeção de reforço. Dos dias 29 a 41 foi administrado via oral uma vez por dia 100 e 200 mg / kg do extrato em camundongos artríticos. Como resultados o uso do extrato diminuiu o edema articular, a migração celular, a degradação da cartilagem e a erosão óssea e reduziu o número de citocinas pró-inflamatórias e prostaglandinas (ROSILO et al., 2014).

Yoon e colaboradores (2013) avaliaram o efeito anti-inflamatório e pró-apoptótico do ácido gálico em fibroblastos sinoviócitos (RA-FLS) de pacientes com AR. O ácido gálico é um polifenólico natural encontrado em por exemplo, uvas, açaí, vinhos e folhas de chá. Os resultados desse estudo mostraram que tratamento com ácido gálico em concentrações de 0,1 e 1,0 μM de AG, induziu a apoptose da RA FLS através da regulação das expressões de proteínas relacionadas à apoptose e reduz a expressão de genes pró-inflamatórios na RA FLS com IL-1 e IL-6.

1.6. Açaí

O açaí é um fruto rico em polifenóis e tem chamado atenção pelo seu possível efeito terapêutico sobre a AR. O açaizeiro é uma palmeira nativa da região amazônica presente em grande parte no norte do Brasil, cujo fruto é o açaí. O açaí possui uma forma globosa cuja cor é vermelho/arroxeadada e com a polpa oleosa. Pode ser cultivado durante o ano todo, mas a maior produção se concentra entre os meses de agosto e dezembro. O despulpamento do açaí leva a produção de bebidas energéticas, sorvetes, doces, geleias,

licores e entre outros produtos. A maior produção se concentra na região norte do Brasil e é transportado para outras regiões do Brasil e do mundo (MENEZES et al., 2008).



Figura 4- Açaizeiro Fonte:<http://frutasnativasdaamazonia.blogspot.com.br/>

O açaí tem se tornado um fruto bastante conhecido por ser benéfico à saúde dos indivíduos. Este efeito é atribuído à sua composição, principalmente pela presença de polifenóis, dentre eles as antocianinas e seu conteúdo alto de ácidos graxos monoinsaturados e fibras (COUTINHO et al., 2017; PALA et al., 2018). As antocianinas tem chamado a atenção por suas funcionalidades medicinais e farmacológicas, como função anticarcinogênica, anti-inflamatórias, antimicrobianas além de prevenir a oxidação de lipídeos de baixa densidade (LDL) (ALASALVAR et al., 2005). Um estudo realizado por Paz e colaboradores (2015) analisou a capacidade antioxidante de oito frutas brasileiras e como resultado o açaí, juntamente com a acerola, apresentou maior capacidade antioxidante.

Kang e colaboradores (2010) isolaram sete flavonoides do açaí liofilizado e avaliaram a capacidade antioxidante dos mesmos. Foi encontrado que a capacidade antioxidante varia de estrutura para estrutura. Em outro estudo, Kang e colaboradores (2011) isolaram outros cinco flavonoides do açaí e investigaram a capacidade antioxidante e também a capacidade anti-inflamatória. Os resultados mostraram uma variação da capacidade antioxidante também para esses novos flavonoides e quanto a ação anti-inflamatória o flavonoide velutina demonstrou potencial anti-inflamatório.

O flavonoide velutina apresenta efeito forte na inibição da expressão de mRNA de TNF- α e IL-6. A ação desse composto foi verificada, em macrófagos peritoneais de camundongos, e mostrou capacidade de inibir a ativação do NF-kB, a MAP quinase p38

e a fosforilação da proteína quinase c-Jun (JNK). Outros flavonoides presentes no açaí conhecidos com capacidade anti-inflamatória são a luteína, apigenina, quercetina, genisteína e hesperetina (XIE et al., 2012)

O estudo de Moura e colaboradores (2012) avaliou a administração oral de um extrato da polpa de açaí (300mg/kg/dia) sobre a redução da inflamação pulmonar induzida por fumaça de cigarro em camundongos. Observou-se uma redução no número de neutrófilos na a atividade da mieloperoxidase, superóxido dismutase, catalase, glutationaperoxidase e diminuição da expressão de TNF- α no tecido pulmonar.

Em humanos, estudo desenvolvido por nosso grupo de pesquisa avaliou o efeito do consumo de polpa de açaí sobre biomarcadores do estado redox em mulheres saudáveis. A intervenção nutricional foi o consumo de 200g/dia de polpa de açaí de origem comercial, durante 4 semanas pelas voluntárias. Antes e após a intervenção foi realizada determinação das concentrações séricas de dialdeído malônico (MDA), proteína carbonilada e grupos sulfidrilas. Como consumo da polpa de açaí observou-se que houve uma redução nos níveis séricos de MDA e de proteína carbonilada e um aumento nos grupos sulfidrilas, melhorando o estado oxidativo as mulheres (BARBOSA et al., 2015).

Outro estudo do grupo avaliou o efeito do consumo de polpa de açaí sobre biomarcadores do metabolismo redox no soro e em células mononucleares e polimorfonucleares. Os resultados demonstraram que a polpa de açaí foi capaz de levar ao aumento da capacidade antioxidante total, aumento na atividade da enzima paraoxonase, diminuição de 42% nas concentrações de LDL oxidada e ainda diminuição nas concentrações de dialdeído malônico, sugerindo que o açaí pode estar envolvido na remoção de ERO. Nas células polimorfonucleares também encontramos aumento da capacidade antioxidante reforçando esse efeito do açaí na dieta. Nenhuma alteração foi observada na atividade das enzimas em células mononucleares (superóxido dismutase, catalase, glutationaperoxidase) (PALA et al., 2016).

Na artrite reumatoide, investigamos o efeito do consumo da polpa de açaí sobre marcadores do metabolismo oxidativo e inflamatórios de camundongos C57BL/6 portadores de artrite induzida por antígeno (mBSA). Os resultados demonstraram que o consumo de açaí na dieta mostrou efeito protetor sobre a AR, com redução na produção de anticorpos, do edema e infiltrado inflamatório, como consequência da melhora no balanço oxidante/antioxidante local e modulação na produção de citocinas e balanço de células Treg/Th17 de forma sistêmica (SILVA, 2018, dados não publicados).

Contudo o estudo de Silva (2018) ainda requer investigações para que possa ser melhor compreendido os mecanismos pelos quais o açaí melhora o perfil antioxidante e inflamatório da AR. Uma limitação do estudo foi o não conhecimento do efeito do consumo do açaí sobre a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e TGF- β , as quais como abordado anteriormente, podem estimular e serem estimuladas pelas células Tregs e podem estar associadas ao aumento da frequência dessas células, assim como à diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias.

