

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**UTILIZAÇÃO DO ALCALOIDE MONTANINA EXTRAÍDO DA  
RHODOPHIALA BIFIDA COMO NOVA ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA  
PARA ARTRITE REUMATOIDE**

MIRIAN FARINON

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**UTILIZAÇÃO DO ALCALOIDE MONTANINA EXTRAÍDO DA  
RHODOPHIALA BIFIDA COMO NOVA ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA  
PARA ARTRITE REUMATOIDE**

MIRIAN FARINON

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier  
Co-orientadora: Dra. Patricia Gnieslaw de  
Oliveira

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre em  
Medicina: Ciências Médicas, da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, Programa de  
Pós-Graduação em Medicina: Ciências  
Médicas.

Porto Alegre

2015

Farinon, Mirian

Utilização do alcaloide montanina extraído da Rhodophiala bifida como nova estratégia terapêutica para artrite reumatoide / Mirian Farinon. -- 2015. 74 f.

Orientador: Ricardo Machado Xavier.

Coorientadora: Patricia Gnieslaw de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Artrite reumatoide. 2. Artrite experimental. 3. Fibroblastos sinoviais. 4. Alcaloide de Amarilidáceas. 5. Montanina. I. Xavier, Ricardo Machado, orient. II. de Oliveira, Patricia Gnieslaw, coorient. III. Título.

*BANCA EXAMINADORA*

*Profa. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres*

*Prof. Dr. Odirlei André Monticelo*

*Prof. Dr. Rafael Mendonça da Silva Chakr*

*Prof. Dr. Jose Carlos Alves-Filho*

“ ...na estrada, em algum lugar, a pérola me  
seria ofertada. ” (Jack Kerouac)

## AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de mestrado que possibilitou a realização desse trabalho de forma plena.

A todos do Centro de Pesquisa Experimental (CPE), Serviço de Patologia Experimental, Unidade de Experimentação Animal (UEA) e Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do HCPA que participaram no desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Ricardo M. Xavier pela orientação, apoio, paciência, aprendizado e pela referência como profissional e ser humano.

À Patrícia por ter me recebido em 2012 no laboratório e me orientado desde então. Muito obrigada pela confiança depositada, pelas cobranças necessárias, apoio, ensinamentos e principalmente, pelo carinho e amizade!

A todos os colegas do Laboratório de Doenças Autoimunes – Eduarda, Jordana, Lidiane, Andreise, Mayara, Mônica, Paulo, Priscila, Rafaela, Renata, Vanessa e Vivian – pela amizade, descontração, aprendizado e ajuda. Agradecimento especial à Vanessa pela parceria e apoio incondicionais em todos os momentos e à Renata por aguentar minha (des)orientação e se sair bem.

Às grandes amigas Luiza, Rafa, Carla, Bruna, Vanessa e Fernanda pela amizade especial, compreensão e parceria nos bons e maus momentos.

Aos meus irmãos, Maíra e João, pela amizade, convivência, companheirismo e apoio eternos.

À vó Clarinda pelo exemplo de pensamento positivo e vitalidade.

Ao alicerce de tudo, meus pais Valdemir e Lenice, por proporcionarem todos os recursos para que eu pudesse chegar até aqui. Muito obrigada pelo exemplo, incentivo, carinho e apoio! Um dos objetivos sempre foi e será agradecer à altura.

## RESUMO

**Base teórica:** A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica onde a inflamação crônica da sinóvia articular e a subsequente erosão óssea e da cartilagem resultam em destruição articular, dor e incapacidade funcional. Apesar dos recentes progressos no tratamento da AR, estes ainda apresentam limitações e significativos efeitos adversos, salientando a necessidade de novas estratégias terapêuticas. Plantas da família das Amarilidáceas apresentam em seus bulbos um conjunto de alcaloides muito característicos e exclusivos com atividades farmacológicas, tais como atividade antiviral, anti-inflamatória e atividade anticolinérgica. A montanina é um alcaloide isolado da *Rhodophiala bifida*, uma planta da família das amarilidáceas utilizada na medicina popular, mas nunca antes testada como terapia para doenças inflamatórias.

**Objetivo:** Avaliar o efeito da montanina como uma terapia anti-inflamatória *in vivo* em dois modelos de artrite e *in vitro* sobre a proliferação de linfócitos e sobre a invasão de fibroblastos sinoviais (FLS).

**Métodos:** Artrite induzida por antígeno (AIA) foi realizada em camundongos Balb/C com albumina bovina sérica metilada e a nocicepção e a migração de leucócitos para a articulação do joelho foram os parâmetros avaliados. Artrite induzida por colágeno (CIA) foi realizada em camundongos DBA/1J e o desenvolvimento e severidade da artrite foi avaliado através de escore clínico, nocicepção articular e escore histológico. Montanina foi administrada via intraperitoneal, duas vezes ao dia. A proliferação de linfócitos estimulados por concanavalina A (conA) foi realizada pelo método de MTT e invasão de FLS em 24 horas foi avaliada em um sistema de insertos de Matrigel.

**Resultados:** A administração de montanina diminuiu a migração articular de leucócitos ( $p < 0,001$ ) e a nocicepção ( $p < 0,01$ ) em camundongos com AIA. Em camundongos com CIA, o tratamento com montanina reduziu a severidade da artrite e o dano articular avaliado pelos escores clínico ( $p < 0,01$ ) e histológico ( $p < 0,05$ ) e melhorou a nocicepção articular ( $p < 0,05$ ), sem causar nenhum dano hepático. Além disso, montanina inibiu *in vitro* a proliferação de linfócitos estimulados com conA ( $p < 0,01$ ) e diminuiu a invasão de FLS ( $p < 0,05$ ) em 54%, com uma ação independente de citotoxicidade.

**Conclusão:** Esses resultados indicam que a montanina pode ser explorada para se tornar um possível fármaco para o tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes, como a AR.

**Palavras chave:** Artrite reumatoide, inflamação, fibroblastos sinoviais, artrite induzida por antígeno, artrite induzida por colágeno, alcaloides de amarilidáceas, montanina.



## ABSTRACT

**Background:** Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune and systemic disease where the chronic inflammation of articular synovia and the subsequent bone and cartilage erosion results in joint destruction, pain and functional disability. Despite recent progress in RA treatments, its still have limitations and significant side effects, emphasizing the need of new therapeutic strategies. Amaryllidaceae plants presenting at its bulbs a set of very characteristics and exclusives alkaloids with pharmacological activities such as antiviral, anti-inflammatory and anticholinergic activity. Montanine is an alkaloid isolated from the *Rhodophiala bifida*, an Amaryllidaceae plant used in alternative medicine but never before tested as a therapy for inflammatory diseases.

**Objective:** To evaluate the effect of montanine as an *in vivo* anti-inflammatory therapy in two arthritis models and *in vitro* on lymphocytes proliferation and fibroblast-like synoviocytes (FLS) invasion.

**Methods:** Antigen-induced arthritis (AIA) was performed in Balb/C mice with methylated bovine serum albumin and nociception and leukocytes migration into the knee joint were evaluated. Collagen-induced arthritis (CIA) was performed in DBA/1J mice and arthritis development and severity were assessed by clinical scoring, articular nociception and histological scoring. Montanine was administered intraperitoneally twice a day. Lymphocyte proliferation stimulated by concanavalin A in 48 hours was performed with MTT assay and FLS invasion in 24 hours was assayed in a Matrigel-coated transwell system.

**Results:** Administration of montanine decreased leukocyte articular migration ( $p < 0.001$ ) and nociception ( $p < 0.01$ ) in mice with AIA. In mice with CIA, treatment with montanine reduced severity of arthritis and joint damage assessed by clinical ( $p < 0.01$ ) and histological score ( $p < 0.05$ ) and ameliorates articular nociception ( $p < 0.05$ ), without causing any hepatic damage. Moreover, montanine inhibited *in vitro* lymphocyte proliferation stimulated with ConA ( $p < 0.01$ ) and decreased FLS invasion by 54% ( $p < 0.05$ ), with an action independent of cytotoxicity.

**Conclusion:** These findings suggest that montanine can be explored to become a possible medicament to treat inflammatory and autoimmune diseases such as arthritis.

**Key Words:** Rheumatoid arthritis, inflammation, fibroblast-like synoviocytes, antigen-induced arthritis, collagen-induced arthritis, Amaryllidaceae alkaloid, montanine.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Alterações articulares na AR.....	14
<b>Figura 2.</b> Fisiopatogenia da AR.....	16
<b>Figura 3.</b> Esquema do protocolo experimental agudo de AIA.....	20
<b>Figura 4.</b> Esquema do protocolo experimental de CIA.....	21
<b>Figura 5.</b> Esquema da biossíntese dos alcaloides provenientes de amarilidáceas....	24
<b>Figura 6.</b> Estrutura química da montanina.....	25

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Critérios de classificação para artrite reumatoide.....	13
--	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Artrite induzida por adjuvante
ACPA	<i>Anti-citrullinated protein antibody</i> (Anticorpos anti-proteínas citrulinadas)
AIA	<i>Antigen-induced arthritis</i> (Artrite induzida por antígeno)
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
AR	Artrite reumatoide
BCR	<i>B-cell receptor</i> (Receptor de célula B)
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
CFA	<i>Complete Freund's adjuvant</i> (Adjuvante completo de Freund)
CIA	<i>Collagen-induced arthritis</i> (Artrite induzida por colágeno)
CII	Colágeno bovino do tipo II
ConA	Concanavalina A
COX	Ciclo-oxigenase
DMCDs	Drogas antirreumáticas modificadoras da doença
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FLS	<i>Fibroblast-like synoviocytes</i> (Fibroblastos sinoviais)
FR	Fator Reumatoide
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (Antígeno leucocitário humano)
IA	Intra-articular
ID	Intradérmica
IFA	<i>Incomplete Freund's adjuvant</i> (Adjuvant incompleto de Freund)
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> (Óxido nítrico-sintase induzível)
IP	Intraperitoneal
JAK	Janus kinase
LD50	Dose letal mediana
LPS	Lipopolissacarídeo
mBSA	<i>Methylated bovine serum albumin</i> (Albumina bovina sérica metilada)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
MMPs	Metaloproteinases
MPO	Mieloperoxidase
MS	<i>Mass spectrometry</i> (Espectrometria de massas)

NF-kB	<i>Nuclear factor kB</i> (Fator nuclear kB)
NO	<i>Nitric oxide</i> (Óxido nítrico)
NSAIDs	<i>Nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i> (Drogas anti-inflamatórias não-esteroidais)
PGE2	Prostaglandina E2
PIA	<i>Pristane-induced arthritis</i> (Artrite induzida por pristane)
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kB ligand</i> (Ligante do receptor ativador do fator nuclear kB)
SC	Subcutânea
Th1	Célula T auxiliar do tipo 1
Th17	Célula T auxiliar do tipo 17
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (Receptor do tipo Toll)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral)
UV	Ultravioleta

## INDICE

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1. ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES .....	12
2.2. ARTRITE REUMATOIDE .....	12
2.2.1. FISIOPATOGENIA DA ARTRITE REUMATOIDE .....	14
2.2.2. TRATAMENTO NA ARTRITE REUMATOIDE .....	17
2.3. MODELOS ANIMAIS DE ARTRITE .....	18
2.3.1. ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO (AIA) .....	19
2.3.2. ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO (CIA) .....	21
2.4. AMARILIDÁCEAS .....	22
2.4.1. RHODOPHIALA BIFIDA .....	22
2.5. ALCALOIDES ISOLADOS DE AMARILIDÁCEAS.....	23
2.5.1. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS ALCALOIDES ISOLADOS DE AMARILIDÁCEAS .....	24
2.6. MONTANINA.....	25
3. MARCO TEÓRICO.....	27
4. JUSTIFICATIVA.....	28
5. OBJETIVOS .....	29
8.1. OBJETIVO PRIMÁRIO.....	29
8.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS .....	29
6. REFERÊNCIAS.....	30
7. ARTIGO .....	35
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	64
10. ANEXOS.....	65
ANEXO I – FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL DE AIA .....	65
ANEXO II – FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL DE CIA COM PROTOCOLO DE TRATAMENTO PRÉ-CLÍNICO.....	66
ANEXO III – FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL DE CIA COM PROTOCOLO DE TRATAMENTO CLÍNICO .....	67
ANEXO IV – FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL DA AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> SOBRE LINFÓCITOS.....	68
ANEXO V – FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL DA AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> SOBRE FLS .....	69

## 1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença poliarticular simétrica e crônica, caracterizada por inflamação sinovial persistente, produção de autoanticorpos, destruição óssea e de cartilagem, resultando em incapacidade funcional (1). Atinge 0,5-1% da população adulta mundial (2) e 0,46% da população brasileira (3). A doença é três vezes mais frequente nas mulheres e sua incidência aumenta com a idade, atingindo um pico na quinta década de vida (4). Constitui um importante problema de saúde pública e sociocultural. De 20-40% dos pacientes com AR tornam-se incapazes para o trabalho em até dois anos após o diagnóstico, com um aumento na porcentagem para 40-80% em até 20 anos após o diagnóstico (5).

Embora tenha etiologia ainda desconhecida, sabe-se que tipos celulares do sistema imune inato e do adaptativo estão envolvidos nos mecanismos que iniciam a patogênese da doença (6). O evento inicial é um processo inflamatório na membrana sinovial, decorrente primeiramente da infiltração e acúmulo de leucócitos, principalmente neutrófilos e, posteriormente da infiltração e/ou ativação local de macrófagos, células T (principalmente CD4+) e B, plasmócitos, mastócitos e células dendríticas, que comumente formam estruturas parecidas com folículos linfoides. Os sinoviócitos (macrófagos e fibroblastos sinoviais) se tornam hipertróficos e aumentam sua proliferação, gerando hiperplasia da membrana sinovial. A membrana sinovial hiperplásica, juntamente com o infiltrado celular e a neoangiogênese, formam um tecido altamente invasivo conhecido como *pannus*, que invade o osso e degrada a cartilagem, levando à destruição progressiva da articulação (7, 8).

Os avanços na compreensão da fisiopatogênese da AR permitiram o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas nos últimos anos (9) e proporcionaram aos pacientes, principalmente aqueles com o espectro mais grave da doença, uma restauração significativa de sua qualidade de vida. No entanto, apesar dos significativos efeitos adversos das terapias atualmente disponíveis (2), poucos pacientes conseguem atingir a remissão completa da doença (10). Esse quadro salienta a necessidade e importância do estudo de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da AR.

Dentro da vasta biodiversidade das plantas, a família Amaryllidaceae se mostra bastante promissora como uma ferramenta terapêutica para doenças humanas e é usada na medicina popular de países em desenvolvimento como agente antiparasitário, anti-inflamatório e antirreumático (11-14). A maioria dos compostos encontrados nas amarilidáceas são alcaloides específicos e especiais (11), únicos desta família de plantas (15), e parecem ser os responsáveis por seu potencial medicinal.

*Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub pertence a essa família de plantas e é uma espécie nativa do nordeste da Argentina, ocorrendo também no Uruguai e no Brasil (16). Uma característica marcante dessa planta é a presença massiva em seus bulbos do alcaloide montanina (17). Ainda pouco estudado, o alcaloide montanina apresenta atividades psicofarmacológicas, incluindo efeitos ansiolíticos, antidepressivos e anticonvulsivos (18), ação inibitória da atividade da enzima acetilcolinesterase (19), efeito citotóxico em algumas linhagens de células humanas cancerígenas (20) e um grande potencial antimicrobiano (17). As características estruturais e o potencial farmacológico diversificado indicam que o alcaloide montanina pode apresentar um efeito terapêutico interessante em condições inflamatórias.

Dentro deste contexto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a montanina, um alcaloide isolado do bulbo da *Rhodophiala bifida*, como uma estratégia terapêutica para a artrite reumatoide. Para isso, foi realizada a avaliação da ação anti-inflamatória da montanina em dois modelos murinos de artrite e a avaliação da ação imunomoduladora sobre a população de leucócitos circulantes de camundongos saudáveis, sobre a proliferação de linfócitos e, por fim, sobre a invasão de fibroblastos sinoviais em cultura. Todas essas análises visaram a realização de provas de conceito para dar suporte e embasamento para uma possível progressão para estudos clínicos com o alcaloide, calcando a base de um estudo translacional.



## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES**

Esta revisão da literatura está focada nos aspectos relacionados aos alcaloides isolados das plantas amarilidáceas, especialmente a montanina e seu uso potencial como um anti-inflamatório e, especificamente, para o tratamento da artrite reumatoide. A estratégia de busca envolveu as bases de dados PubMed, SciELO e repositório digital LUME/UFRGS no período de 1977 e 2015. Foram realizadas buscas através dos termos “rheumatoid arthritis”, “arthritis”, “inflammation”, “collagen-induced arthritis”, “antigen-induced arthritis”, “lymphocytes”, “fibroblast-like synoviocytes” “montanine”, “alkaloid”, “rhodophiala bífida”, “amaryllidaceae” e suas combinações. A partir desta busca, foram utilizados 103 artigos e 1 dissertação de mestrado para a redação da presente dissertação.

### **2.2. ARTRITE REUMATOIDE**

A artrite reumatoide (AR) é uma doença poliarticular simétrica e crônica, caracterizada por inflamação sinovial persistente, produção de autoanticorpos, destruição óssea e de cartilagem, resultando em incapacidade funcional (1). Atinge 0,5-1% da população adulta mundial (2) e 0,46% da população brasileira (3). A doença é três vezes mais frequente nas mulheres e sua incidência aumenta com a idade, atingindo um pico na quinta década de vida (4).

Devido a sua cronicidade, a doença constitui um importante problema de saúde pública gerando altos custos de tratamento (21), bem como um importante fator sociocultural. De 20-40% dos pacientes com AR tornam-se incapazes para o trabalho em até dois anos após o diagnóstico, com um aumento na porcentagem para 40-80% em até 20 anos pós-diagnóstico (5). Adicionalmente, pacientes com AR possuem um risco aumentado de desenvolver certas manifestações extra articulares ou comorbidades (22), como doenças cardiovasculares (23), linfoma (24), doença pulmonar (25), vasculite (26), osteoporose (27), anemia (28), doenças oculares (29) e nódulos (28). Essas manifestações agravam o quadro da doença, levando a um aumento na incapacidade funcional e a uma diminuição na qualidade de vida dos pacientes, além de aumentar a mortalidade (30).

Existe uma grande heterogeneidade no desenvolvimento e prognóstico da doença, com alta variabilidade entre pacientes em relação ao ritmo de progressão da inflamação articular, desenvolvimento de manifestações extra articulares e resposta a tratamentos (31). O diagnóstico é feito através dos critérios estabelecidos em 2010 pelo Colégio Americano

de Reumatologia juntamente com a Liga Europeia Contra o Reumatismo (32), e combina extensão do envolvimento articular, presença de autoanticorpos, resposta de fase aguda e duração dos sintomas para a classificação dos pacientes (Tabela 1).

**Tabela 1. Critérios de classificação para artrite reumatoide. (Adaptado de Aletaha et al. (32)).**

---

1. Envolvimento articular (0-5)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 articulação média a grande (0)</li> <li>• 2-10 articulações médias a grande (1)</li> <li>• 1-3 articulações pequenas (não contando articulações grandes) (2)</li> <li>• 4-10 articulações pequenas (não contando articulações grandes) (3)</li> <li>• &gt; 10 articulações (pelo menos uma articulação pequena) (5)</li> </ul>
2. Sorologia (0-3)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fator reumatoide (FR) e Anticorpo contra antígenos citrulinados (ACPA) negativo (0)</li> <li>• FR e/ou ACPA fracamente positivos (2)</li> <li>• FR e/ou ACPA fortemente positivos (3)</li> </ul>
3. Reagentes de fase aguda (0-1)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína C reativa e taxa de sedimentação eritrocitária normal (0)</li> <li>• Proteína C reativa <i>ou</i> taxa de sedimentação eritrocitária anormal (1)</li> </ul>
4. Duração dos sintomas (0-1)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt; 6 semanas (0)</li> <li>• 6 semanas ou mais (1)</li> </ul>

---

Ponto de corte para artrite reumatoide:  $\geq 6$  pontos.

---

Embora tenha etiologia ainda desconhecida, sabe-se que uma tríade de fatores – predisposição genética, auto anticorpos e fatores ambientais – está relacionada à quebra da autotolerância e desenvolvimento da AR (33). A associação de predisposição mais bem estabelecida é com os alelos do antígeno leucocitário humano (HLA)-DRB1, que contém um motivo comum, denominado de epítipo compartilhado (2). A localização molecular desse epítipo sugere um papel na apresentação de peptídeos possivelmente artritogênicos (1), ou uma predisposição na seleção do repertório das células T (7).

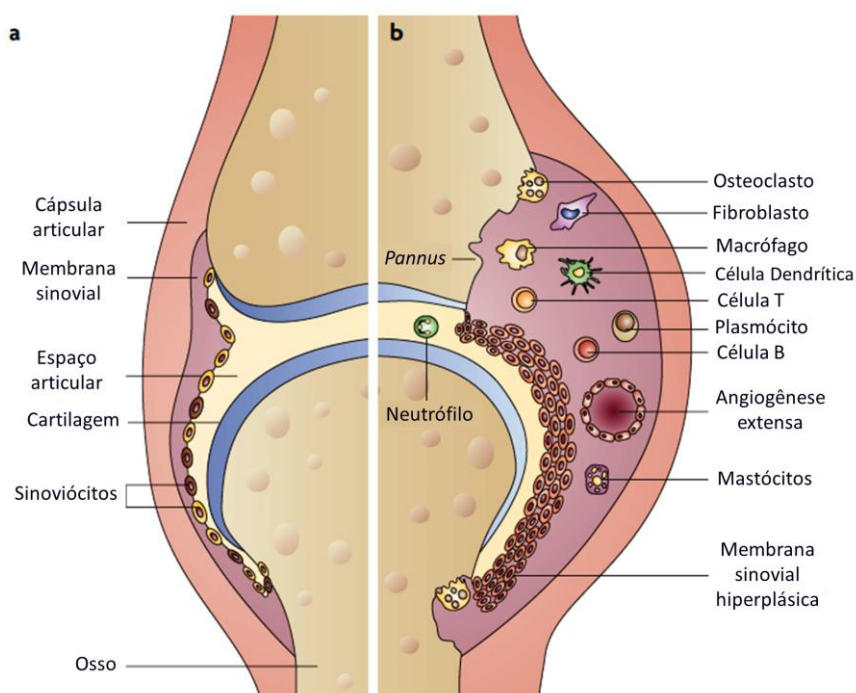
Dois tipos de autoanticorpos são importantes biomarcadores da doença. O fator reumatoide (FR) é o autoanticorpo clássico, direcionado contra a porção Fc da imunoglobulina G (33). Os anticorpos anti-proteínas/peptídeos citrulinados (ACPA) aparecem como um marcador mais específico para o diagnóstico da doença (34). A citrulinização, uma modificação pós-translacional que converte resíduos de arginina em

citrulina (33), permite que antígenos se encaixem nos alelos de HLA que possuem o epitopo compartilhado, gerando a formação de anticorpos contra esses antígenos citrulinados, que estão relacionados a um pior prognóstico da AR (2).

O estudo da influência de fatores ambientais no desenvolvimento da AR é relativamente escasso. O fumo é o principal e mais bem estabelecido fator de risco ambiental (35-37), mas sua associação é específica a pacientes com FR e/ou ACPA positivos (38). Um estudo de 2006 estabeleceu uma relação dose-dependente entre a extensão do consumo de cigarros e a frequência dos níveis elevados de ACPA no início da AR, bem como um aumento de 21 vezes no risco relativo de desenvolvimento da doença em fumantes portadores de duas cópias do gene HLA-DRB1 em relação a não fumantes sem risco genético (38). Dentre outros fatores ambientais associados com maior risco de desenvolvimento da doença estão alguns agentes infecciosos (como o Epstein-Barr vírus e citomegalovirus), doença periodontal, influência hormonal (estrogênios), poluição do ar, exposição a sílica e baixo nível socioeconômico (2, 39-43).

### 2.2.1. FISIOPATOGENIA DA ARTRITE REUMATOIDE

Embora, conforme discutido acima, a etiologia da AR ainda não esteja devidamente esclarecida, sabe-se que tipos celulares do sistema imune inato e do adaptativo estão envolvidos nos mecanismos que iniciam a patogênese da doença (6) (Figura 1).



**Figura 1.** Alterações articulares na AR.

(a) Articulação saudável; (b) Articulação doente. Adaptado de Smolen et al. (9).

O evento inicial é um processo inflamatório na membrana sinovial, decorrente primeiramente da infiltração e acúmulo de leucócitos, principalmente neutrófilos atraídos por moléculas de adesão e quimiocinas expressas no endotélio de microvasos da sinóvia e, posteriormente da infiltração e/ou ativação local de macrófagos, células T (principalmente CD4+) e B, plasmócitos, mastócitos e células dendríticas, que comumente formam estruturas parecidas com folículos linfóides (7, 8).

Os sinoviócitos (macrófagos e fibroblastos sinoviais) se tornam hipertróficos e aumentam sua proliferação, gerando hiperplasia da membrana sinovial. A membrana sinovial hiperplásica, juntamente com o infiltrado celular e a neoangiogênese, formam um tecido altamente invasivo conhecido como *pannus*, que invade o osso e degrada a cartilagem, levando à destruição progressiva da articulação (7, 8).

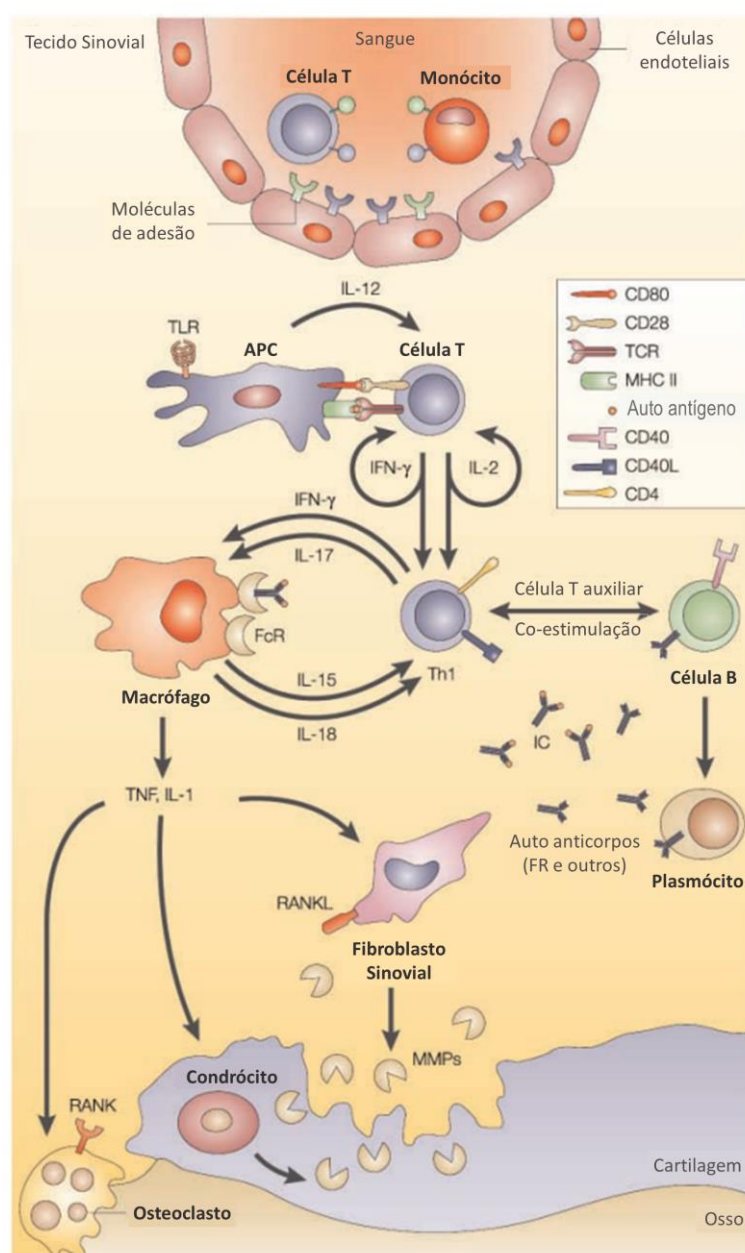
Um grande número de células está envolvido na fisiopatogenia da AR (Figura 2). Os neutrófilos contribuem para a inflamação da membrana sinovial através da síntese de prostaglandinas, proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de secretarem fator de necrose tumoral (TNF) (6). Células B são precursoras de plasmócitos secretores de autoanticorpos, processam e apresentam antígenos promovendo a ativação de células T e secretam citocinas pro-inflamatórias, como interleucina (IL)-6 e TNF- $\alpha$  (44). Macrófagos liberam TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e metaloproteinases (MMPs), além de realizarem fagocitose e apresentação de antígenos (7).

Os fibroblastos sinoviais (FLS) em pacientes com AR assumem um fenótipo agressivo e tumoral, com inibição por contato diminuída, resistência à apoptose e migração aumentada. Essas células secretam MMPs, moléculas de adesão e o ligante do receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B (RANKL), que promove a diferenciação de osteoclastos, os quais promovem reabsorção óssea e dano ao osso subjacente à cartilagem articular (45). Adicionalmente, um estudo demonstrou que os FLS de pacientes com AR possuem a habilidade de migrar de uma articulação à outra, sugerindo como a poliartrite pode se desenvolver (46).

As células T CD4+ que produzem IL-2 e IFN- $\gamma$  apresentam uma polaridade de resposta Th1 (9). Embora a AR seja considerada uma doença mediada por células Th1, o papel das células Th17 no processo de destruição articular vem ganhando importância. Essas células produzem IL-17 e TNF- $\alpha$  que, sinergicamente, promovem a ativação de FLS e condrócitos (7).

Adicionalmente a inflamação e dano articular, ocorre o dano à cartilagem e ao osso subjacente à cartilagem articular. O dano da cartilagem ocorre através da secreção de MMPs

por macrófagos e FLS constituintes do *pannus* invasivo, que desorganiza a rede de colágeno do tipo II, alterando o conteúdo de glicosaminoglicanos e a retenção de água, levando a degeneração do tecido. Adicionalmente, o potencial de regeneração do tecido está limitado, uma vez que citocinas presentes no ambiente articular doente, principalmente IL-1 e IL-17, e espécies reativas de nitrogênio promovem a apoptose dos condrócitos, tipo celular que regula a formação e clivagem da matriz cartilaginosa (7, 8). O dano ao tecido ósseo é mediado pelos osteoclastos, que tem sua diferenciação ativada por RANKL, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-17 (47).



**Figura 2.** Fisiopatogenia da AR. Adaptado de Smolen et al. (9).

### 2.2.2. TRATAMENTO NA ARTRITE REUMATOIDE

O principal objetivo no tratamento da AR não é a cura da doença, mas sua remissão, com eliminação da inflamação articular ativa e deterioração funcional. De 10-50% dos pacientes com AR atingem a remissão. Outros objetivos de tratamento incluem a redução da dor, manutenção de função, controle das comorbidades e preservação de atividades recreativas e de trabalho (2).