Considerando os trabalhos expostos anteriormente, e tendo em vista que a AR é uma doença de impacto social e econômico significativo, faz-se necessário um aprofundamento em estudos que busquem a diminuição dos sintomas e possíveis meios de tratamento. O presente estudo traz a hipótese de que por meio do potencial anti-inflamatório dos compostos polifenólicos presentes no açaí, o consumo desse alimento pode interferir na produção de citocinas anti-inflamatórias e trazer benefícios na sintomatologia e no curso da doença.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Determinar o impacto do consumo da dieta suplementada com açaí sobre a capacidade de produção de IL-10 em diferentes tecidos-chave no desenvolvimento da AR em camundongos C57BL/6 fêmeas.

2.2. Objetivos específicos

- Induzir a artrite experimental;
- Quantificar a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 no tecido articular e nos linfonodos mesentérico e inguinal;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Os animais utilizados para todo o experimento foram 40 camundongos C57BL/6 fêmeas, com seis semanas de idade, obtidos e mantidos no Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, com 4 a 5 animais por caixa, com controle de luz e temperatura. Os animais receberam água e dietas *ad libitum*. Todos os procedimentos contidos nesse projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP com o Protocolo nº 2016/38, (ANEXO 1)

3.2. Dietas

As dietas oferecidas aos animais foram preparadas com base Na referência de dieta padrão para roedores AIN93M (REEVES et al., 1993). As polpas de açaí foram mantidas a temperatura de -20°C até o momento do uso na preparação da dieta. A polpa de açaí foi descongelada e adicionada à dieta dos animais na proporção de 20 g de peso seco de açaí (200 mL de polpa) para cada quilo de dieta, ou seja 2% da polpa. Essa dieta foi desenvolvida por Souza e colaboradores (2010) em seu estudo para verificar a ação antioxidante do açaí em ratos dislipidêmicos. As dietas foram classificadas como isocalóricas e isoproteicas e sua composição está descrita na Tabela 1

Tabela 1 - Descrição da composição das dietas experimentais (g)

Constituintes (g)	Dietas	
	Padrão	Padrão + Açaí
Amido de Milho	720	700
Caseína	140	140
Celulose	50	50
Óleo de Soja	40	40
Mistura de Minerais	35	35
Mistura de Vitaminas	10	10
Colina	2,5	2,5
Polpa de Açaí	0	20
Valor calórico (Kcal)	3840	3844,4

* Açaí (Para 1 kg de dieta, Utilizou-se duas polpas de açaí (100g) da marca Icefruit®. Cada polpa de açaí apresenta 10% de açaí). Fatores de conversão: proteínas 4 Kcal/g, lipídios 9 Kcal/g, açúcares 4 Kcal/g.

3.3. Açaí

A polpa de açaí pasteurizada, livre de corantes e conservantes, foi obtida da Icefruit Comércio de Alimentos Ltda. (Tatuí, São Paulo, Brasil). Em uma única remessa de um mesmo lote, a fim de manter a homogeneidade ao longo do experimento e mantida a -20°C até o uso.

3.4. Indução da artrite

Foi utilizada uma solução contendo mBSA (Sigma) dissolvida em solução salina, em uma concentração de 10 mg/mL, emulsionada em volume igual de solução de adjuvante completo de Freund (CFA) acrescido de *Mycobacterium tuberculosis* na concentração de 5 mg/mL. A imunização foi realizada injetando-se 100 µL desta solução final na base da cauda de cada animal quando completaram oito semanas de vida. No 14º dia posterior à imunização, o desafio foi realizado, com uma injeção intra-articular de 10 µg de mBSA em 10 µL de solução salina. A mBSA costuma ser o antígeno de escolha, pelo fato de ser uma molécula catiônica, atraída pela cartilagem, que é negativamente carregada e, assim, fica retida na articulação (Van Den Berg et al., 1984). O protocolo experimental geralmente é efetuado com uma imunização na base da cauda dos animais, com uma emulsão composta por mBSA, CFA e *Mycobacterium tuberculosis*. A função

do CFA é apresentar continuamente o antígeno para o sistema imunológico, sendo assim possível uma resposta imune forte e persistente. O *Mycobacterium tuberculosis*, por sua vez, atrai macrófagos para o local da lesão. Nesse modelo, imunizações de reforço podem ser efetuadas dentro de 7 a 14 dias, seguidas de uma injeção intra-articular do antígeno, no 21º dia. Como alternativa, outros modelos utilizam apenas a injeção intra-articular após 14 dias da primeira imunização. O desafio intra-articular é essencial para a migração de neutrófilos, que se inicia em 6 horas, com pico em 24 horas (Grespan et al., 2008)

3.5. Delineamento experimental

Inicialmente, 40 animais com seis semanas de idade foram divididos em 5 grupos experimentais, conforme descrito abaixo e exemplificado na figura 5:

- **Controle (C):** Grupo que recebeu dieta controle e não foi induzida artrite;
- **Açaí (AÇ):** Grupo que recebeu dieta suplementada com açaí e não foi induzida artrite;
- **Artrite (AR):** Grupo que recebeu dieta controle e foi induzida artrite;
- **Açaí Prevenção (AÇP):** Grupo que recebeu dieta suplementada com açaí desde o primeiro dia e, posteriormente, foi induzida artrite.
- **Açaí Tratamento (AÇT):** Grupo que recebeu dieta suplementada com açaí um dia após a indução da artrite.

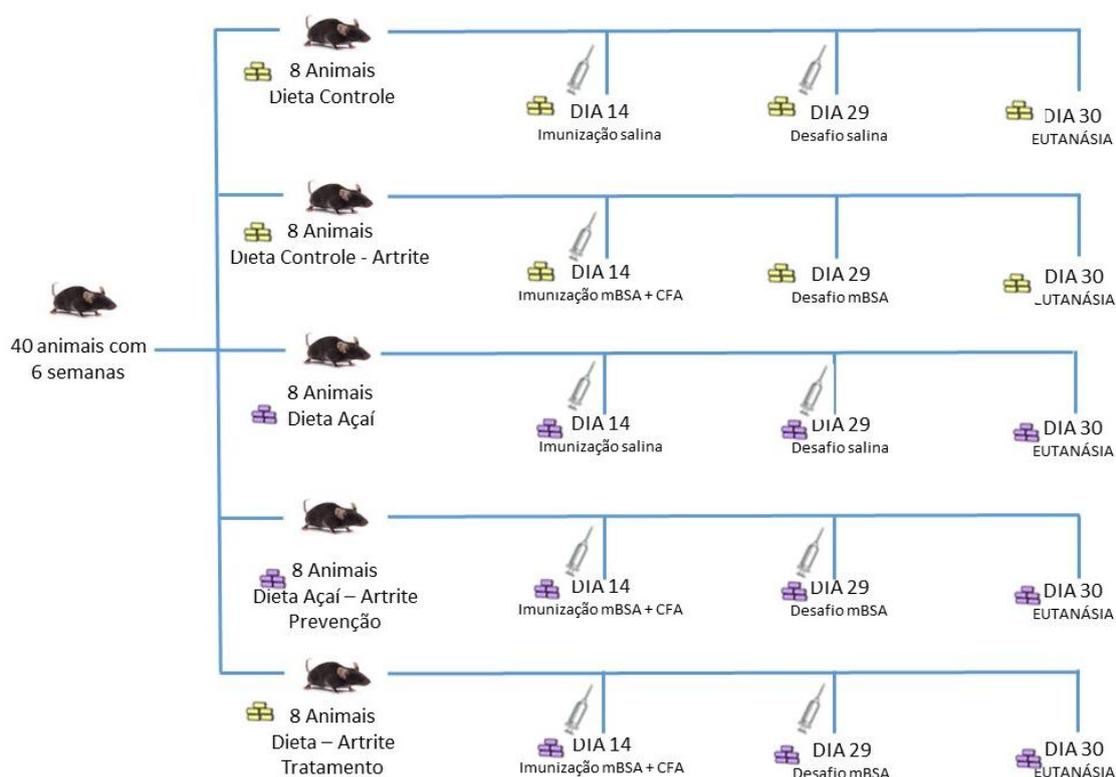


Figura 5- Representação esquemática do delineamento experimental. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram divididas em cinco grupos: Controle (C): recebeu dieta controle e não foi induzido artrite; Açai (AÇ): recebeu dieta suplementada com açai e não foi induzido artrite; Artrite (AR): recebeu dieta controle e foi induzido artrite; Açai Prevenção (AÇP): recebeu dieta suplementada com açai desde o primeiro dia e, posteriormente, foi induzido artrite; Açai Tratamento (AÇT): recebeu dieta suplementada com açai um dia após a indução da artrite. Duas semanas após o início das dietas, a artrite foi induzida com uma imunização subcutânea de mBSA em CFA e Mycobacterium tuberculosis; duas semanas após a imunização, o desafio foi realizado pela injeção de mBSA diretamente no joelho e 24h depois, os animais foram eutanasiados e coletados órgãos e tecidos.

Os animais C, AÇ, AR e AÇP começaram a receber dieta controle ou dieta suplementada com 2% de polpa de açai desde o primeiro dia do experimento, com seis semanas de idade. O grupo AÇT iniciou o experimento com dieta controle e, somente no dia seguinte à imunização, teve sua dieta trocada para suplementada com 2% de polpa de açai. Houve a troca da dieta três vezes na semana. Após 30 dias de experimento, 14 dias após a primeira imunização e 24 horas após o desafio intra-articular, momento no qual ocorre o pico da inflamação aguda, os animais foram deixados em jejum por 12 horas, foram anestesiados com uma solução de 100µL a base de PBS, cloridrato de ketamina (25%) e cloridrato de xilazina (25%), seguida por deslocamento cervical e posteriormente, exsanguinação. Os baços, linfonodos mesentéricos e inguinais e tecidos periarticulares do joelho foram coletados, pesados, imersos em nitrogênio líquido e imediatamente armazenados a -80°C.

3.6. Preparo dos tecidos

Primeiramente, foi preparado uma solução tampão em 25 ml de PBS estéril (pH 7,2), contendo: NaCl (0,4M), EDTA (0,9 mM), albumina bovina sérica (BSA - 75,7mM), Tween® 20 (0,4mM) e penicilina G (10.000U/ml) na proporção de 1:100 (v/v). No momento do preparo do homogenato, foi adicionado as seguintes antiproteases nas respectivas concentrações finais: fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF - P7626, Sigma®) a 195 nM, leupeptina a 25 µM (L2884, Sigma®), Pepstatina A a 1 µM (P4265, Sigma®) e 2 µl de aprotinina A (A1250000, Sigma®)'. Por fim, completou-se o volume com PBS para 50 ml em um balão volumétrico. As amostras de tecido periarticular, linfonodo inguinal e linfonodo mesentérico foram trituradas (100mg/ml) com auxílio de um homogeneizador elétrico e em seguida, centrifugadas a 10.000rpm por 10min a 4°C e o sobrenadante coletado.

3.7. Interleucina-10

A quantificação da concentração IL-10 nos tecidos coletados dos animais foi realizada por meio do ensaio imunoenzimático do tipo ELISA, por meio de anticorpos primários monoclonais anti IL-10. Utilizando-se, placas de poliestireno com 96 poços.

Nas placas foi colocada a solução de anticorpo de captura 100µL por poço e incubado em *overnight* a 4°C. Essas foram lavadas 3 vezes em solução sabão (PBS/0,005% de tween20). Em seguida, foi adicionado em cada poço da placa 200µL de solução de bloqueio (PBS/ 10% de soro fetal bovino (SFB) e incubado por 1 hora a 25°C. Logo após, a placa foi novamente lavada 3 vezes em solução sabão realizada a pipetagem do padrão nos poços destinados da placa. Em cada poço do padrão foi adicionado 100µL de solução de bloqueio. Adicionado 200µL do padrão no primeiro poço e procedido de diluição seriada nos demais, resultando um total de 7 pontos da curva e em duplicata. O ponto destinado ao branco só recebeu a solução de bloqueio em duplicata. Nos poços referentes as amostras foram colocadas (100µL ou 50µL) do sobrenadante em duplicata, e então incubado por 2 horas a 25°C.

Realizou-se novamente a lavagem das placas na solução sabão por 5 vezes, adicionou-se a solução de detecção 100µL por poço e incubado por 1 hora a 25°C. As placas foram lavadas 7 vezes na solução sabão e colocado 100µL de solução de substrato: 1mg de Tetrametilbenzidina, 1ml de Dimetilsulfóxido, 10mL de tampão citrato-fosfato

ph 4,0 e 5µL de água oxigenada 35% a cada poço. Incubado a 25°C por cerca de 30 minutos. Logo após, a reação foi interrompida adicionando 50µL de H₂ SO₄ 2N por poço e realizada a leitura no comprimento de onda de 450nm por um leitor de ELISA (Bio-Rad Modelo 450 Leitor de Microplacas).

3.8. Análises estatísticas

Os resultados foram analisados com auxílio do *software* GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software) sendo o valor de $p \leq 0,05$ utilizado como limite da significância estatística. Para a avaliação dos dados, foi realizada análise de variância em fator único (ANOVA one-way) para testes paramétricos e o teste de Tukey para múltiplas comparações. Os resultados foram expressos em média e \pm erro padrão.

4. RESULTADOS

Para avaliação do possível efeito anti-inflamatório do açaí no desenvolvimento da artrite reumatoide experimental em camundongos C57BL/6, foi determinada a concentração de IL-10 no tecido periarticular e nos linfonodos mesentérico e inguinal.