O medicamento padrão no tratamento da doença é o metotrexato (padrão-ouro), que substituiu os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) como primeira linha de escolha no tratamento. Metotrexato é um fármaco antirreumático modificador do curso da doença (DMCD). Seu mecanismo de ação ainda não está bem estabelecido, porém, esse agente reduz o inchaço e dor articular, diminui marcadores de fase aguda (proteína C reativa e taxa de sedimentação eritrocitária) e limita o dano articular progressivo, melhorando a funcionalidade. Seus efeitos adversos variam desde náuseas até hepatotoxicidade e doenças pulmonares intersticiais (2, 48).

Avanços na compreensão da fisiopatogenia da AR, como o papel de citocinas pró-inflamatórias e o envolvimento de diferentes tipos celulares e suas moléculas de superfície no desenvolvimento da doença, permitiram o avanço de novas estratégias terapêuticas nos últimos anos (9) e, proporcionaram aos pacientes com AR, principalmente aqueles com o espectro mais grave da doença, uma restauração significativa na qualidade de vida. No entanto, apesar dos avanços, poucos conseguem atingir a remissão completa (10).

As moléculas desenvolvidas de forma altamente específica para atuar sobre um alvo chave no desenrolar da fisiopatogenia da doença são chamadas de agentes imunobiológicos. Dentre essa classe de fármacos, os inibidores de TNF foram os primeiros a serem desenvolvidos, com a primeira aprovação de uso pela FDA em 1998 com o etanercepte, e os mais bem estabelecidos na literatura. O infliximabe, o adalimumabe e o golimumab são anticorpos monoclonais anti-TNF, enquanto o etanercepte é uma proteína de fusão do receptor II de TNF. (2, 9, 49).

Outros alvos de agentes imunobiológicos são as células B e T. O rituximabe é um anticorpo monoclonal anti-CD20, uma molécula de superfície encontrada na célula B, e o abatacepte é um inibidor de sinais coestimulatórios de células T (48-52). Mais recentemente, houve a aprovação para o uso terapêutico do tocilizumabe, um anticorpo anti-receptor de IL-6 e do tofacitinibe, um inibidor da janus kinase (JAK) que é o primeiro fármaco da classe de pequenas moléculas inibidoras de proteínas de sinalização com biodisponibilidade oral para o tratamento da AR (48, 49, 53, 54).

Apesar da notável eficácia dos agentes imunobiológicos no tratamento da doença, essas terapias também apresentam significativos efeitos adversos (2). Dentre esses efeitos está o risco aumentado de desenvolvimento de tuberculose e de infecções bacterianas, virais e fúngicas (2, 49).

É importante salientar que a AR, assim como as outras doenças autoimunes reumáticas, é extremamente complexa e, deste modo, é improvável que o bloqueio de um único alvo terapêutico leve a uma melhora dramática do quadro clínico, a não ser que a molécula desempenhe um papel chave na patogenia ou participe de múltiplas vias da patogenia da doença (55), sendo comum a administração combinada de fármacos. Os agentes imunobiológicos geralmente são utilizados em terapia combinada com metotrexato ou algum outro DMCDs, que também podem ser combinados entre si (9).

O uso em longo prazo de glicocorticoides é evitado devido a seus efeitos adversos, porém pode-se usá-los por períodos curtos de tempo durante picos da doença para promover uma melhora rápida enquanto se aguarda a resposta aos DMCDs, que possuem um tempo de início de ação mais lento ou, ainda, de forma localizada, por meio de infiltração de glicocorticoides nas articulações (2).

Os últimos avanços nos estudos da fisiopatogenia e de novos agentes de tratamento para a AR levaram à ideia da existência de uma janela de oportunidade, como a oportunidade de se atingir o objetivo de remissão ou, ainda, a cura nos estágios iniciais da doença. Novos estudos devem seguir neste sentido (48, 56).

### **2.3. MODELOS ANIMAIS DE ARTRITE**

Modelos animais de doenças humanas são ferramentas importantes no estudo da patogenia dessas doenças, possibilitando um melhor entendimento dos mecanismos biológicos básicos e a identificação de novas vias e alvos moleculares envolvidos no curso e desenvolvimento da doença, além de permitir o estudo e avaliação de possíveis agentes terapêuticos e de prevenção (57).

Modelos animais realizados em roedores são mais comuns, devido ao custo mais baixo, a homogeneidade genética e, em camundongos, a possibilidade de se usar linhagens geneticamente modificadas (58). Esses modelos podem ser divididos em dois tipos: induzíveis e espontâneos. Dentre os modelos induzíveis, destacam-se aqueles induzidos por injeções de colágeno do tipo II (artrite induzida por colágeno (CIA)), por injeção de antígenos, geralmente a albumina bovina sérica metilada (mBSA) (artrite induzida por antígeno (AIA)) por injeção de óleos como o adjuvante de Freund (artrite induzida por adjuvante (AA)) e o pristane (artrite induzida por pristane (PIA)). Os modelos espontâneos

também podem ser considerados induzíveis, uma vez que o desenvolvimento da doença ocorre devido à introdução ou deleção de genes específicos em animais propensos à doença, e tem como exemplo o camundongo K/BxN, originado através do cruzamento da linhagem de camundongo transgênico para o receptor de célula T KRN com linhagens que expressam uma molécula de MHC de classe II suscetível. (58-60).

Dentro do estudo experimental da artrite, existe um bom número de modelos animais que em diferentes níveis mimetizam a artrite humana (57, 61). A seleção de um bom modelo para trabalho deve seguir alguns critérios importantes, dentre eles a capacidade de predição da eficácia em humanos dos agentes estudados; um protocolo experimental de fácil execução e reprodutibilidade, com um período total de execução relativamente curto e, por fim, apresentar uma patologia e/ou patogenia similar ao da doença humana (62).

Modelos animais de artrite são importantes ferramentas para identificar potenciais novos agentes terapêuticos e, uma vez que não existe um modelo universal que reflita todas as características articulares e sistêmicas da doença humana (57, 61, 63, 64), é importante realizar os estudos em mais de um modelo, englobando, assim, diferentes aspectos da patogenia humana. Em uma revisão da literatura, Hegen et al. (61) verificou que a maioria dos fármacos aprovados para o tratamento de AR partiram de dados sobre a eficácia terapêutica nos modelos de AIA e de CIA, indicando que esses dois modelos constituem um importante e bem sucedido paradigma de prova de conceito no desenvolvimento pré-clínico de fármacos.

Baseando-se nas informações acima apresentadas, no presente trabalho, foram utilizados os modelos de AIA e CIA para a avaliação da eficácia do tratamento alvo de estudo. Assim sendo, nas próximas seções ambos modelos serão melhor detalhados.

### **2.3.1. ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO (AIA)**

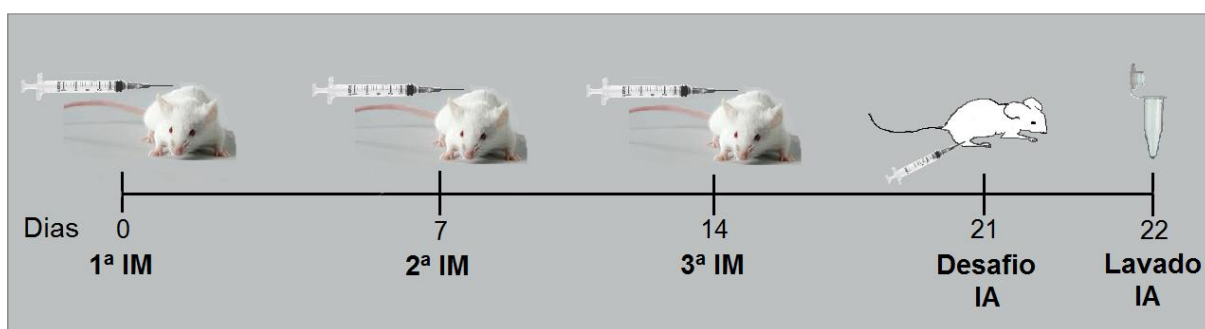
A artrite induzida por antígeno em murinos se apresenta como um bom modelo de escolha para o estudo da doença humana. Este modelo apresenta uma reprodutibilidade da duração e curso da inflamação e uma incidência próxima a 100% (65).

Além disso, esse modelo é uma artrite imunomediada dependente de células T e apresenta características semelhantes à artrite humana como infiltração de células inflamatórias, hiperplasia sinovial, neoangiogênese, formação de *pannus* e destruição da cartilagem (66). O antígeno de escolha costuma ser a mBSA, por ser uma molécula catiônica que é atraída à cartilagem negativamente carregada, ficando retida na articulação (62, 67).



De acordo com o protocolo experimental, inicialmente os animais são imunizados por injeção subcutânea de mBSA emulsificada em adjuvante completo de Freund (CFA), composto por óleo mineral e *Mycobacterium tuberculosis* inativado. A emulsificação com CFA promove a apresentação contínua do antígeno ao sistema imunológico, necessária para uma resposta imune forte e persistente. Adicionalmente, a presença de *M. tuberculosis* atrai macrófagos para o local da lesão, o que aumenta a resposta imunológica (68). Imunizações de reforço são administradas 7 e 14 dias após a primeira injeção, com mBSA emulsificada em adjuvante incompleto de Freund (IFA), composto somente de óleo mineral, sem a adição de *M. tuberculosis*. O IFA é utilizado em injeções de reforço para minimizar efeitos adversos, como reação inflamatória exacerbada e fibrose no local da injeção (68). No 21º dia, os animais previamente sensibilizados recebem uma injeção intra-articular (IA) do antígeno (Figura 3) (69).

Essa injeção IA de mBSA induz acentuada migração de neutrófilos (células polimorfonucleares) em 6 horas, com um pico em 24 horas (69). Além de elevada infiltração celular, durante a fase aguda de AIA a articulação apresenta acentuados níveis de mRNA de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-2 e IFN- $\gamma$  (66). IL-17 também parece ter um papel importante na fase inicial da doença (70).



**Figura 3.** Esquema do protocolo experimental agudo de AIA. IM: Imunização; IA: Intra-articular.

Após 7 dias da injeção IA, a fase tardia de AIA apresenta características de doença crônica, apresentando infiltração de células mononucleares, fibrose periarticular, hiperplasia sinovial e destruição do osso e da cartilagem (65, 70).

No presente trabalho, foi realizado o modelo agudo de AIA para análise da nocicepção gerada em um período de 24 horas e do influxo de células inflamatórias para a articulação em 24 horas. As características de artrite crônica foram avaliadas através de CIA.

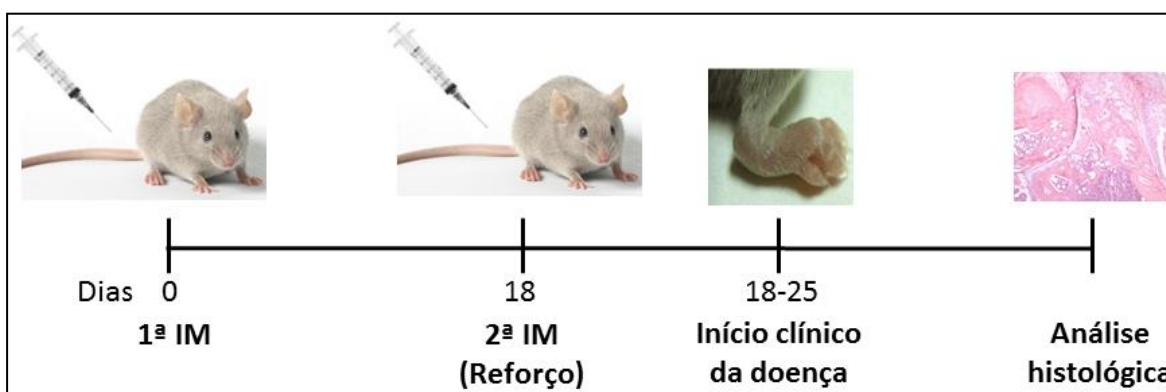
### 2.3.2. ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO (CIA)

A artrite induzida por colágeno foi primeiramente descrita em ratos (71) e posteriormente foi reproduzida em camundongos (72). Este modelo é atualmente o mais utilizado na literatura(73).

Duas características de CIA fazem com que este modelo seja a ferramenta *in vivo* padrão-ouro para o estudo da AR: a quebra de tolerância e a geração de autoanticorpos (59). Além disso, assim como em humanos, a suscetibilidade da doença está relacionada à expressão de moléculas específicas de MHC de classe II, no caso de camundongos I-A<sup>q</sup> e I-A<sup>r</sup> (58, 74).

O desenvolvimento de CIA é regido por um conjunto complexo de genes, na fase de indução da doença, envolvendo a interação tanto de células B quanto de células T CD4+, citocinas e genes não-relacionados ao MHC (58). Várias citocinas pró e anti-inflamatórias estão relacionadas com o desenvolvimento da artrite experimental, como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-10 (61, 66). Características histológicas comuns à doença humana também são observadas, como a presença de infiltrado de células inflamatórias, hiperplasia sinovial, formação de *pannus* e degradação da cartilagem e do osso (73, 75).

De acordo com o protocolo experimental, CIA é induzida com uma imunização intradérmica a cerca de 1,5 cm abaixo da base da cauda do animal no dia 0, com uma emulsão contendo o mesmo volume de colágeno bovino do tipo II (CII) e CFA. Dezoito dias após a primeira imunização, é realizada uma imunização de reforço (booster) com uma emulsão contendo CII e IFA, um pouco abaixo do primeiro local de injeção (Figura 4) (73).



**Figura 4.** Esquema do protocolo experimental de CIA. IM: Imunização.

Na maioria das linhagens suscetíveis à CIA, o acometimento da doença ocorre em 80-100% dos animais, sendo os primeiros sinais clínicos do desenvolvimento de artrite visíveis entre os dias 18 e 25 após a primeira imunização e o período total de acompanhamento experimental dos animais variando conforme os objetivos de cada estudo

(73). Efeitos e eficácia de tratamentos experimentais podem ser testados através da aplicação de um protocolo profilático (com o tratamento iniciando próximo ao dia do reforço e antes do início de sinais clínicos de doença) ou de um protocolo terapêutico (com o tratamento iniciando após o aparecimento dos sinais clínicos da doença) (76).

## 2.4. AMARILIDÁCEAS

A família Amaryllidaceae é composta por 1100 espécies de plantas distribuídas em 75 diferentes gêneros (77). Além de serem utilizadas para fins ornamentais (78), essas plantas são amplamente utilizadas na medicina popular em diferentes países em desenvolvimento, como alguns países do continente africano, asiático, a Polinésia e o Brasil, como agentes purgativos, digestivos, expectorantes, antiparasitários, anti-inflamatórios e antirreumáticos (11-14).

A maioria dos compostos encontrados nas amarilidáceas são alcaloides característicos e exclusivos dessa família de plantas (11, 15). Mais de 500 alcaloides já foram isolados de amarilidáceas e estes mostram-se os responsáveis pelas diversas atividades farmacológicas relatadas para a família Amaryllidaceae (77).

### 2.4.1. RHODOPHIALA BIFIDA

*Rhodophiala bifida* uma espécie nativa da região nordeste da Argentina, com ocorrência também no Uruguai e Brasil. Foi identificada pela primeira vez por Herbert em 1952 e caracterizada como pertence à tribo Hippeastreae, família Amaryllidaceae, gênero *Rhodophiala*, ordem Lillifloreae, classe Monocotyledoneae (16).

É uma planta que se caracteriza por florescer no final do verão, durante o mês de março, apresentar um bulbo negro, subsférico, com diâmetro variando de 3 a 4 cm e folhas carnosas, lineares, com até 30 cm de comprimento e cerca de 1 cm de largura, geralmente posteriores à floração. Possui inflorescência em umbela (3 a 4) com 2 a 7 flores, que apresentam pedicelos desiguais, perigônio de 4 a 5 cm e pétalas cor púrpura. Os estames são desiguais, com filamentos brancos, rosados e declinados. As anteras têm longitude que varia de 5 a 6 mm e o estigma é trilobado (16). Uma característica marcante da composição química dessa espécie é a presença maciça nos bulbos da planta de alcaloides de núcleo do tipo montanina, com 90-95% destes sendo o alcaloide montanina (17).