4.1. Articulação

Na articulação dos animais, foco da inflamação, observou-se uma elevação da concentração da IL-10 no grupo Açaí tratamento, sugerindo o efeito anti-inflamatório da administração da dieta com açaí 2% (Figura 6).

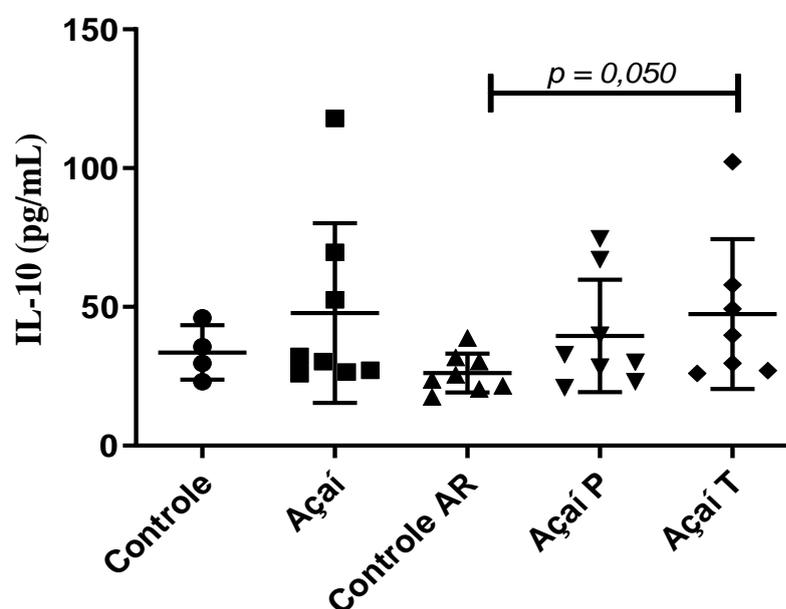


Figura 6- Concentração de IL-10 na articulação. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram divididas em cinco grupos: Controle (C): recebeu dieta controle e não foi induzido artrite; Açaí (AÇ): recebeu dieta suplementada com açaí e não foi induzido artrite; Artrite (AR): recebeu dieta controle e foi induzido artrite; Açaí P (AÇP): recebeu dieta suplementada com açaí desde o primeiro dia e, posteriormente, foi induzido artrite; Açaí T (AÇT): recebeu dieta suplementada com açaí um dia após a indução da artrite. Duas semanas após o início das dietas, a artrite foi induzida com uma imunização subcutânea de mBSA em CFA; duas semanas após a imunização, o desafio foi realizado pela injeção de mBSA diretamente no joelho e 24h depois, os animais eutanasiados. Homogenato de tecido periarticular foram testados por ELISA sanduíche para IL-10. Foram realizados os testes Oneway ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

4.2. Linfonodo Mesentérico

No linfonodo mesentérico, órgão encontrado envolto no intestino, não houve diferença significativa entre os grupos com relação a produção de IL-10, perante a administração da dieta suplementada com 2% de açaí. Os resultados não mostraram aumento de IL-10 nos grupos esperados Açaí P e Açaí T. Como mostra a figura 7.

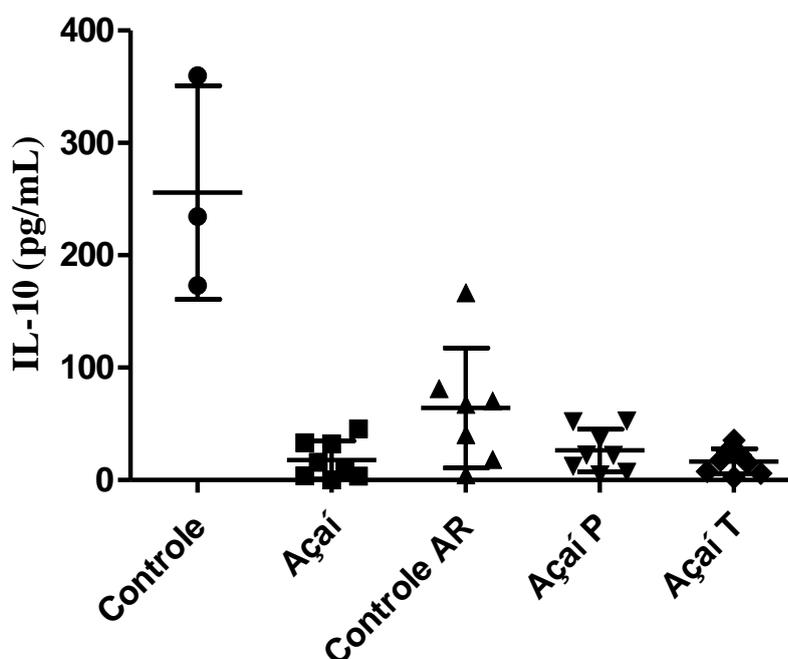


Figura 7- Concentração de IL-10 no linfonodo mesentérico. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram divididas em cinco grupos: Controle (C): recebeu dieta controle e não foi induzido artrite; Açaí (AÇ): recebeu dieta suplementada com açaí e não foi induzido artrite; Artrite (AR): recebeu dieta controle e foi induzido artrite; Açaí P (AÇP): recebeu dieta suplementada com açaí desde o primeiro dia e, posteriormente, foi induzido artrite; Açaí T (AÇT): recebeu dieta suplementada com açaí um dia após a indução da artrite. Duas semanas após o início das dietas, a artrite foi induzida com uma imunização subcutânea de mBSA em CFA; duas semanas após a imunização, o desafio foi realizado pela injeção de mBSA diretamente no joelho e 24h depois, os animais eutanasiados. Homogenato de linfonodo mesentérico foram testados por ELISA sanduíche para IL-10. Foram realizados os testes Oneway ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

4.3. Linfonodo Inguinal

A figura 8 abaixo, expressa a concentração de IL-10 no linfonodo mesentérico dos cinco grupos avaliados. Observou-se que a concentração de IL-10 no linfonodo inguinal não demonstraram diferença significativa entre os grupos na produção de IL-10 mesmo com a administração da dieta de açaí 2%.

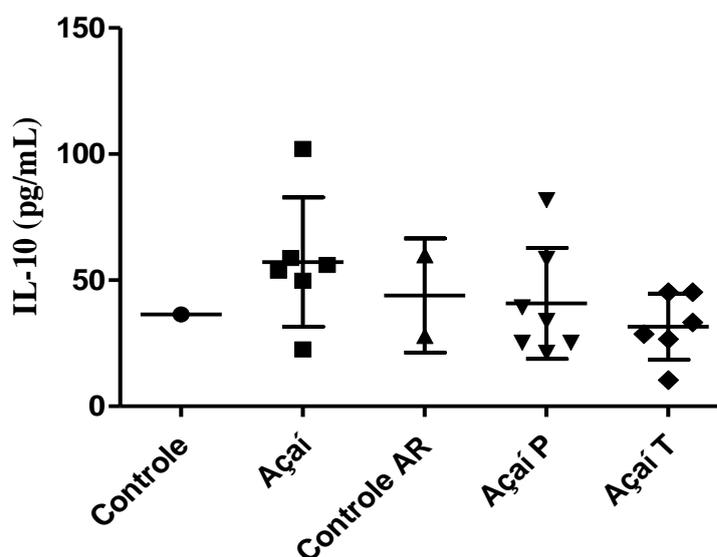


Figura8-Concentração de IL-10 no linfonodo inguinal. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram divididas em cinco grupos: Controle (C): recebeu dieta controle e não foi induzido artrite; Açaí (AÇ): recebeu dieta suplementada com açaí e não foi induzido artrite; Artrite (AR): recebeu dieta controle e foi induzido artrite; Açaí P (AÇP): recebeu dieta suplementada com açaí desde o primeiro dia e, posteriormente, foi induzido artrite; Açaí T (AÇT): recebeu dieta suplementada com açaí um dia após a indução da artrite. Duas semanas após o início das dietas, a artrite foi induzida com uma imunização subcutânea de mBSA em CFA; duas semanas após a imunização, o desafio foi realizado pela injeção de mBSA diretamente no joelho e 24h depois, os animais eutanasiados. Homogenato de linfonodo inguinal foram testados por ELISA sanduíche para IL-10. Foram realizados os testes Oneway ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

5. DISCUSSÃO

A AR é uma doença autoimune de alta prevalência, que acomete principalmente as articulações; é caracterizada por uma inflamação nas membranas sinoviais e que pode levar a danos irreversíveis e morte precoce (ALAMANOS & DROSOS, 2005). Tendo em vista que os meios de tratamento existentes até o momento, apresentam limitações como os efeitos colaterais, além de altos custos tanto para o paciente como para a sociedade. Por isso estudos que visam a utilização de compostos bioativos e alimentos que possam contribuir na prevenção e no tratamento da AR se fazem de grande importância para o cuidado de pessoas acometidas pela doença.

O percentual de açaí aplicado na dieta foi baseado em estudo realizado anteriormente por Souza e colaboradores (2010), no qual ficou claro que a dieta suplementada com açaí é balanceada e que animais alimentados com a mesma apresentam parâmetros nutricionais normais: evolução da curva ponderal, contagem de células sanguíneas totais, concentrações séricas de albumina e de proteínas totais e aparência geral do animal (comportamento e estado do pelo). Tais cuidados tomados na metodologia ligada a dieta asseguram que as possíveis alterações observadas no perfil bioquímico e imunológico são decorrentes do efeito antioxidante e anti-inflamatório provocado pelo açaí, mas não de alterações de ordem nutricional. Além disso, a quantidade de açaí estabelecida equivale ao consumo de uma porção de fruta na alimentação diária de humanos.

A eficácia do modelo de indução da artrite foi comprovada no estudo de Silva (2018, dados não publicados). Os resultados desse estudo demonstraram manifestações características da AR, como aumento nos níveis de Ig nos grupos de animais artríticos, aumento no edema da pata e aumento do infiltrado inflamatório.

Partindo do princípio de que o açaí é um alimento rico em compostos fenólicos, principalmente, as antocianinas e estes compostos são conhecidos pela sua capacidade de promover ação antioxidante e anti-inflamatória, esse estudo investigou o efeito da dieta de 2% de açaí na possível redução da inflamação na artrite induzida por antígeno (mBSA) em camundongos C57BL/6.

Como já apresentado, alterações nas células T pode desencadear uma doença autoimune, portanto, são células muito importantes para a regulação da inflamação. O subconjunto das células T CD4⁺ é composto por células efetoras e reguladoras. As Tregs são responsáveis pela supressão da resposta imune, modulando negativamente a resposta

pró-inflamatória por mecanismos como supressão por citocinas reguladoras, como a IL-10.

Com relação a análise das articulações dos animais, houve aumento da concentração da IL-10 significativa no grupo Açai T, sugerindo o efeito anti-inflamatório da administração da dieta com açai 2%. Não mostrou aumento na produção de IL-10 quando avaliada a concentração da mesma nos linfonodos mesentéricos e inguinais.

Com esses resultados, observamos que no modelo experimental agudo, o aumento de IL-10 foi menos expressivo que o esperado, no entanto a IL-10 se mostrou significativamente aumentada no tecido periarticular dos animais que receberam a dieta de açai 2%, especificamente no grupo que recebeu a dieta após a indução da AR, considerado grupo tratamento. Esse resultado pode ser relacionado com o curto período entre a indução e a eutanásia, o que nos leva a pensar que em um modelo com perfil mais crônico, um intervalo maior entre indução e eutanásia, o aumento de IL-10 seja mais expressivo.

O estudo de nosso grupo realizado por Silva, (2018, dados ainda não publicados) mostrou que a suplementação na dieta com 2% de açai levou a redução significativa das concentrações de TNF, IFN- γ e IL-17 em culturas de células do baço e linfonodo inguinal e de IFN- γ no linfonodo mesentérico. No entanto, não observou reduções significativas dessas citocinas no tecido periarticular. A partir disso enunciamos a hipótese de que o aumento de IL-10 no tecido periarticular, leva a uma inibição da síntese e secreção de citocinas inflamatórias nos linfonodos.

A literatura se mostra consistente ao apontar a importância da IL-10 em manter e reestabelecer a homeostase imune, sendo a manutenção de níveis adequados de IL-10 capaz de prevenir doenças inflamatórias imunomediadas e respostas imunes exuberantes a patógenos (COUPER et al., 2008; BEDKE et al., 2019). Contudo, sabemos também que o sistema imune é muito mais complexo e integrativo, por isso não se pode limitar a observação de um fenômeno como a inflamação pela perspectiva de uma única interleucina.

Na tuberculose em atividade, por exemplo, observa-se diminuição da resposta Th1 e aumento de produção e ação de citocinas reguladoras como a IL-10, que inibe a proliferação das células e a produção de IFN- γ , comprometendo os mecanismos microbicidas dos macrófagos e a apresentação de antígenos, além de ter efeito oposto ao do TNF- α , protegendo contra danos teciduais, pela regulação da inflamação e da apoptose

(ROJAS et al., 1999). O desequilíbrio entre a proporção de expressões de IL-10 e TGF- β contribui para uma regulação ineficaz da expressão de citocinas inflamatórias na obesidade infantil (MEDEIROS et al., 2018).

A IL-10 é uma das citocinas inflamatórias mais importantes na formação de respostas imunes na mucosa do intestino. Camundongos deficientes de IL-10 criados em ambiente definido livre de patógenos específicos, desenvolvem uma inflamação espontânea do intestino, chamada enterocolite (ZURITA-TURK et al., 2020).