## 2.5. ALCALOIDES ISOLADOS DE AMARILIDÁCEAS

Conforme citado anteriormente, os alcaloides isolados do bulbo das amarilidáceas são característicos dessa família e os responsáveis pelas atividades farmacológicas observadas.

Esses alcaloides são sintetizados a partir da junção dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, gerando a norbeladina, o precursor comum a todos os alcaloides isolados de amarilidáceas (79). Inicialmente, a fenilalanina é convertida pela enzima fenilalanina amônia-liase em ácido cinâmico, sendo posteriormente degradado em aldeído protocatecuico e a tirosina é convertida pela enzima tirosina descarboxilase em tiramina. A condensação do aldeído protocatecuico com a tiramina resulta na formação de norbeladina. A enzima que catalisa o último passo da reação ainda é desconhecida (80, 81).

Após a formação do precursor norbeladina, este sofre um processo de o-metilação gerando a molécula intermediária o-metilnorbeladina, que sofre um acoplamento de fenol que gera a ciclização da molécula. O acoplamento de fenol é passo chave na formação dos alcaloides, dando origem a três núcleos fundamentais com diferenças significativas em suas estruturas. A partir dessas diferenças na biossíntese, os alcaloides isolados de amarilidáceas são classificados de acordo com seu núcleo estrutural principal. (Figura 5) (80, 81).

Em relação a atividade biológica, alguns alcaloides deste grupo são de particular interesse. A pancratistatina e narciclasina são potenciais candidatos para o desenvolvimento de fármacos devido à atividade contra câncer de ovário e leucemia linfocítica (82-84). O alcaloide pretazetina inibe o crescimento de células HeLa e apresenta atividade terapêutica em leucemia murina. Estudos adicionais mostraram sua ação contra carcinoma pulmonar e leucemia linfocítica (85, 86).

A licorina é o alcaloide mais abundante do grupo e apresenta extensa atividade citotóxica contra uma grande variedade de linhagens de células tumorais (84, 87-91). Muitas vezes, uma atividade *in vivo* pequena destes compostos pode aumentar com a quaternização da molécula como no caso da ungeremina, também conhecida como licobetaína, que é produzida de forma semissintética através da oxidação da licorina e apresenta atividade antiproliferativa *in vitro* contra diversas linhagens de células cancerígenas e, *in vivo*, apresentou resultados significativos no tratamento de carcinoma ovariano e gástrico (92, 93).

Após a descoberta de que o alcaloide galantamina é um potente inibidor da acetilcolinesterase e eficaz para o tratamento da doença de Alzheimer (94-96), o interesse no isolamento e caracterização de alcaloides de Amaryllidaceae tem aumentado de forma exponencial (77). Markmee et al. (97) demonstrou que algumas estruturas derivadas de

alcaloides isoquinolínicos também apresentam significativo potencial de inibição da acetilcolinesterase.

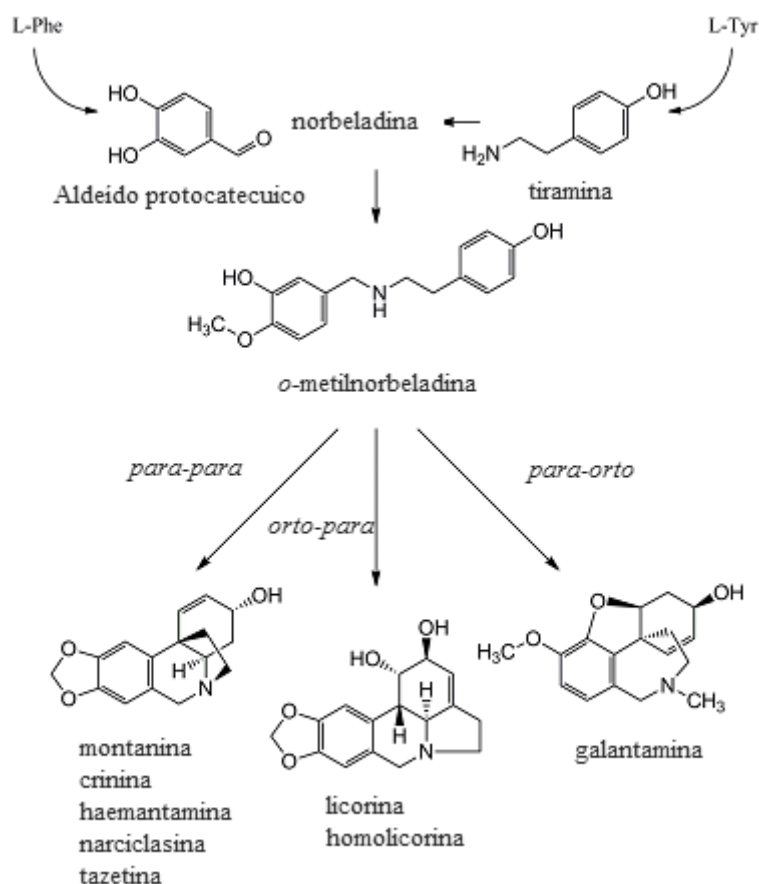


Figura 5. Esquema da biossíntese dos alcaloides provenientes de amarilidáceas. Adaptado de Bastida et al. (81) e Takos et al. (80).

### 2.5.1. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS ALCALOIDES ISOLADOS DE AMARILIDÁCEAS

Além das atividades biológicas relatadas na seção 2.5, alguns alcaloides isolados de amarilidáceas também apresentam atividade anti-inflamatória. Um estudo de 2014 demonstrou que a estrutura precursora na biossíntese desses alcaloides, norbeladina, inibiu a atividade das enzimas ciclo-oxigenase (COX)-1 em 51% e COX-2 em 25% e a ativação de NF- $\kappa$ B em células estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) em 23% (79).

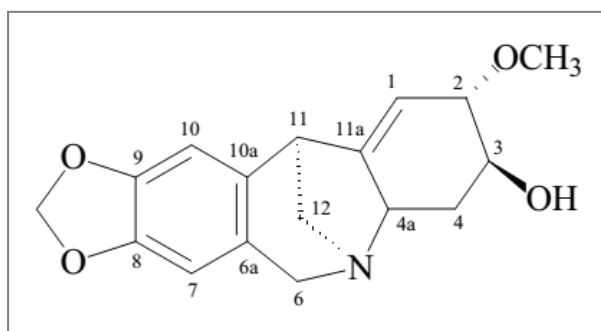
Em cultura de macrófagos RAW264.7 estimuladas com LPS, o tratamento com licorina inibiu a up-regulação da enzima óxido nítrico-sintase induzível (iNOS) e da COX-2, além de diminuir a liberação de IL-6, TNF- $\alpha$ , óxido nítrico (NO) e prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>). Ainda, em modelo de choque por endotoxina induzido com LPS, o tratamento com licorina aumentou a taxa de sobrevivência dos camundongos (98, 99). Adicionalmente, em

camundongos a licorina apresentou ação antinociceptiva em teste de retirada da pata (tail-flick), inibiu contorções abdominais induzidas por ácido acético e, em ratos, reduziu edema de pata induzido por carragenina (78). Em modelo de artrite induzida por adjuvante, licoricidinol diminuiu o edema de pata, enquanto que a licorina não foi capaz de suprimir a artrite (100).

Em camundongos com endotoxemia induzida por LPS, o alcaloide galantamina reduziu de forma dose-dependente os níveis séricos de IL-6 (101). Em um modelo murino de colite, o tratamento com galantamina reduziu de forma dose-dependente a severidade da doença, a atividade de mieloperoxidase (MPO), os níveis séricos de proteína C reativa e os níveis de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em células esplênicas (102). Em camundongos obesos, a galantamina reduziu os níveis séricos de IL-6 (103). Mais recentemente, um estudo em modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos verificou que a galantamina diminuiu o edema e o dano radiológico nas articulações dos animais, bem como reduziu os níveis sérios de ACPA, TNF- $\alpha$  e da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) (104).

## 2.6. MONTANINA

A montanina (Figura 6) é um alcaloide isoquinolínico, extraído e isolado a partir de bulbos de *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub. Sua caracterização é feita através da técnica de Cromatografia de Líquida de Ultraeficiência com detecção na região do ultravioleta (UV) e/ou espectrometria de massas (MS), apresentando massa experimental de 302,1403 Dalton.



**Figura 6.** Estrutura química da montanina.

Poucos trabalhos são encontrados na literatura referentes à montanina. Silva et al. (18) demonstrou que a montanina apresenta atividades psicofarmacológicas incluindo efeitos ansiolíticos, antidepressivos e anticonvulsivos. O tratamento intraperitoneal com montanina reduziu a atividade locomotora e induziu efeito sedativo e ansiolítico, avaliados pelo teste de labirinto em cruz elevado e no campo aberto. Além disso, montanina nas doses de 30 e 60 mg/kg apresentou atividade anticonvulsivante no teste

de convulsão induzida por pentilenotetrazol. No teste de nado forçado, administração de montanina na dose de 3 mg/kg reduziu o tempo de mobilização total e aumentou o comportamento de luta do animal, sugerindo um efeito antidepressivo em resposta ao estresse inevitável. Nesse mesmo trabalho, foi avaliada a toxicidade aguda da montanina em camundongos, encontrando-se uma LD<sub>50</sub> de 64,7 mg/kg para machos e 67,6 mg/kg para fêmeas. A partir de 60 mg/kg, uma única dose de montanina gerou alteração da atividade motora, diminuiu a taxa de respiração e induziu tremores violentos pelo corpo e convulsões.

Em avaliação *in vitro* de citotoxicidade sobre cinco linhagens de células humanas cancerígenas (HT29 adenocarcinoma de colón, H460 carcinoma de pulmão de não-pequenas células, RXF393 carcinoma de células renais, MCF7 câncer mamário, OVCAR3 câncer epitelial ovariano), montanina apresentou grande potencial antiproliferativo (20). Além de potencial antiproliferativo, a montanina apresenta atividade antioxidante e ação antimicrobiana, inibindo o crescimento de culturas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* (17). Ainda, montanina inibiu de forma dose-dependente a atividade da acetilcolinesterase *ex vivo* em hipocampo de ratos, chegando a mais de 50% na dose de 1 mM (19).

### 3. MARCO TEÓRICO

A base teórica acima descrita nesta dissertação demonstra que a inflamação crônica e persistente encontrada na artrite reumatoide é complexa e envolve diversas vias patogênicas. Além disso, concomitante com a autoimunidade e inflamação *per se*, surgem problemas socioculturais, como a diminuição da qualidade de vida, a deterioração funcional e a consequente incapacidade para o trabalho de boa parte dos pacientes diagnosticados com a doença. Ainda, apesar dos avanços, não existe um tratamento curativo para a doença e poucos pacientes chegam a uma remissão completa, sem inflamação articular ativa. Desta forma, o estudo de novas moléculas para o tratamento da artrite reumatoide pode trazer enormes benefícios para o tratamento da doença, suas comorbidades e agravantes.



#### 4. JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços nos últimos anos das estratégias terapêuticas na artrite reumatoide, ainda não existe uma cura para a doença. Assim sendo, hoje o principal objetivo do tratamento é atingir sua remissão, com eliminação da inflamação articular ativa e da deterioração funcional do indivíduo. Porém, poucos pacientes atingem uma remissão completa e os efeitos adversos dos tratamentos disponíveis ainda podem ser bem significativos.

Assim, o estudo de novas moléculas para o tratamento da artrite reumatoide continua sendo importante para se adquirir a otimização do manejo da doença. Ainda, o estudo de novas moléculas para o tratamento da doença pode ser de grande valia para ampliar o conhecimento em relação ao desenvolvimento e a fisiopatogenia da mesma.

As características estruturais e o potencial farmacológico diversificado indicam que o alcaloide montanina pode apresentar um efeito terapêutico interessante em condições de inflamação imunomediada, como as encontradas na artrite reumatoide. Ainda, os conhecimentos adquiridos em testes pré-clínicos com modelos animais e culturas celulares são essenciais para a posterior progressão para as fases de estudos clínicos de uma molécula.

## **5. OBJETIVOS**

### **8.1. OBJETIVO PRIMÁRIO**

Avaliar a eficácia do alcaloide montanina como terapia anti-inflamatória *in vivo* em modelos de artrite induzida por albumina sérica bovina metilada (mBSA) em camundongos Balb/c e por colágeno bovino do tipo II (CIA) em camundongos DBA/1J e sua ação *in vitro* sobre a proliferação de linfócitos e a invasão de fibroblastos sinoviais.

### **8.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

- Avaliar dois protocolos distintos de tratamento com montanina;
- Comparar a eficácia das diferentes doses de montanina testadas e escolher a melhor dose de tratamento;

## 6. REFERÊNCIAS

1. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003; 423: 356-61.
2. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010; 376: 1094-108.
3. Senna ER, De Barros AL, Silva EO, et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol*. 2004; 31: 594-7.
4. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2005; 4: 130-6.
5. McWilliams DF, Varughese S, Young A, et al. Work disability and state benefit claims in early rheumatoid arthritis: the ERAN cohort. *Rheumatology (Oxford)*. 2014; 53: 473-81.
6. Cascão R, Rosário HS, Souto-Carneiro MM, et al. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmun Rev*. 2010; 9: 531-5.
7. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011; 365: 2205-19.
8. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2012; 51 Suppl 5: v3-11.
9. Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov*. 2003; 2: 473-88.
10. Feldmann M, Maini RN. Perspectives From Masters in Rheumatology and Autoimmunity: Can We Get Closer to a Cure for Rheumatoid Arthritis? *Arthritis Rheumatol*. 2015; 67: 2283-91.
11. Louw CA, Regnier TJ, Korsten L. Medicinal bulbous plants of South Africa and their traditional relevance in the control of infectious diseases. *J Ethnopharmacol*. 2002; 82: 147-54.
12. Shale TL, Stirk WA, van Staden J. Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-inflammatory activity. *J Ethnopharmacol*. 1999; 67: 347-54.
13. Agra MdF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2007; 17: 27.
14. Choudhary M, Kumar V, Malhotra H, et al. Medicinal plants with potential anti-arthritis activity. *J Intercult Ethnopharmacol*. 2015; 4: 147-79.
15. Viladomat F, Sellés M, Cordina C, et al. Alkaloids from *Narcissus asturiensis*. *Planta Med*. 1997; 63: 583.
16. Castilhos TdS. Investigação química em *Habranthus erectus* ravenna e *Rhodophiala bifida* (herb.) traub (Amaryllidaceae) e avaliação biológica in vitro do alcaloide montanina. In: Sul UFdRGd, ed., *Dissertação de Mestrado*, 2004.
17. Castilhos T, Giordani R, Henriques A, et al. Avaliação in vitro das atividades antiinflamatória, antioxidante e antimicrobiana do alcalóide montanina. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2007; 17: 6.
18. da Silva AF, de Andrade JP, Bevilaqua LR, et al. Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006; 85: 148-54.
19. Pagliosa LB, Monteiro SC, Silva KB, et al. Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on in vitro acetylcholinesterase activity. *Phytomedicine*. 2010; 17: 698-701.
20. Silva AF, de Andrade JP, Machado KR, et al. Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. *Phytomedicine*. 2008; 15: 882-5.
21. Monteiro RDC, Zanini AC. Análise de custo do tratamento medicamentoso da artrite reumatóide. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 1998; 44: 9.
22. Loza E, Lajas C, Andreu JL, et al. Consensus statement on a framework for the management of comorbidity and extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2015; 35: 445-58.

23. Meune C, Touzé E, Trinquart L, et al. Trends in cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis over 50 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatology (Oxford)*. 2009; 48: 1309-13.
24. Simon TA, Thompson A, Gandhi KK, et al. Incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Arthritis Res Ther*. 2015; 17: 212.
25. Yunt ZX, Solomon JJ. Lung disease in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2015; 41: 225-36.
26. Makol A, Matteson EL, Warrington KJ. Rheumatoid vasculitis: an update. *Curr Opin Rheumatol*. 2015; 27: 63-70.
27. Kleyer A, Schett G. Arthritis and bone loss: a hen and egg story. *Curr Opin Rheumatol*. 2014; 26: 80-4.
28. Young A, Koduri G. Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2007; 21: 907-27.
29. Artifoni M, Rothschild PR, Brézin A, et al. Ocular inflammatory diseases associated with rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014; 10: 108-16.
30. Radner H, Smolen JS, Aletaha D. Comorbidity affects all domains of physical function and quality of life in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2011; 50: 381-8.
31. Worthington J. Investigating the genetic basis of susceptibility to rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*. 2005; 25 Suppl: 16-20.
32. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010; 62: 2569-81.
33. Wegner N, Lundberg K, Kinloch A, et al. Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*. 2010; 233: 34-54.
34. van der Linden MP, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, et al. Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009; 60: 2232-41.
35. Stolt P, Bengtsson C, Nordmark B, et al. Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. *Ann Rheum Dis*. 2003; 62: 835-41.
36. Lahiri M, Morgan C, Symmons DP, et al. Modifiable risk factors for RA: prevention, better than cure? *Rheumatology (Oxford)*. 2012; 51: 499-512.
37. Costenbader KH, Feskanich D, Mandl LA, et al. Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women. *Am J Med*. 2006; 119: 503.e1-9.
38. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum*. 2006; 54: 38-46.
39. Liao KP, Alfredsson L, Karlson EW. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2009; 21: 279-83.
40. Hart JE, Laden F, Puett RC, et al. Exposure to traffic pollution and increased risk of rheumatoid arthritis. *Environ Health Perspect*. 2009; 117: 1065-9.
41. Bengtsson C, Nordmark B, Klareskog L, et al. Socioeconomic status and the risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64: 1588-94.
42. Stolt P, Källberg H, Lundberg I, et al. Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64: 582-6.
43. Sluis-Cremer GK, Hessel PA, Hnizdo E, et al. Relationship between silicosis and rheumatoid arthritis. *Thorax*. 1986; 41: 596-601.

44. Martinez-Gamboa L, Brezinschek HP, Burmester GR, et al. Immunopathologic role of B lymphocytes in rheumatoid arthritis: rationale of B cell-directed therapy. *Autoimmun Rev.* 2006; 5: 437-42.
45. Bottini N, Firestein G. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol.* 2013; 9: 10.
46. Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med.* 2009; 15: 1414-20.
47. Deal C. Bone loss in rheumatoid arthritis: systemic, periarticular, and focal. *Curr Rheumatol Rep.* 2012; 14: 231-7.
48. O'Shea JJ, Laurence A, McInnes IB. Back to the future: oral targeted therapy for RA and other autoimmune diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2013; 9: 173-82.
49. Lahiri M, Dixon WG. Risk of infection with biologic antirheumatic therapies in patients with rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2015; 29: 290-305.
50. Townsend MJ, Monroe JG, Chan AC. B-cell targeted therapies in human autoimmune diseases: an updated perspective. *Immunol Rev.* 2010; 237: 264-83.
51. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2004; 350: 2572-81.
52. Patakas A, Ji RR, Weir W, et al. Abatacept inhibits T cell priming by inducing of a unique transcriptional profile that reduces their ability to activate antigen presenting cells. *Arthritis Rheumatol.* 2015.
53. Smolen JS, Aletaha D, Redlich K. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data? *Nat Rev Rheumatol.* 2012; 8: 235-43.
54. Isaacs JD. Decade in review-clinical rheumatology: 10 years of therapeutic advances in the rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2015; 11: 628-30.
55. Mina-Osorio P. Review: Basics of Drug Development in Rheumatology. *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67: 2581-90.
56. Smolen JS, Aletaha D. Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges. *Nat Rev Rheumatol.* 2015; 11: 276-89.
57. Kollias G, Papadaki P, Apparailly F, et al. Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70: 1357-62.
58. Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology.* 2005; 12: 167-81.
59. Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, et al. Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* 2009; 39: 2040-4.
60. Gulko PS. Contribution of genetic studies in rodent models of autoimmune arthritis to understanding and treatment of rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 2007; 8: 523-31.
61. Hegen M, Keith JC, Collins M, et al. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67: 1505-15.
62. Bendele A. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2001; 1: 377-85.
63. Hu Y, Cheng W, Cai W, et al. Advances in research on animal models of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2013; 32: 161-5.
64. Vincent TL, Williams RO, Maciewicz R, et al. Mapping pathogenesis of arthritis through small animal models. *Rheumatology (Oxford).* 2012; 51: 1931-41.
65. Schaible HG, von Banchet GS, Boettger MK, et al. The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1193: 60-9.
66. Ferraccioli G, Bracci-Laudiero L, Alivernini S, et al. Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 in arthritis animal models: roles in the early phase of transition from acute to chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis. *Mol Med.* 2010; 16: 552-7.
67. van don Berg WB, van de Putte LBA, Zwarts WA, et al. Electrical Charge of the Antigen Determines Intraarticular Antigen Handling and Chronicity of Arthritis in Mice *J Clin Invest.* 1984; 74: 9.
68. Sigma-Aldrich. Freund's Adjuvant, Complete and Incomplete. 2013.

69. Grespan R, Fukada SY, Lemos HP, et al. CXCR2-specific chemokines mediate leukotriene B4-dependent recruitment of neutrophils to inflamed joints in mice with antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 2030-40.
70. Ebbinghaus M, Gajda M, Boettger MK, et al. The anti-inflammatory effects of sympathectomy in murine antigen-induced arthritis are associated with a reduction of Th1 and Th17 responses. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71: 253-61.
71. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med.* 1977; 146: 857-68.
72. Holmdahl R, Jansson L, Larsson E, et al. Homologous type II collagen induces chronic and progressive arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 1986; 29: 106-13.
73. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc.* 2007; 2: 1269-75.
74. Brand DD, Kang AH, Rosloniec EF. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol.* 2003; 25: 3-18.
75. Billiau A, Matthys P. Collagen-induced arthritis and related animal models: how much of their pathogenesis is auto-immune, how much is auto-inflammatory? *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011; 22: 339-44.
76. Caplazi P, Baca M, Barck K, et al. Mouse Models of Rheumatoid Arthritis. *Vet Pathol.* 2015; 52: 819-26.
77. Jin Z. Amaryllidaceae and Scelietium alkaloids. *Nat Prod Rep.* 2013; 30: 849-68.
78. Çitoğlu GS, Acikara OB, Yilmaz BS, et al. Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of lycorine from *Sternbergia fisheriana* (Herbert) Rupr. *Fitoterapia.* 2012; 83: 81-7.
79. Park JB. Synthesis and characterization of norbelladine, a precursor of Amaryllidaceae alkaloid, as an anti-inflammatory/anti-COX compound. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014; 24: 5381-4.
80. Takos AM, Rook F. Towards a molecular understanding of the biosynthesis of amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. *Int J Mol Sci.* 2013; 14: 11713-41.
81. Bastida J, Lavilla R, Viladomat F. Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. *Alkaloids Chem Biol.* 2006; 63: 87-179.
82. Pettit GR, Backhaus RA, Boyd MR, et al. Antineoplastic agents, 256. Cell growth inhibitory isocarbostyrils from *Hymenocallis*. *J Nat Prod.* 1993; 56: 1682-7.
83. Pettit GR, Melody N, Simpson M, et al. Antineoplastic agents 500. Narcistatin. *J Nat Prod.* 2003; 66: 92-6.
84. Nair JJ, van Staden J. Cytotoxicity studies of lycorine alkaloids of the Amaryllidaceae. *Nat Prod Commun.* 2014; 9: 1193-210.
85. Fennell CW, van Staden J. *Crinum* species in traditional and modern medicine. *J Ethnopharmacol.* 2001; 78: 15-26.
86. Masi M, Frolova LV, Yu X, et al. Jonquailine, a new pretazettine-type alkaloid isolated from *Narcissus jonquilla* quail, with activity against drug-resistant cancer. *Fitoterapia.* 2015; 102: 41-8.
87. Likhitwitayawuid K, Angerhofer CK, Chai H, et al. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. *J Nat Prod.* 1993; 56: 1331-8.
88. Weniger B, Italiano L, Beck JP, et al. Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med.* 1995; 61: 77-9.
89. Thi Ngoc Tram N, Titorenkova TV, St Bankova V, et al. *Crinum L.* (Amaryllidaceae). *Fitoterapia.* 2002; 73: 183-208.
90. Hu M, Peng S, He Y, et al. Lycorine is a novel inhibitor of the growth and metastasis of hormone-refractory prostate cancer. *Oncotarget.* 2015; 6: 15348-61.
91. Liu J, Hu WX, He LF, et al. Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis. *FEBS Lett.* 2004; 578: 245-50.

92. Barthelmes HU, Niederberger E, Roth T, et al. Lycobetaine acts as a selective topoisomerase II beta poison and inhibits the growth of human tumour cells. *Br J Cancer*. 2001; 85: 1585-91.
93. Tang W, Hemm I, Bertram B. Recent development of antitumor agents from chinese herbal medicines; part I. Low molecular compounds. *Planta Med*. 2003; 69: 97-108.
94. Nakano Y, Matsuzono K, Yamashita T, et al. Long-Term Efficacy of Galantamine in Alzheimer's Disease: The Okayama Galantamine Study (OGS). *J Alzheimers Dis*. 2015; 47: 609-17.
95. Reichman WE. Current pharmacologic options for patients with Alzheimer's disease. *Ann Gen Hosp Psychiatry*. 2003; 2: 1.
96. Ellis JM. Cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. *J Am Osteopath Assoc*. 2005; 105: 145-58.
97. Markmee S, Ruchirawat S, Prachyawarakorn V, et al. Isoquinoline derivatives as potential acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006; 16: 2170-2.
98. Kang J, Zhang Y, Cao X, et al. Lycorine inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 up-regulation in RAW264.7 cells through suppressing P38 and STATs activation and increases the survival rate of mice after LPS challenge. *Int Immunopharmacol*. 2012; 12: 249-56.
99. Abdel-Halim OB, Morikawa T, Ando S, et al. New crinine-type alkaloids with inhibitory effect on induction of inducible nitric oxide synthase from *Crinum yemense*. *J Nat Prod*. 2004; 67: 1119-24.
100. Mikami M, Kitahara M, Kitano M, et al. Suppressive activity of lycoricidinol (narciclasine) against cytotoxicity of neutrophil-derived calprotectin, and its suppressive effect on rat adjuvant arthritis model. *Biol Pharm Bull*. 1999; 22: 674-8.
101. Pavlov VA, Parrish WR, Rosas-Ballina M, et al. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun*. 2009; 23: 41-5.
102. Ji H, Rabbi MF, Labis B, et al. Central cholinergic activation of a vagus nerve-to-spleen circuit alleviates experimental colitis. *Mucosal Immunol*. 2014; 7: 335-47.
103. Satapathy SK, Ochani M, Dancho M, et al. Galantamine alleviates inflammation and other obesity-associated complications in high-fat diet-fed mice. *Mol Med*. 2011; 17: 599-606.
104. Gowayed MA, Refaat R, Ahmed WM, et al. Effect of galantamine on adjuvant-induced arthritis in rats. *Eur J Pharmacol*. 2015; 764: 547-53.

## 7. ARTIGO

Artigo a ser submetido ao periódico “Arthritis & Rheumatology”.

**Running head:** Montanine: anti-inflammatory and immunomodulatory properties

**Title:** Montanine: an alkaloid isolated from *Rhodophiala bifida* with anti-inflammatory and immunomodulatory properties

Authors: Mirian Farinon<sup>1,2</sup>, Vanessa S. Clarimundo<sup>1,2</sup>, Grazielle P. R. Pedrazza, Ph.D.<sup>2</sup>, Pércio S. Gulko, M.D.<sup>3</sup>, José A. S.Zuanazzi, Ph.D.<sup>2</sup>, Ricardo M. Xavier, M.D. Ph.D.<sup>1,2</sup> and Patricia G. de Oliveira, Ph.D.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup> Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, United States of America

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) grant 400603/2013-6 and Fundação de Incentivo À Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

Farinon, Drs. Pedrazza, Zuanazzi, Xavier and Oliveira are listed as inventors in a provisional patent application for the therapeutic use of montanine in inflammatory conditions.

Address correspondence to Patricia Gnieslaw de Oliveira, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Centro de Pesquisa Experimental, Laboratório de Doenças



Autoimunes, Sala 12109, Rua Ramiro Barcellos 2350, 90035-003, Porto Alegre,  
Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: [patty.go@gmail.com](mailto:patty.go@gmail.com).

## ABSTRACT

**Objective:** Montanine is an alkaloid isolated from *Rhodophiala bifida* bulb with potential anti-inflammatory activity. In this context, we evaluated the effect of montanine as an *in vivo* anti-inflammatory therapy in two arthritis models and *in vitro* on lymphocyte proliferation and on invasiveness of fibroblast-like synoviocytes (FLS).

**Methods:** Antigen-induced arthritis (AIA) was performed in Balb/C mice with methylated bovine serum albumin, and nociception and leukocytes migration into the knee joint were evaluated. Collagen-induced arthritis (CIA) was performed in DBA/1J mice, and arthritis development and severity were assessed by clinical and histological scoring and articular nociception. Montanine was administered intraperitoneally twice a day. Lymphocyte proliferation stimulated by concanavalin A in 48 hours was performed with MTT assay, while FLS invasion in 24 hours was assayed in a Matrigel-coated transwell system.

**Results:** Administration of montanine decreased leukocyte articular migration and nociception in mice with AIA. In mice with CIA, treatment with montanine reduced severity of arthritis and joint damage assessed by clinical and histological scores and ameliorated articular nociception, without causing any hepatic damage. Moreover, montanine inhibited *in vitro* lymphocyte proliferation stimulated with ConA and decreased FLS invasion by 54%, with an action independent of cytotoxicity.

**Conclusion:** These findings suggest that montanine can be further explored as an innovative pharmacological approach for inflammatory and autoimmune diseases such as arthritis.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic and systemic autoimmune disease that affects 0.5-1% of world population (1) and is characterized by inflammation of synovial tissue, synovial hyperplasia and the development of bone and cartilage joint erosions. RA patients have pain and are at increased risk for disability.

RA susceptibility and disease severity have a strong genetic component and different cell types and inflammatory pathways have been implicated in disease pathogenesis (2). Early events in RA pathogenesis include the development of synovial hyperplasia, synovial tissue angiogenesis and synovial tissue infiltration with mononuclear cells such as T and B lymphocytes (2, 3). The typical synovial hyperplasia, also called “pannus”, consists of increased numbers of macrophage and fibroblast-like synoviocytes (FLS) (4) and is a highly invasive tissue that invades and destroys cartilage and bone (2, 3).

Despite recent progress and significant improvement in the treatment for RA, most patients only achieve mild to moderate improvements and disease remission remains uncommon. Additionally, most of the new biologic therapies and small molecules are associated with increased risk for infections (5, 6), emphasizing the need for new therapeutic strategies.