O estudo de Silva, (2018, dados ainda não publicados) também mostrou que a suplementação de açaí resultou em frequências de células Tregs significativamente superior nas células do baço, linfonodos inguinal e mesentérico, em animais artríticos que consumiram açaí, além de redução do edema. Como mostra a literatura, as células Tregs estão envolvidas nos mecanismos de regulação da inflamação, sendo um deles a supressão por citocinas inibitórias como a IL-10 (VIGNALI et al., 2008).

O potencial anti-inflamatório do açaí já foi demonstrado em alguns estudos anteriores utilizando diferentes modelos experimentais. Xie e colaboradores (2011), demonstraram em seu estudo que camundongos deficientes em apolipoproteína E (apoE), suplementados com suco de açaí ao longo de 5 semanas apresentaram redução significativa das concentrações séricas de IL-6 e TNF- α e redução da expressão gênica e dos níveis de proteína das mesmas citocinas em macrófagos isolados, em comparação ao grupo controle. Também foi observado que o suco de açaí foi eficaz na redução da ativação da via de sinalização do NF- κ B.

NF- κ B quando ativado atua na indução transcricional de genes pró-inflamatórios em células imunes inatas e adaptativas. Algumas citocinas provenientes dessa ativação são: IL-1, IL-2, IL-8, TNF- α , IL-17, IL-12, entre outras (LIU et al., 2017). O estudo de Silva (2018, dados ainda não publicados) demonstrou que a suplementação com açaí levou a redução de IL-17 e TNF- α em células do baço e linfonodo inguinal.

Em outro estudo, Xie e colaboradores (2012) avaliaram uma flavona presente no açaí, a velutina. Esse composto inibiu eficazmente a expressão de TNF- α e IL-6, através da inibição da ativação do NF- κ B e da fosforilação da p38 e JNK, em cultura de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos e estimuladas com LPS. O estudo de Moura e colaboradores (2012) demonstrou que extrato de açaí foi capaz de reduzir a expressão de TNF- α na inflamação do tecido pulmonar de camundongos submetidos à exposição de fumaça de cigarro.

Partindo da análise dos resultados deste estudo e de Silva (2018), podemos enunciar a ação do açaí na inflamação de forma mais complexa e por mais de uma via. Sendo possivelmente, a inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias e o aumento discreto das Tregs e da IL-10 no local da inflamação. Uma das muitas manifestações desse componente dietético no perfil inflamatório.

Esse estudo apresentou algumas limitações como a dificuldade de encontrar outros estudos que utilizaram o açaí como possível tratamento na AR. Pelo modelo escolhido, AIA, existiu uma dificuldade de associação dos resultados, em um modelo crônico, os resultados poderiam nos mostrar mais informações.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a dieta com 2% de açaí levou ao aumento da IL-10 no tecido periarticular, em camundongos portadores de artrite reumatoide induzida por antígeno. O sistema imune é muito complexo e integrativo, dessa forma, é necessário a realização de mais estudos que melhor esclareçam as vias de atuação do açaí no possível efeito anti-inflamatório na AR experimental, possibilitando sua utilização como estratégia dietética preventiva e/ou terapêutica para a doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAMANOS, Yannis; DROSOS, Alexandros A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. **Autoimmunity reviews**, v. 4, n. 3, p. 130-136, 2005.
- ALASALVAR, C. et al. Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 69-76, 2005.
- ANDERSSON, Anna K.; LI, Ching; BRENNAN, Fionula M. Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 10, n. 2, p. 204, 2008.
- ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.
- ARANHA, Luciana Nicolau et al. Effects of a hypoenergetic diet associated with açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp consumption on antioxidant status, oxidative stress and inflammatory biomarkers in overweight, dyslipidemic individuals. **Clinical Nutrition**, 2019
- AREND, William P.; FIRESTEIN, Gary S. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 10, p. 573, 2012.
- BACCHETTA, Rosa; GAMBINERI, Eleonora; RONCAROLO, Maria-Grazia. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, n. 2, p. 227-235, 2007.
- BAERWALD, C.G.O.; BURMESTER, G.R.; KRAUSE, A. Interactions of autonomic nervous, neuroendocrine, and immune systems in rheumatoid arthritis. **Neuroendocrin. Mech. Rheum. Dis.**, v. 26, n. 4, p. 841-857, 2000.
- BARBOSA, Priscila Oliveira. A polpa de açai (*Euterpe oleracea* Mart.) melhora o estado oxidativo de mulheres saudáveis. 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2015.
- BAS, Duygu B. et al. Pain in rheumatoid arthritis: models and mechanisms. Pain management, v. 6, n. 3, p. 265-284, 2016.
- BASU, Arpita; SCHELL, Jace; SCOFIELD, R. Hal. Dietary fruits and arthritis. **Food & function**, v. 9, n. 1, p. 70-77, 2018.
- BEDKE, Tanja et al. IL-10-producing T cells and their dual functions. In: Seminars in immunology. Academic Press, 2019. p. 101335.
- BÉRTOLO, Manoel Barros et al. Alelos HLA-DRB1 e o prognóstico da artrite reumatóide em pacientes brasileiros. **Rev. bras. reumatol**, p. 151-156, 2001.

- BETTENCOURT, Andreia et al. The protective role of HLA-DRB113 in autoimmune diseases. **Journal of immunology research**, v. 2015, 2015.
- CHATFIELD, Simon M. et al. Anti-citrullinated peptide antibody: death of the rheumatoid factor?. **Med J Aust**, v. 190, n. 12, p. 693-695, 2009.
- CHIURCHIU, Valerio; MACCARRONE, Mauro. Chronic inflammatory disorders and their redox control: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 9, p. 2605-2641, 2011.
- CHONG, W. P. et al. Association of interleukin-10 promoter polymorphisms with systemic lupus erythematosus. **Genes & Immunity**, v. 5, n. 6, p. 484-492, 2004.
- CHOY, Ernest HS; PANAYI, Gabriel S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 12, p. 907-916, 2001.
- COUPER, Kevin N.; BLOUNT, Daniel G.; RILEY, Eleanor M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 5771-5777, 2008.
- COUTINHO, Rosemary Maria Pimentel et al. Physicochemical and microbiological characterization and antioxidant capacity of açai pulps marketed in the states of Minas Gerais and Pará, Brazil. **Ciência Rural**, v. 47, n. 1, 2017.
- DE ALMEIDA GONÇALVES, Geferson et al. Ação do Extrato de Chá Verde sobre a Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em Mitocôndrias Isoladas de Fígado de Ratos com Artrite Induzida por Adjuvante. **Blucher Biochemistry Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 75-78, 2015.
- DE MOURA, Roberto Soares et al. Effects of Euterpe oleracea Mart.(AÇAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. **Phytomedicine**, v. 19, n. 3-4, p. 262-269, 2012.
- DELGADO-VEGA, A. M., & ANAYA, J. M. (2007). Meta-analysis of HLA-DRB1 polymorphism in Latin American patients with rheumatoid arthritis. **Autoimmunity reviews**, 6(6), 402-408
- DELGADO-VEGA, Angélica M.; ANAYA, Juan-Manuel. Meta-analysis of HLA-DRB1 polymorphism in Latin American patients with rheumatoid arthritis. **Autoimmunity reviews**, v. 6, n. 6, p. 402-408, 2007.
- ENGELHARDT, Karin R.; GRIMBACHER, Bodo. IL-10 in humans: lessons from the gut, IL-10/IL-10 receptor deficiencies, and IL-10 polymorphisms. In: **Interleukin-10 in Health and Disease**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2014. p. 1-18.
- FARIA, A. M. and H. L. WEINER. Oral tolerance and TGF-beta-producing cells. **Inflamm Allergy Drug Targets** 2006; 5(3):179-190
- FEDORAK, Richard N. et al. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 119, n. 6, p. 1473-1482, 2000.