The Amaryllidaceae family has been found to be very promising as a therapeutic tool for human diseases and has been used in alternative medicine in developing countries as antiparasitic, anti-inflammatory and anti-rheumatic agents (7-10). The majority of the compounds found in Amaryllidaceae family are specific alkaloids (7), unique to this family of plants (11) and appear to account for its medicinal properties. Amaryllidaceae alkaloids have been reported to have *in vitro* anti-inflammatory activities, inhibiting cyclooxygenase (COX)-1(12) and COX-2 (12, 13), and reducing of the release of the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (14). Moreover, galantamine, the most studied Amaryllidaceae alkaloid, has a protective effect by reducing the inflammatory state

of mice with lipopolysaccharide-induced endotoxemia (15), high-fat diet-induced obesity (16) and colitis (17) and inflammation in rats with adjuvant-induced arthritis (AA) (18). Additionally, lycorine, the most abundant Amaryllidaceae alkaloid, was found to have an antinociceptive effect in tail-flick test and reduced carrageenan-induced paw edema in rats (19), while lycoricidinol ameliorated paw edema in rats with AA (20). Finally, an important characteristic of these molecules is that all Amaryllidaceae alkaloids are derived from the same basic norbelladine structure, which also has *in vitro* inhibitory action on COX-1 and COX-2 (21).

*Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub is an Amaryllidaceae species native of northeastern Argentina, Uruguay and Brazil (22). This plant has large amounts of the alkaloid montanine. Montanine has been shown to have anxiolytic, anti-depressant and anti-convulsant activities in rodents (23), *in vitro* cytotoxic activity against different human cancers cells lines (24), and acetylcholinesterase inhibitory activity (25). The structural similarities between Montanine and the others Amaryllidaceae alkaloids, and its pleiotropic pharmacologic activity raise the possibility that this alkaloid might also have anti-inflammatory properties.

In the present study, we evaluated the anti-inflammatory and joint protective effects of montanine in two different and well-established models of RA, AIA and collagen-induced arthritis (CIA). We also studied the impact of montanine on subpopulations of leukocytes and in the regulation of fibroblast-like synoviocyte (FLS) behavior.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Animals.** Balb/C wild-type mice (male, 8-12 weeks, 20-25 g) were used for AIA and lymphocyte studies, while DBA/1J inbred mice (male, 8-12 weeks, 18-22 g) were used for CIA. All animals were kept under a 12/12 hours light/dark cycle, 40-60% relative humidity, temperature  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  with water and food *ad libitum*. All

experimental procedures involving animals were performed in accordance with the National Institute of Health Guide for Care and Use of Animals and with the approval of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre ethics committee for animal studies under number 120385.

**Extraction, purification and identification of montanine.** Dried powdered bulbs of *Rhodophiala bifida* were macerated in sulfuric acid 2% (v/v) for four hours in ultrasonic bath. Then, the sample was centrifuged at 3,000 rpm (30 minutes) and the supernatant was removed and defatted with diethylether (3 times). The aqueous solution was basified with 20% ammonium hydroxide to pH 9-10, and the alkaloids were extracted with ethyl acetate (3 times). The organic solvent was dried through anhydrous sodium sulfate and the organic solvent evaporated by vacuum. The crude extract was performed in vacuum liquid chromatography on silica gel using hexane for washing, and then eluted with methanol in order to purify the alkaloid fraction. Methanol was evaporated by vacuum and the extract frozen and lyophilized. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used for the specific identification of the alkaloids. HPLC-UV and Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)-MS (mass spectroscopy) analysis determined that the main alkaloid (90-95%) was montanine.

**Induction of AIA.** AIA was performed according to Grespan et al. (26). Twenty-four Balb/C mice were sensitized by subcutaneous (sc) injection with mBSA (500 µg) (Sigma-Aldrich) dissolved in 0.2 ml of an emulsion containing equal ratio of 0.9% saline and complete Freund's adjuvant (CFA) (Sigma-Aldrich) administered on day 0. Sc booster injections were administered on days 7 and 14 using incomplete Freund's adjuvant (IFA) (Sigma-Aldrich). Treatment started at day 20 after the first immunization and mice received montanine (0.3, 1 or 3 mg/kg) or vehicle (0.9% saline) via intraperitoneal (ip) in 100 µl, 24 hours and 30 minutes before the intra-articular (IA) injection of mBSA. On day 21, arthritis was induced in pre-immunized

animals by IA injection with mBSA (30 µg) dissolved in 10 µl of saline into the left knee joint. Nociception was analyzed in a 24 hours period and mice were killed 24 hours after arthritis induction to assess leukocyte migration to the joint.

**Induction and arthritis scoring of CIA.** CIA was performed according to Brand et al. (27). Forty-five DBA/1J mice were immunized with 70 µL of an emulsion containing equal volumes of 2 mg/ml bovine collagen type II (Chondrex) and CFA (2 mg/ml heat killed *Mycobacterium tuberculosis* (Strain H37 RA, Difco Laboratories) by intradermal injection in the base of the tail on day 0. A booster injection was performed at day 18 with 70 µL of emulsion with collagen and IFA. After booster, animals were monitored daily for clinical signs of arthritis according to a standardized method of arthritis scoring (27) to evaluate the development of disease and were divided into two protocols of treatment. In the preventive protocol, 24 animals received montanine (0.05, 0.25 and 0.5 mg/ml) or vehicle (saline 0.9%) via ip twice a day with treatment starting on the day of booster injection and lasting for 15 days. In the therapeutic protocol, 21 animals received montanine (0.5 and 1.5 mg/ml) or vehicle (saline 0.9%) via ip twice a day with treatment starting on the day of arthritis onset and lasting for 10 days.

**Evaluation of articular nociception.** Articular nociception was assessed according to Oliveira *et al.* (2011) (28). Mice were placed in a quiet room in acrylic cages with a wire-grid floor for 15-30 minutes before testing for environmental adaptation. An electronic pressure meter was used (Insight Instruments, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) to automatically record the intensity of the force applied when the paw was withdrawn, with results expressed as the flexion-elicited withdrawal threshold in grams. In AIA model, nociception of the knee joint was evaluated on 0, 3, 5 and 24 hours after ia injection of mBSA and in CIA model, nociception of the paw was evaluated on days 0, 2, 4, 6, 8 and 10 after onset of disease.

**Evaluation of *in vivo* leukocyte migration in AIA.** After euthanasia, the injected knee cavity of Balb/C mice were washed three times with 5  $\mu$ l phosphate buffered saline (0.15 M NaCl, 6.5 mM phosphate and 1 mM EDTA) in a final volume of 90  $\mu$ l. Leukocytes were counted in the washings using Neubauer chamber (HBG, Germany) under optical microscopy.

**Histology and histological scoring in CIA.** At the end of CIA experiment, mice were euthanized and ankle joints collected for histological analyses. Ankles were fixed in 10% buffered formalin for 7 days and then decalcified on a 10% nitric acid for 24 hours. Joints were embedded in paraffin and slides were prepared and stained with hematoxylin and eosin. The slides were scored with a previously established score for synovial inflammation, synovial hyperplasia, extension of *pannus* formation, cartilage erosion and bone erosion (29).

**Fibroblast-like synoviocytes isolation and culture.** Arthritic joints from DBA/1J mice with CIA were collected, placed in a 6-well plate and then incubated with collagenase I (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich) for 1h at 98.6°F. The supernatant was collected and centrifuged at 1100 rpm for 10 minutes and the pellet re-suspended in complete medium (Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose, supplemented with 15% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin and 0.125% gentamicin, [Gibco]), and then transferred to a new 6-well plate for culture at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The initial culture was monitored daily until 70-90% of confluence and then cells were detached with trypsin-EDTA (GIBCO) and transferred to a culture flask. FLS after five passages (pure FLS line) were used for experiments.

**Lymphocyte viability assay.** Lymphocyte viability was determined by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide] assay (30). Total lymphnodes were dissected under aseptic conditions from non-immunized Balb/C mice and lymphocytes were isolated using a 70  $\mu$ m nylon mesh cell strainer (BD

Bioscience). Cells were counted and added to a 96-well plate in triplicate at a density of  $5 \times 10^5$  cells/ml. Cells were cultured in the presence or absence of montanine (0.01; 0.1; 1; 10 and 100  $\mu\text{M}$ ) for 24 hours at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$  in RPMI-1640 medium (GIBCO) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. On the last 4 hours, cells were incubated with 0.5 mg/ml of MTT (Sigma-Aldrich). Culture medium was then removed and 100  $\mu\text{l}$  of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Nuclear) added to dissolve the MTT formazan crystals. Absorbance was read at 570nm in spectrophotometer (Anthos Zenyth 200rt).

**FLS viability assay.** FLS viability was determined by MTT assay (30). Semi-confluent (70-90%) cultures of FLS were harvested with trypsin-EDTA digestion and re-suspended in appropriate culture medium. Cells were added to 96-well plates at a density of  $2 \times 10^4$  cells/ml. FLS were allowed to adhere over 24 hours and then cultured in the presence or absence montanine (0.01; 0.1; 1 and 10  $\mu\text{M}$ ) for 24 hours at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$ . On the last 4 hours, cells were incubated with MTT and the absorbance of each well measured at 570nm in spectrophotometer.

**Lymphocyte proliferation assay.** Lymphocyte proliferation assay was performed as previously described (31). Lymph nodes of non-sensitized Balb/C were removed aseptically. Lymphocytes were extracted and added in triplicate at a density of  $5 \times 10^5$  cells/ml in a 96-well plate. Subsequently, cells were stimulated with concanavalin A (ConA) (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Sigma-Aldrich), in the presence or absence of montanine 1  $\mu\text{M}$  and cultured for 48 hours at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$ . On the last 4 hours of experiment, cells were incubated with MTT and the absorbance of each well was measured at 570 nm in spectrophotometer.

**Fibroblast-like synoviocytes (FLS) invasion assay.** The FLS invasion assay was performed according to Laragione *et al.* (32) with minor modifications. 70-90% confluent FLS were enzymatically harvested with trypsin-EDTA and re-suspended with serum-free DMEM-HG, placed in duplicate at a concentration of  $1 \times 10^5$  cells in



500  $\mu$ l in the upper compartment of the Matrigel-coated inserts in a 24-well plate transwell system (BD Bioscience). Montanine 1 $\mu$ M were added to the upper compartment. DMEM-HG supplemented with 15% SFB was added to the lower compartment as a chemoattractant. Plates were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours. Non-invading cells and the Matrigel layer were removed from the upper surface of inserts with swabs and the invading cells on the lower surface stained with Crystal Violet. The total area of inserts was photographed using a camera coupled in an inverted microscope (Olympus) and the total number of invading cells was counted.

**Statistical analysis.** Data with normal distribution are presented as mean  $\pm$  SEM and non-normally distributed data are presented as median and interquartile amplitude. Groups were compared by the one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's adjustment for multiple comparisons, by Student's t-test or Mann-Whitney test using GraphPad Prism 5.0. Statistical differences were considered significant with a p value < 0.05.

## RESULTS

**Montanine reduced inflammatory parameters in mice with AIA.** We first examined the effect of montanine on inflammation and pain in acute AIA. Vehicle-treated mice had pronounced increased inflammation-related nociception starting at the initial measurement 3 hours after the IA injection of mBSA further increasing at 5 and 24 hours. Treatment with montanine in all doses significantly reduced nociception at 5 hours (p<0.01) and 24 hours (p<0.001). The higher dose of montanine (3 mg/kg) was also effective at reducing nociception 3 hours after IA injection (p<0.01), comparing with vehicle-treated mice (figure 1A).

IA injection of mBSA generated a massive recruitment of leukocytes to the knee joint cavity of vehicle-treated mice, and treatment with montanine (all concentrations) markedly and significantly reduced the numbers of leukocytes in the knee by 90% ( $p < 0.001$ ) (figure 1B).

**Preventive use of Montanine delayed disease onset and reduced disease severity in CIA.** Disease onset in the CIA mice treated with saline-treated group was typically at day 18 after the induction of disease, and all animals were affected at day 25. The peak of disease's severity was at day 32 after induction (day 14 after booster injection). All three doses of montanine administered in the preventive treatment arm (before onset of arthritis), delayed disease onset by nearly 7 days (figure 2A). Montanine doses of 0.25 and 0.5 mg/kg significantly reduced disease severity throughout the observation period while the 0.05mg/Kg dose was only protective until day 10 after the booster (figure 2A).

**Montanine administered after the onset of arthritis significantly reduced disease severity.** In this set of experiments montanine treatment was started after the onset of arthritis, which mimics the clinical scenario of RA. Montanine (0.5 mg/kg) significantly and persistently reduced the arthritis severity scores (figure 2B) and also ameliorated paw nociception at day 2 and 10 after first clinical sign of arthritis (figure 2C).

**Montanine reduced histologic inflammation and damage in CIA.** Vehicle-treated mice had marked synovial infiltration with inflammatory cells with *pannus* formation and extensive cartilage and bone erosion (figure 3A). On the other hand, mice treated with montanine 0.5mg/Kg had minimal to no inflammatory cells infiltration, *pannus* formation or cartilage erosion in both preventive (figure 3B) and therapeutic arms (figure 3C). Histology changes were scored in a blinded manner and montanine-treated mice had significantly lower scores in all parameters

(inflammation, hyperplasia, erosions), compared with vehicle-treated mice, further supporting the clinical results (figure 3D).

**Montanine reduced *in vitro* lymphocyte proliferation.** First, we examine the potential toxicity and cell death induced by montanine on lymphocytes using a viability assay (MTT). There was no significant toxicity or increased cell death at concentrations from 0.01 to 1  $\mu$ M (figure 4A). Therefore, we used the 1  $\mu$ M concentration for the *in vitro* proliferation assay. ConA stimulation significantly increased lymphocyte proliferation compared with non-stimulated lymphocytes, and treatment with montanine reduced this proliferation by 54% ( $p < 0.001$ ) (figure 4B).

**Montanine reduced *in vitro* invasiveness of FLS.** Finally, we evaluated the effect of montanine on the invasive phenotype of FLS, a key process implicated in cartilage and bone *pannus* invasion and articular destruction, using a commercial Matrigel-coated transwell system. First, we did a dose titration to determine the maximum non-toxic concentration of montanine on DBA/1J FLS (figure 5A). The selected concentration of 1  $\mu$ M was used to study invasion of FLS from five different DBA/1J with CIA. Treatment with montanine reduced FLS invasion by 54% ( $p < 0.05$ ) (figures 5B and 5C).

## DISCUSSION

Animal models of arthritis are important tools to identify potential new therapeutic agents for RA (33). Since there is no universal model that reflects all articular and systemic features of the human disease (34, 35), it is important to perform studies in more than one model, involving different pathogenetic pathways. Antigen-induced arthritis (AIA) (36) generates in 24 hours an acute joint inflammation characterized by swelling, polymorphonuclear infiltration and pronounced hyperalgesia (37). On the other hand, the development of collagen-induced arthritis (CIA) (38) is dependent of both innate and adaptive immune responses and leads

to chronic polyarthritis with joint inflammation and cartilage and bone erosion (39). In addition, it is important to evaluate the effect of a potential new therapeutic agent on phenotypes of cells involved in the pathogenesis of the disease, such as the invasiveness of FLS and the exacerbated proliferation of lymphocytes.

Based on that, in the present study, we evaluated the effect of montanine, an alkaloid isolated from *Rhodophiala bifida* bulbs, on these two different models of arthritis. Our findings demonstrated that montanine significantly attenuated the development of experimental arthritis in both acute and chronic models. In AIA, montanine was able to reduce the leukocyte influx to the joint, an important marker of local inflammatory activity (26) and nociception. In CIA, montanine reduced the clinical score of arthritis and prevented histologic damage both when administered in a prophylactic way prior to the onset of arthritis or therapeutically after the onset of disease. Additionally in the clinical treatment protocol of CIA, a reduction in paw nociception and no histologic liver damage (data not shown) was observed. In a review of literature, Hegen et al. (33) found that the most approved drugs for treatment of RA have data on therapeutic efficacy from AIA and CIA, indicating that these two models together constitute an important proof-of-concept paradigm for preclinical drug development.