- FIRESTEIN, G. S. (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423(6937), 356-361.
- FIRESTEIN, Gary S. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **JCR: Journal of Clinical Rheumatology**, v. 11, n. 3, p. S39-S44, 2005.
- GABRYŠOVÁ, Leona et al. Negative feedback control of the autoimmune response through antigen-induced differentiation of IL-10-secreting Th1 cells. *Journal of Experimental Medicine*, v. 206, n. 8, p. 1755-1767, 2009.
- GALEAZZI, M. et al. A phase IB clinical trial with Dekavil (F8-IL10), an immunoregulatory 'armed antibody' for the treatment of rheumatoid arthritis, used in combination with methotrexate. **Isr Med Assoc J**, v. 16, n. 10, p. 666, 2014.
- GIRDLER, Steven J. et al. Altering the natural history of rheumatoid arthritis: The role of immunotherapy and biologics in orthopaedic care. **Journal of Orthopaedics**, 2019.
- GLOCKER, Erik-Oliver et al. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1246, n. 1, p. 102-107, 2011.
- GOELDNER, Isabela et al. Artrite reumatoide: uma visão atual. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 5, p. 495-503, 2011.
- GOES, Ana Claudia Janiszewski et al. Artrite reumatoide e qualidade do sono. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 4, p. 294-298, 2017.
- HAZES, J., LUIME, J. A epidemiologia da artrite inflamatória precoce. **Nat Rev Rheumatol** 7, 381–390 (2011) doi: 10.1038 / nrrheum.2011.78
- HOLM BE, Sandhu N, Tronstrøm J, Lydolph M, Trier NH, Houen G. Species cross-reactivity of rheumatoid factors and implications for immunoassays. **Scand J Clin Lab Invest**. 2015; 75: 51–63
- HONG, Jeong-Im; PARK, In Young; KIM, Hyun Ah. Understanding the Molecular Mechanisms Underlying the Pathogenesis of Arthritis Pain Using Animal Models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, p. 533, 2020.
- HU, Yang et al. Long-term dietary quality and risk of developing rheumatoid arthritis in women. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 76, n. 8, p. 1357-1364, 2017.
- IMBODEN, John B.; STONE, John H. CURRENT: Reumatologia-: Diagnóstico e Tratamento. **AMGH Editora**, 2014.
- KANG, Jie et al. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 610-617, 2010.
- KANG, Jie et al. Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 152-157, 2011.
- KASYAPA, C.S.; STENTZ, C.L.; DAVEY, M.P.; CARR, D.W. Regulation of IL-15- stimulated TNF-a production by rolipram. **J. Immunol.**, v.163, p. 2836-2843, 1999.

- KEVIN D. Deane, M. Kristen Demoruelle, Lindsay B. Kelmenson, Kristine A. Kuhn, Jill M. Norris, V. Michael Holers Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis Best Pract **Res Clin Rheumatol** (2017)
- KOENDERS, M. I., & VAN DEN BERG, W. B. (2010). Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Are T helper 17 cells really pathogenic in autoimmunity?. *Clinical & Experimental Immunology*, 159(2), 131-136.
- KOLLIAS, George et al. Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 70, n. 8, p. 1357-1362, 2011.
- KÜHN, Ralf et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, v. 75, n. 2, p. 263-274, 1993.
- LEE, Seung-Joo et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.
- LIU, Ting et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2017.
- MCINNES IB, SCHETT G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **N Engl J Med** 2011;365(23): 2205-19
- MEDEIROS, Nayara I. et al. IL-10 and TGF- β unbalanced levels in neutrophils contribute to increase inflammatory cytokine expression in childhood obesity. **European journal of nutrition**, v. 57, n. 7, p. 2421-2430, 2018.
- MENEZES, EMDS, Torres, AT e Sabaa Srur, AU (2008). Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. *Acta amazônica*, 38 (2), 311-316.
- MILLS, Kingston HG. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 11, p. 841-855, 2004.
- MOTA, Licia Maria Henrique da; LAURINDO, Ieda Maria Magalhães; SANTOS NETO, Leopoldo Luiz dos. Artrite reumatoide inicial: conceitos. 2010.
- NIELEN, Markus MJ et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 50, n. 2, p. 380-386, 2004.
- NOACK, Mélissa; MIOSSEC, Pierre. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. **Autoimmunity reviews**, v. 13, n. 6, p. 668-677, 2014
- O'GARRA, Anne; ROBINSON, Douglas. Development and function of T helper 1 cells. In: **Advances in immunology**. Academic Press, 2004. p. 133-162.
- PALA, Daniela. Efeito do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) sobre o estado oxidativo e a influência nas transferências de lípidos para HDL em mulheres. 2016. 120 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.

- PARK, H., LI, Z., YANG, X. O., CHANG, S. H., NURIEVA, R., WANG, Y. H., ... & DONG, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology*, 6(11), 1133-1141.
- PAZ, Mário et al. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. *Food Chemistry*, v. 172, p. 462-468,
- PRETE, Marcella et al. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: an update. *Autoimmunity reviews*, v. 11, n. 2, p. 123-131, 2011.
- RASKIN, Ilya et al. Plants and human health in the twenty-first century. **TRENDS in Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002.
- RAYCHAUDHURI, Soumya et al. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nature genetics*, v. 44, n. 3, p. 291-296, 2012.
- RAZA, K., FALCIANI, F., CURNOW, S. J., ROSS, E. J., LEE, C. Y., AKBAR, A. N., ... & SALMON, M. (2005). Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis research & therapy*, 7(4), R784
- REYNISDOTTIR G, Olsen H, Joshua V, et al. Signs of immuneactivation and local inflammation are present in the bronchial tissue of patients with untreated early rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis** 2015; published online Nov 3.
- ROJAS, Mauricio et al. TNF- α and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent Mycobacterium tuberculosis in murine macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 162, n. 10, p. 6122-6131, 1999.
- RUDENSKY AY. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev.* 2011 May;241(1):260-8.
- RUDENSKY, Alexander Y. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunological reviews*, v. 241, n. 1, p. 260-268, 2011.
- SAKAGUCHI S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005; 6(4):345-52.
- SAKAGUCHI, Shimon et al. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, v. 133, n. 5, p. 775-787, 2008.
- SARIYILDIZ, Mustafa Akif et al. Sleep quality in rheumatoid arthritis: relationship between the disease severity, depression, functional status and the quality of life. *Journal of clinical medicine research*, v. 6, n. 1, p. 44, 2014.
- SAXENA, Ankit et al. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine*, v. 74, n. 1, p. 27-34, 2015.
- SCHERER, Hans Ulrich; HÄUPL, Thomas; BURMESTER, Gerd R. The etiology of rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*, p. 102400, 2020.