*In vitro*, montanine reduced lymphocyte proliferation induced by conA, a preferentially mitogen for T-lymphocytes (40). T cells are importantly involved in RA pathogenesis and are effective target for disease treatment (5), as well as their depletion has been reported to delay CIA development (41). This suppressive effect of montanine on T lymphocytes could be related to the observed *in vivo* anti-inflammatory effect. It has been shown that the Amaryllidaceae alkaloid lycorine acts *in vitro* on Jurkat cells (a leukemic T lymphocyte cell line) through induction of apoptosis (42, 43), but the effect of montanine seems to be due a different mechanism, since the concentration used *in vitro* was not found to increase

lymphocyte death. Nonetheless, further studies are needed to better evaluate a possible direct action of montanine on these cells.

FLS has a key role in *pannus* formation and joint destruction (4) through the ability to invade cartilage and bone. This ability can be tested *in vitro* using a matrigel-coated transwell system. We observed a reduction on 54% of total number of invading cells on DBA/1J FLS treated with montanine. The *in vitro* FLS invasion phenotype correlates with radiologic joint destruction for RA patients (44) and histological joint damage for rat (45), indicating that our finding is clinically relevant. Again, more studies are needed to investigate this apparently direct effect of the alkaloid on FLS.

Despite the increase of biological studies with Amaryllidaceae alkaloids, inspired by the clinical use of galantamine in Alzheimer's disease (46), little is known about their effects on inflammatory conditions. These alkaloids seem to deplete some pro-inflammatory mediators (12-17). Specifically in arthritis research, two studies in rat adjuvant-induced arthritis models demonstrated the protective effects of galantamine on disease development by reducing TNF- $\alpha$ , edema and radiological changes (18), and of lycoricidinol through suppression of edema (20).

Previous work has shown that montanine presents psychopharmacological activities in rodents. In open field and elevated plus maze tests, montanine induced a sedative and anxiolytic effect, while in the pentylenetetrazole-induced seizure model the alkaloid showed a dose-dependent anticonvulsant activity. Additionally, in the forced swimming test, montanine reduced total immobility time and enhanced struggling behavior, indicating an antidepressant effect in response to inescapable stress (23). In an *ex vivo* analysis of rat hippocampus slices, montanine inhibited in a dose-dependent manner the acetylcholinesterase activity (25). Finally, montanine has been reported to have antiproliferative activity *in vitro* against human cancer cell lines (24). Nevertheless, our study is the first to evaluate and demonstrate an

anti-inflammatory and beneficial effect of montanine in arthritis, with clear protection of cartilage and bone damage.

Regarding the dose used in our experiments, a study of acute toxicity indicated LD<sub>50</sub> value of 64.7 mg/kg of montanine for male mice, and the occurrence of side effects as altered motor activity, decreased respiratory rate, violent body tremors and clonic convulsions (23). Therefore we evaluated the anti-inflammatory effect of montanine in very lower doses, not observing any of those changes. Interestingly, the higher dose of montanine in clinical protocol of CIA showed no effect on arthritis severity and paw nociception. We can hypothesize that the increased availability of molecules of montanine leads to an acute activation that culminates with mechanisms of desensitization of the receptor, reducing the activation of receptor cell signaling and, consequently, decreasing the biological effect seen at lower doses.

Due to the complexity of autoimmune rheumatic diseases, and based on the growing experience with targeted biologic therapies, blocking a single target is unlikely to provide dramatic efficacy in all patients with RA. This fact demonstrate the importance of the development of molecules that might act on different pathways that are also important to the disease pathogenesis or that are involved in multiple pathways (47). For example, considering the increased risk of infections with all current disease modifying anti-rheumatic drugs used in RA, molecules with direct effect on FLS, which are critical in joint destruction, and with minor immunosuppressive effects could represent a relevant addition to the treatment of these diseases. Therefore, we believe that additional efforts should be directed to clarify the mechanisms of action and pharmacokinetic characteristics of montanine to support future development of clinical trials with this potential new therapy.

**Acknowledgments.** The authors thank Ph.D. Lidiane I. Fillipin for data acquisition in FLS invasion assay, the employees of the Unidade de Experimentação Animal and the Serviço de Patologia Experimental of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## REFERENCES

1. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010; 376: 1094-108.
2. Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov*. 2003; 2: 473-88.
3. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011; 365: 2205-19.
4. Bottini N, Firestein G. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol*. 2013; 9: 10.
5. Smolen JS, Aletaha D, Redlich K. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data? *Nat Rev Rheumatol*. 2012; 8: 235-43.
6. Feldmann M, Maini RN. Perspectives From Masters in Rheumatology and Autoimmunity: Can We Get Closer to a Cure for Rheumatoid Arthritis? *Arthritis Rheumatol*. 2015; 67: 2283-91.
7. Louw CA, Regnier TJ, Korsten L. Medicinal bulbous plants of South Africa and their traditional relevance in the control of infectious diseases. *J Ethnopharmacol*. 2002; 82: 147-54.
8. Shale TL, Stirk WA, van Staden J. Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-inflammatory activity. *J Ethnopharmacol*. 1999; 67: 347-54.
9. Agra MdF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2007; 17: 27.
10. Choudhary M, Kumar V, Malhotra H, et al. Medicinal plants with potential anti-arthritis activity. *J Intercult Ethnopharmacol*. 2015; 4: 147-79.
11. Viladomat F, Sellés M, Cordina C, et al. Alkaloids from *Narcissus asturiensis*. *Planta Med*. 1997; 63: 583.
12. Elgorashi EE, van Staden J. Pharmacological screening of six Amaryllidaceae species. *J Ethnopharmacol*. 2004; 90: 27-32.
13. Liu ZM, Huang XY, Cui MR, et al. Amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *Lycoris radiata* with cytotoxic and anti-inflammatory activities. *Fitoterapia*. 2015; 101: 188-93.
14. Kang J, Zhang Y, Cao X, et al. Lycorine inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 up-regulation in RAW264.7 cells through suppressing P38 and STATs activation and increases the survival rate of mice after LPS challenge. *Int Immunopharmacol*. 2012; 12: 249-56.



15. Pavlov VA, Parrish WR, Rosas-Ballina M, et al. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun.* 2009; 23: 41-5.
16. Satapathy SK, Ochani M, Dancho M, et al. Galantamine alleviates inflammation and other obesity-associated complications in high-fat diet-fed mice. *Mol Med.* 2011; 17: 599-606.
17. Ji H, Rabbi MF, Labis B, et al. Central cholinergic activation of a vagus nerve-to-spleen circuit alleviates experimental colitis. *Mucosal Immunol.* 2014; 7: 335-47.
18. Gawayed MA, Refaat R, Ahmed WM, et al. Effect of galantamine on adjuvant-induced arthritis in rats. *Eur J Pharmacol.* 2015; 764: 547-53.
19. Çitoğlu GS, Acikara OB, Yilmaz BS, et al. Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of lycorine from *Sternbergia fisheriana* (Herbert) Rupr. *Fitoterapia.* 2012; 83: 81-7.
20. Mikami M, Kitahara M, Kitano M, et al. Suppressive activity of lycoricidinol (narciclasine) against cytotoxicity of neutrophil-derived calprotectin, and its suppressive effect on rat adjuvant arthritis model. *Biol Pharm Bull.* 1999; 22: 674-8.
21. Park JB. Synthesis and characterization of norbelladine, a precursor of Amaryllidaceae alkaloid, as an anti-inflammatory/anti-COX compound. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014; 24: 5381-4.
22. Meerow AW, Snijman DA. Flowering Plants. Monocotyledons. Amaryllidaceae. 1 ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1998.
23. da Silva AF, de Andrade JP, Bevilaqua LR, et al. Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006; 85: 148-54.
24. Silva AF, de Andrade JP, Machado KR, et al. Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. *Phytomedicine.* 2008; 15: 882-5.
25. Pagliosa LB, Monteiro SC, Silva KB, et al. Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on in vitro acetylcholinesterase activity. *Phytomedicine.* 2010; 17: 698-701.
26. Grespan R, Fukada SY, Lemos HP, et al. CXCR2-specific chemokines mediate leukotriene B<sub>4</sub>-dependent recruitment of neutrophils to inflamed joints in mice with antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 2030-40.
27. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc.* 2007; 2: 1269-75.

28. Oliveira PG, Grespan R, Pinto LG, et al. Protective effect of RC-3095, an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor, in experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011; 63: 2956-65.
29. Brenner M, Meng HC, Yarlett NC, et al. The non-major histocompatibility complex quantitative trait locus Cia10 contains a major arthritis gene and regulates disease severity, pannus formation, and joint damage. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 322-32.
30. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.
31. Farinon M, Lora PS, Francescato LN, et al. Effect of Aqueous Extract of Giant Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) in Antigen-Induced Arthritis. *Open Rheumatol J.* 2013; 7: 129-33.
32. Laragione T, Shah A, Gulko PS. The vitamin D receptor regulates rheumatoid arthritis synovial fibroblast invasion and morphology. *Mol Med.* 2012; 18: 194-200.
33. Hegen M, Keith JC, Collins M, et al. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67: 1505-15.
34. Kollias G, Papadaki P, Apparailly F, et al. Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70: 1357-62.
35. Hu Y, Cheng W, Cai W, et al. Advances in research on animal models of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2013; 32: 161-5.
36. Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum.* 1977; 20: 841-50.
37. Ebbinghaus M, Gajda M, Boettger MK, et al. The anti-inflammatory effects of sympathectomy in murine antigen-induced arthritis are associated with a reduction of Th1 and Th17 responses. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71: 253-61.
38. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med.* 1977; 146: 857-68.
39. Ferraccioli G, Bracci-Laudiero L, Alivernini S, et al. Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 in arthritis animal models: roles in the early phase of transition from acute to chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis. *Mol Med.* 2010; 16: 552-7.
40. Hadden JW, Hadden EM, Sadlik JR, et al. Effects of concanavalin A and a succinylated derivative on lymphocyte proliferation and cyclic nucleotide levels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976; 73: 1717-21.

41. Ranges GE, Sriram S, Cooper SM. Prevention of type II collagen-induced arthritis by in vivo treatment with anti-L3T4. *J Exp Med*. 1985; 162: 1105-10.
42. McNulty J, Nair JJ, Bastida J, et al. Structure-activity studies on the lycorine pharmacophore: A potent inducer of apoptosis in human leukemia cells. *Phytochemistry*. 2009; 70: 913-9.
43. Evidente A, Kireev AS, Jenkins AR, et al. Biological evaluation of structurally diverse amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: discovery of novel leads for anticancer drug design. *Planta Med*. 2009; 75: 501-7.
44. Tolboom TC, van der Helm-Van Mil AH, Nelissen RG, et al. Invasiveness of fibroblast-like synoviocytes is an individual patient characteristic associated with the rate of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2005; 52: 1999-2002.
45. Laragione T, Brenner M, Mello A, et al. The arthritis severity locus Cia5d is a novel genetic regulator of the invasive properties of synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2008; 58: 2296-306.
46. Nakano Y, Matsuzono K, Yamashita T, et al. Long-Term Efficacy of Galantamine in Alzheimer's Disease: The Okayama Galantamine Study (OGS). *J Alzheimers Dis*. 2015; 47: 609-17.
47. Mina-Osorio P. Review: Basics of Drug Development in Rheumatology. *Arthritis Rheumatol*. 2015; 67: 2581-90.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Therapeutic effect of montanine in antigen-induced arthritis (AIA). Balb/C mice were treated via intraperitoneal with montanine (0.3; 1 or 3 mg/kg) or vehicle (saline 0.9%) 24 hours and 30 minutes before intra-articular injection of mBSA. **A.** Articular nociception was evaluated 0, 3, 5 and 24 hours after intra-articular injection of mBSA. Treatment with montanine reduced mechanical nociception at 5 and 24 hours at all tested doses and at 3 hours in the higher dose. \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$  versus vehicle treatment, by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post-hoc test. **B.** Leukocytes migration into the articular cavity of knee joint assessed 24 hours after intra-articular injection of mBSA. Treatment with montanine diminishes the number of migrated cells at all doses of test. \*\*\* $p < 0.001$  versus vehicle by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test. Each bars represents mean  $\pm$  SEM in 6 mice per group.

**Figure 2.** Therapeutic effect of montanine in collagen-induced arthritis (CIA). DBA/1J mice were sensitized with bovine type II collagen, arthritis development was assessed daily and animals were treated with montanine via intraperitoneal twice a day according two different treatment protocols. **A.** Clinical score in pre-clinical treatment protocol. Mice were treated with montanine (0.05; 0.25 or 0.5 mg/kg) or vehicle in the day of bovine type II collagen booster injection until day 15. Montanine at doses 0.25 and 0.5 mg/kg reduced clinical score from day 7. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$  versus vehicle by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test. Each bars represents mean  $\pm$  SEM in 6 mice per group. **B.** Clinical score in clinical treatment protocol. Mice start treatment with montanine (0.5 or 1.5 mg/kg) or vehicle after onset of arthritis and lasting for 10 days. Montanine 0.5 mg/kg reduced clinical score from day 3. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$  versus

vehicle by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test. **C.** Nociception in clinical treatment protocol. Montanine 0.5 mg/kg ameliorates nociception at days 2 and 10. \* $p < 0.05$  \*\*\* $p < 0.001$  versus vehicle by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test. Each bars represents mean  $\pm$  SEM in 7 mice per group.

**Figure 3.** Histopathologic features of ankle joints from mice with collagen-induced arthritis (CIA). **A.** Vehicle-treated mice with CIA showed marked infiltration of inflammatory cells with *pannus* formation and large cartilage and bone erosion. **B.** Treatment with montanine 0.5 mg/kg in pre-clinical treatment protocol showed mild infiltration of inflammatory cells and closely to normal joint architecture. **C.** Mice treated with montanine 0.5 mg/kg in clinical treatment protocol showed mild inflammatory cells infiltration, *pannus* formation and cartilage erosion. **D.** Detailed histopathologic score of ankle joints. Treatment with montanine 0.5 mg/kg improved all histological parameters founded in vehicle-treated mice. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  versus vehicle by Mann-Whitney t test. Values represents median (25-75 percentiles) of histologic scores in a scale of 0-3 for all measures in 6 (pre-clinical treatment) or 7 (clinical treatment) mice per group.

**Figure 4.** *In vitro* effect of montanine in lymphocytes. **A.** Effect of montanine on lymphocyte cell viability. Cells were incubated with montanine at indicated concentrations for 24 hours. Treatment with montanine only affected cell viability at the 100  $\mu$ M dose. \*\* $p < 0.01$  versus cell by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Each bars represents mean  $\pm$  SEM in 3 N per group of two independent experiments. **B.** Effect of montanine on lymphocyte proliferation induced by concanavalin A (ConA) (5  $\mu$ g/ml) in 48 h. Treatment with montanine 1  $\mu$ M inhibited lymphocyte proliferation stimulated with ConA by 54%. \*\*\* $p < 0.001$

versus cell+ConA by Student's unpaired t-test. Each bars represents mean  $\pm$  SEM in samples from 6 different Balb/C mice per group.

**Figure 5.** *In vitro* effect of montanine in fibroblast-like synoviocytes (FLS). **A.** Effect of montanine on FLS cell viability. Cells were incubated with montanine at indicated concentrations for 24 hours. Treatment with montanine did not affected cell viability. Each bars represents mean  $\pm$  SEM in 3 N per group of two independent experiments. **B.** Cell counts of invasive FLS in each sample from DBA/1J arthritic mice. **C.** Effect of montanine on FLS invasion. FLS were plated in the upper wells of Matrigel-coated transwell chambers and treated with montanine 1  $\mu$ M for 24 hours. Fetal bovine serum 15% were used as chemoattractant in the lower wells. Montanine treatment decreased FLS invasion by 54%. \* $p < 0.05$  versus cell by Student's unpaired t-test. Each bars represents mean  $\pm$  SEM in samples from 5 different DBA/1J mice with arthritis per group.

Figure 1.