- SCHREIBER, Stefan et al. Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 119, n. 6, p. 1461-1472, 2000.
- SCHWAGER, Kathrin et al. Preclinical characterization of DEKAVIL (F8-IL10), a novel clinical-stage immunocytokine which inhibits the progression of collagen-induced arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 11, n. 5, p. R142, 2009.
- SILVA, Carla Teixeira. Artrite reumatoide experimental: o papel do consumo da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) no estresse oxidativo e na inflamação. 2018. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.
- SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. *Lancet Lond Engl* 388: 2023–2038. 2016.
- SMOLEN, J., Aletaha, D., Barton, A. *et al.* Rheumatoid arthritis. **Nat Rev Dis Primers** 4, 18001 (2018).
- SOKKA, Tuulikki et al. Work disability in early rheumatoid arthritis. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 21, n. 5; SUPP 31, p. S71-S74, 2003.
- SOLBRITT RANTAPÄÄ-DAHLQVIST, Ben A.W. De Jong, Ewa Berglin, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, 48 (2003), pp. 2741-2749
- TAKEUCHI, Yusuke; HIROTA, Keiji; SAKAGUCHI, Shimon. Impaired T cell receptor signaling and development of T cell-mediated autoimmune arthritis. **Immunological Reviews**, v. 294, n. 1, p. 164-176, 2020..
- TARNER, Ingo H. et al. The different stages of synovitis: acute vs chronic, early vs late and non-erosive vs erosive. **Best practice & research Clinical rheumatology**, v. 19, n. 1, p. 19-35, 2005.
- TILG, H. et al. Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon γ . Commentary. *Gut*, v. 50, n. 2, p. 146-147, 2002.
- VAN DELFT, M. A., & HUIZINGA, T. W. (2020). An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, 102392.
- VAN DEN BERG, W. B. et al. Electrical charge of the antigen determines intraarticular antigen handling and chronicity of arthritis in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 74, n. 5, p. 1850-1859, 1984.
- VAN DEN BERG, Wim B. Lessons from animal models of arthritis over the past decade. **Arthritis research & therapy**, v. 11, n. 5, p. 250, 2009.
- VANDER CRUYSSSEN, Bert et al. Prediction models for rheumatoid arthritis during diagnostic investigation: evaluation of combinations of rheumatoid factor, anti-citrullinated

- protein/peptide antibodies and the human leucocyte antigen-shared epitope. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 66, n. 3, p. 364-369, 2007.
- VEIGA, Mariana et al. Impact of plant extracts upon human health: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 5, p. 873-886, 2020.
- VIGNALI, Dario AA; COLLISON, Lauren W.; WORKMAN, Creg J. How regulatory T cells work. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 7, p. 523-532, 2008.
- VILLENEUVE, Edith; NAM, Jackie; EMERY, Paul. Critério de classificação da artrite reumatoide ACR-EULAR 2010. **Rev. Bras. Reumatol**, v. 50, n. 5, 2010.
- WANG, Dan et al. Mechanisms of lung disease development in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 15, n. 10, p. 581-596, 2019.
- WATAD, A., & AMITAL, H. (2016). ACPAs are much more than diagnostic autoantibodies. **Rambam Maimonides medical journal**, 7(4).
- WEYAND, Cornelia M.; GORONZY, Jörg J. T-cell-targeted therapies in rheumatoid arthritis. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 2, n. 4, p. 201-210, 2006.
- WILLIS, Van C. et al. Sputum autoantibodies in patients with established rheumatoid arthritis and subjects at risk of future clinically apparent disease. **Arthritis & Rheumatism**, v. 65, n. 10, p. 2545-2554, 2013.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **WHO traditional medicine strategy: 2014-2023**. World Health Organization, 2013.
- XIE C, Kang J, Burris R, Ferguson ME, Schauss AG, Nagarajan S, Wu X. Acai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. **Atherosclerosis** 2011; 216: 327–333
- XIE, Chenghui et al. The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF- κ B activation and MAPK pathway. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 23, n. 9, p. 1184-1191, 2012.
- YAGI H, Nomura T, Nakamura K, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. **Int Immunol**. 2004; 16(11):1643-56.
- YANG, P., QIAN, F. Y., ZHANG, M. F., XU, A. L., WANG, X., JIANG, B. P., & ZHOU, L. L. (2019). Th17 cell pathogenicity and plasticity in rheumatoid arthritis. **Journal of leukocyte biology**, 106(6), 1233-1240.
- YOON, Chong-Hyeon et al. Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **Joint Bone Spine**, v. 80, n. 3, p. 274-279, 2013.
- ZURITA-TURK, Meritxell et al. Attenuation of intestinal inflammation in IL-10 deficient mice by a plasmid carrying Lactococcus lactis strain. **BMC biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2020.

ANEXO



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Marro do Cruzeiro - ICES-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone: (31) 3559-1368. Fax: (31) 3559-1370
E-mail: ceua@ufop.edu.br



OFÍCIO CEUA N.º 005/2017, de 27 de Janeiro de 2017

**Ilustríssimo(a) Senhor(a)
Professor(a) Doutor(a) Joana Ferreira Amaral
DENCs/ENUT**

Senhor(a) Pesquisador(a),

Estamos enviando o certificado de aprovação a partir do adendo do protocolo n.º 2016/38, intitulado "**Efeito do consumo da polpa açai (*Euterpe oleracea* Mart.) e de dieta isenta de antígenos protéicos sobre parâmetros inflamatórios e do estado oxidativo na artrite reumatoide induzida por antígeno (mBSA) em camundongos C57BL/6.**".

2. Atendendo ao art. 6.º, IX, da Resolução Normativa CONCEA n.º 1, de 09.07.2010, solicitamos que encaminhe a CEUA/UFOP o relatório final do projeto, após executá-lo, conforme modelo do site da CEUA.

Atenciosamente,

**Prof.ª Dr.ª Lenice Kappes Becker
Coordenadora da CEUA/UFOP.**