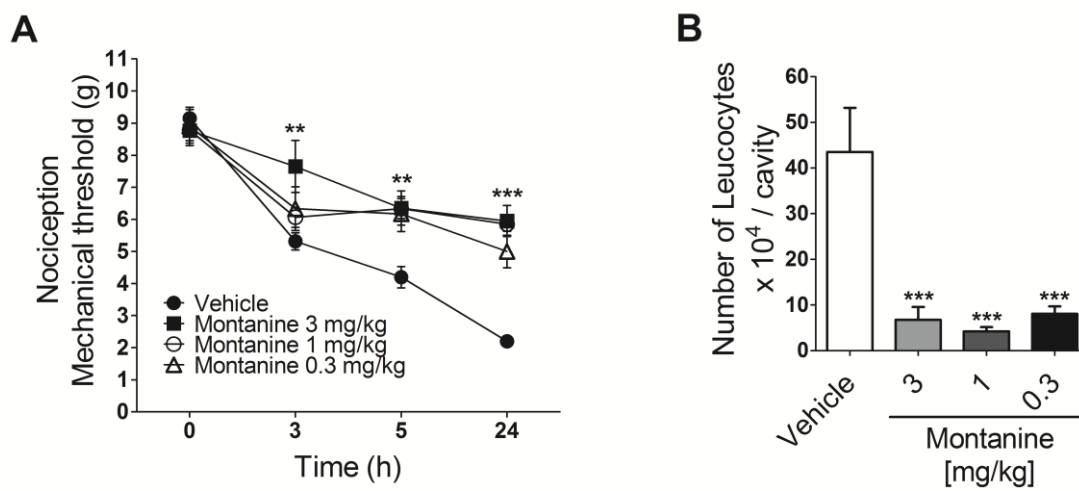
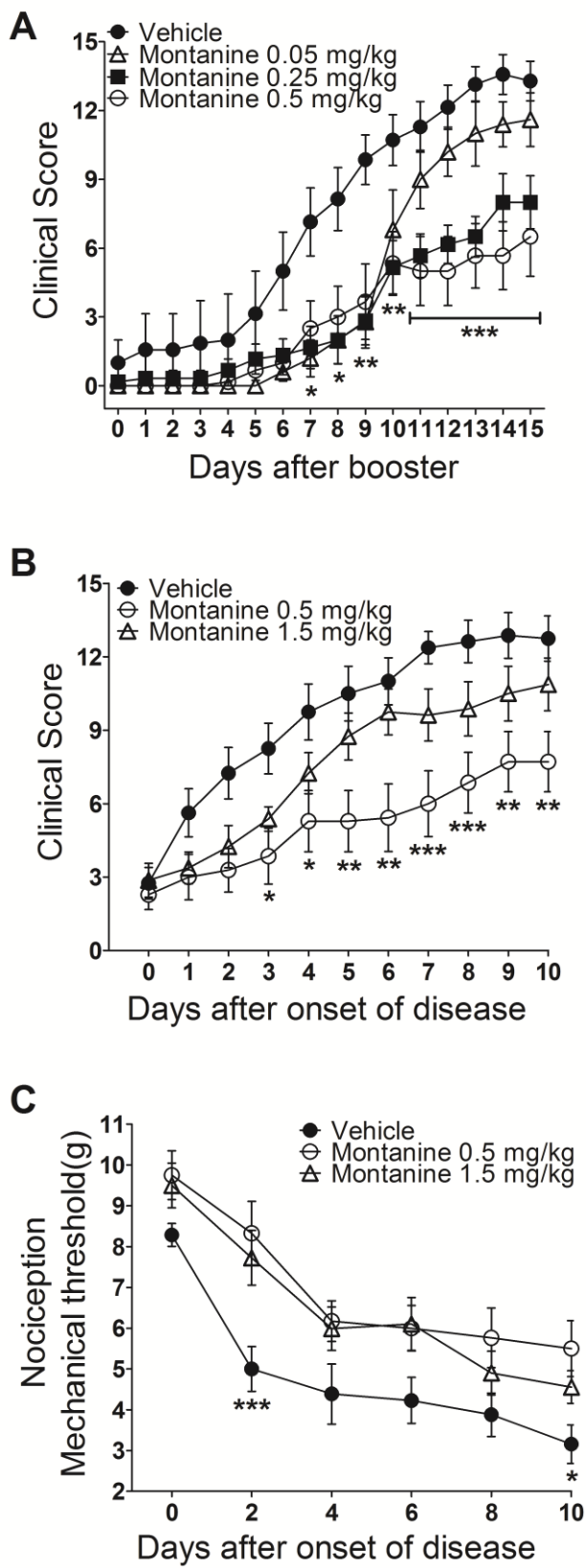
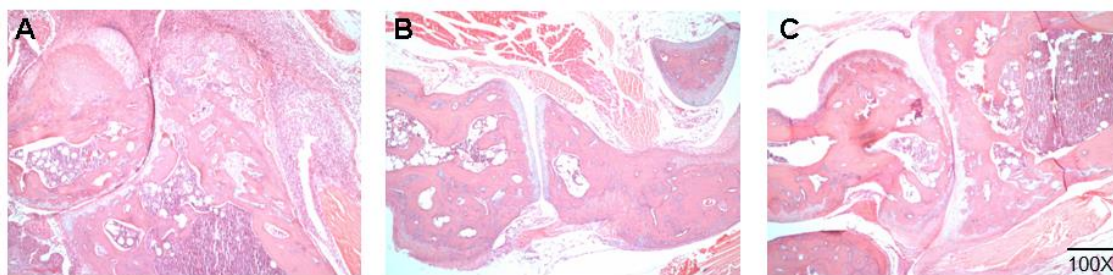


Figure 2.





**Figure 3.****D**

	Vehicle	Montanine (0.5 mg/kg)	
		Pre-clinical treatment	Therapeutic treatment
Synovial Inflammation (0-3)	3 (2 – 3)	1 (0 – 3)**	1.5 (0 – 3)**
Synovial hyperplasia (0-3)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)
Extension of Pannus (0-3)	2 (1 – 3)	0 (0 – 2)*	1 (0 – 2)*
Cartilage erosions (0-3)	3 (2 – 3)	0 (0 – 3)*	1 (0 – 3)*
Bone erosions (0-3)	3 (1 – 3)	0 (0 – 3)*	0 (0 – 3)*

Figure 4.

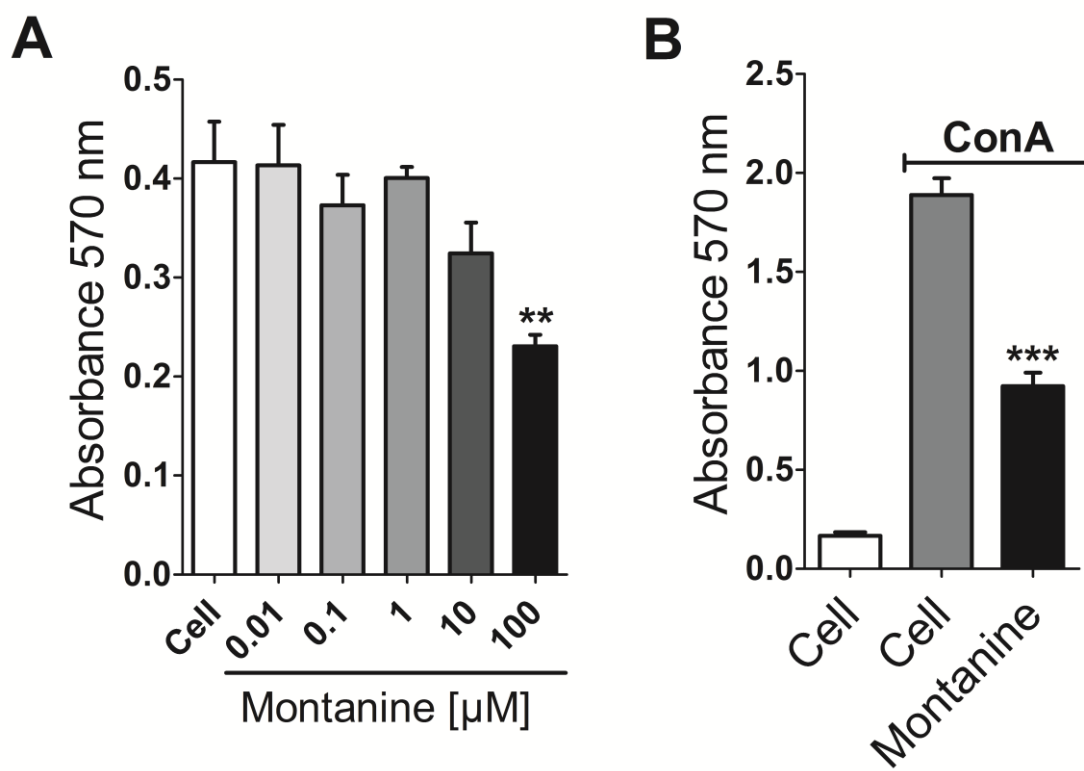
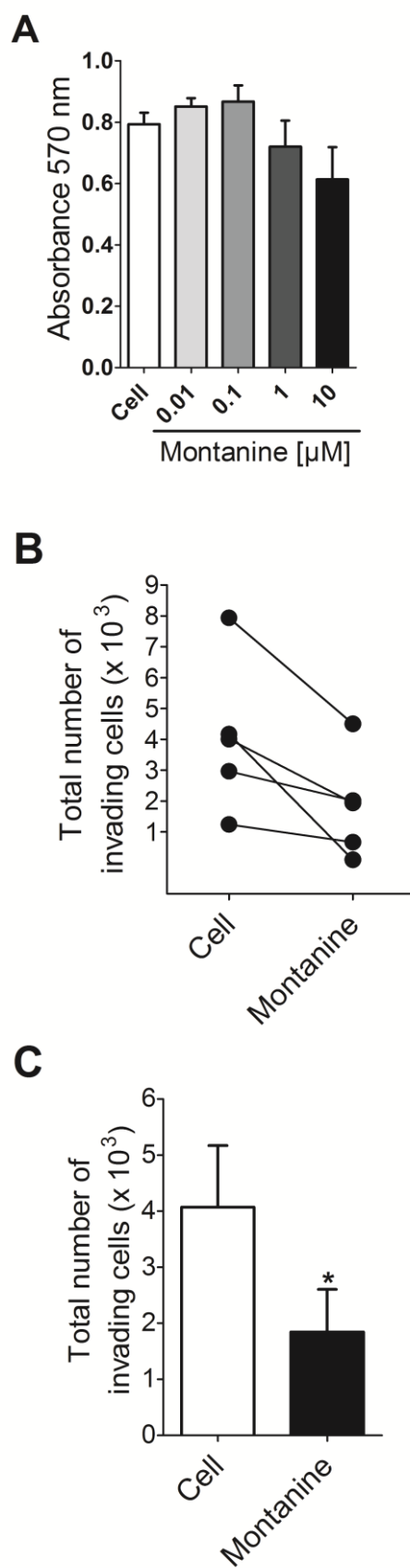


Figure 5.



## **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente trabalho demonstrou que o alcaloide montanina apresenta ação anti-inflamatória em modelos de artrite aguda e crônica, bem como uma ação de modulação sobre linfócitos B circulantes de camundongos saudáveis e sobre a proliferação de linfócitos e a invasão de fibroblastos sinoviais em cultura.

Esses resultados sugerem que a montanina apresenta potencial para se tornar uma nova classe de drogas para o tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes como a artrite reumatoide, através de uma abordagem combinada de ação anti-inflamatória e de supressão de importantes fenótipos celulares envolvidos com a patogênia dessa doença.

## 9. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir da confirmação do efeito protetivo da doença em modelos murinos de artrite e do efeito em células chave envolvidas com a doença, novas abordagens dentro deste projeto seguem com a perspectiva de aprofundar o conhecimento sobre a molécula e seus mecanismos de ação, através dos seguintes passos:

- Avaliação *in vitro* da absorção, distribuição, metabolismo e eliminação da montanina;
- Avaliação da farmacocinética e farmacodinâmica da molécula;
- Avaliação da ligação da montanina em receptor, através de estudos *in silico* de modelagem molecular e da confirmação a partir de testes *in vitro* e *in vivo*;
- Avaliação de possíveis mecanismos intracelulares relacionados à ação do alcaloide.

Por fim, estudos nessa linha de pesquisa irão seguir com o objetivo de realizar a progressão dos conhecimentos adquiridos na pesquisa básica para a pesquisa clínica e, de forma efetiva final, realizar a translação dos conhecimentos para o uso e proveito da população em geral.

## 10. ANEXOS

## ANEXO I – FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL DE AIA

**Artrite induzida por antígeno (AIA)**

Camundongos Balb/c machos  
(8-12 semanas, 20-25 gramas)

**Dia 0**

Imunização com 500 µg mBSA em 200 µl de Salina 0.9% e CFA 1:1

**Dia 7**

Imunização com 500 µg mBSA em 200 µl de Salina 0.9% e IFA 1:1

**Dia 14**

Imunização com 500 µg mBSA em 200 µl de Salina 0.9% e IFA 1:1

**Grupo Veículo**  
salina 0,9% (n=6)

**Grupo Montanina**  
0,3 mg/kg (n= 6)  
1 mg/kg (n=6)  
3 mg/kg (n=6)

**Início do tratamento**

100 µl via intraperitoneal  
Duas doses: 24 horas e 30 minutos antes de injeção ia

**Dia 21**

**Injeção intra-articular no joelho esquerdo**  
30 µg de mBSA em 10 µl de salina 0,9%

**Avaliação da nocicepção de pata**  
Tempos: 0, 3, 5 e 24 h após injeção ia

**Lavado intra-articular**

Avaliação da migração de leucócitos  
para a articulação do joelho esquerdo

## ANEXO II – FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL DE CIA COM PROTOCOLO DE TRATAMENTO PRÉ-CLÍNICO

### Artrite induzida por colágeno (CIA) Protocolo de tratamento pré-clínico



Camundongos DBA/1J machos  
(8-12 semanas, 18-22 gramas)



**Dia 0**

**Imunização**

Imunização com 70 µl de emulsão com 2 mg/ml de CII  
e de CFA (2 mg/ml *M. tuberculosis*) 1:1



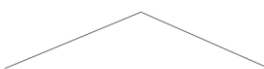
**Dia 18**

**Booster**

Imunização com 70 µl de emulsão com 2  
mg/ml de CII em IFA 1:1

**Ínicio do tratamento**

100 µl intraperitoneal  
2x/dia por 15 dias



**Grupo Veículo**

salina 0,9% (n=6)

**Grupo Montanina**

0,05 mg/kg (n=6)

0,25 mg/kg (n=6)

0,5 mg/kg (n=6)

**Avaliação do escore clínico**



**Dia 33**

**Morte**



**Coleta das articulações tibiotarsais**

Escore histológico de severidade

## ANEXO III – FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL DE CIA COM PROTOCOLO DE TRATAMENTO CLÍNICO

### Artrite induzida por colágeno (CIA) Protocolo de tratamento clínico



Camundongos DBA/1J machos  
(8-12 semanas, 18-22 gramas)



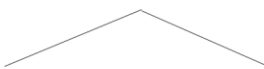
#### Dia 0 Imunização

Imunização com 70 µl de emulsão com 2 mg/ml de CII  
e de CFA (2 mg/ml *M. tuberculosis*) 1:1



#### Dia 18 Booster

Imunização com 70 µl de emulsão com 2  
mg/ml de CII em IFA 1:1



**Grupo Veículo**  
salina 0,9% (n=7)

**Grupo Montanina**  
0,5 mg/kg (n= 7)  
1,5 mg/kg (n=7)



#### Avaliação do escore clínico e nocicepção



Primeiro sinal clínico de doença

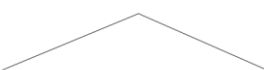
#### Ínicio do tratamento

100 µl intraperitoneal  
2x/dia por 10 dias



10 dias após o início da doença

#### Morte



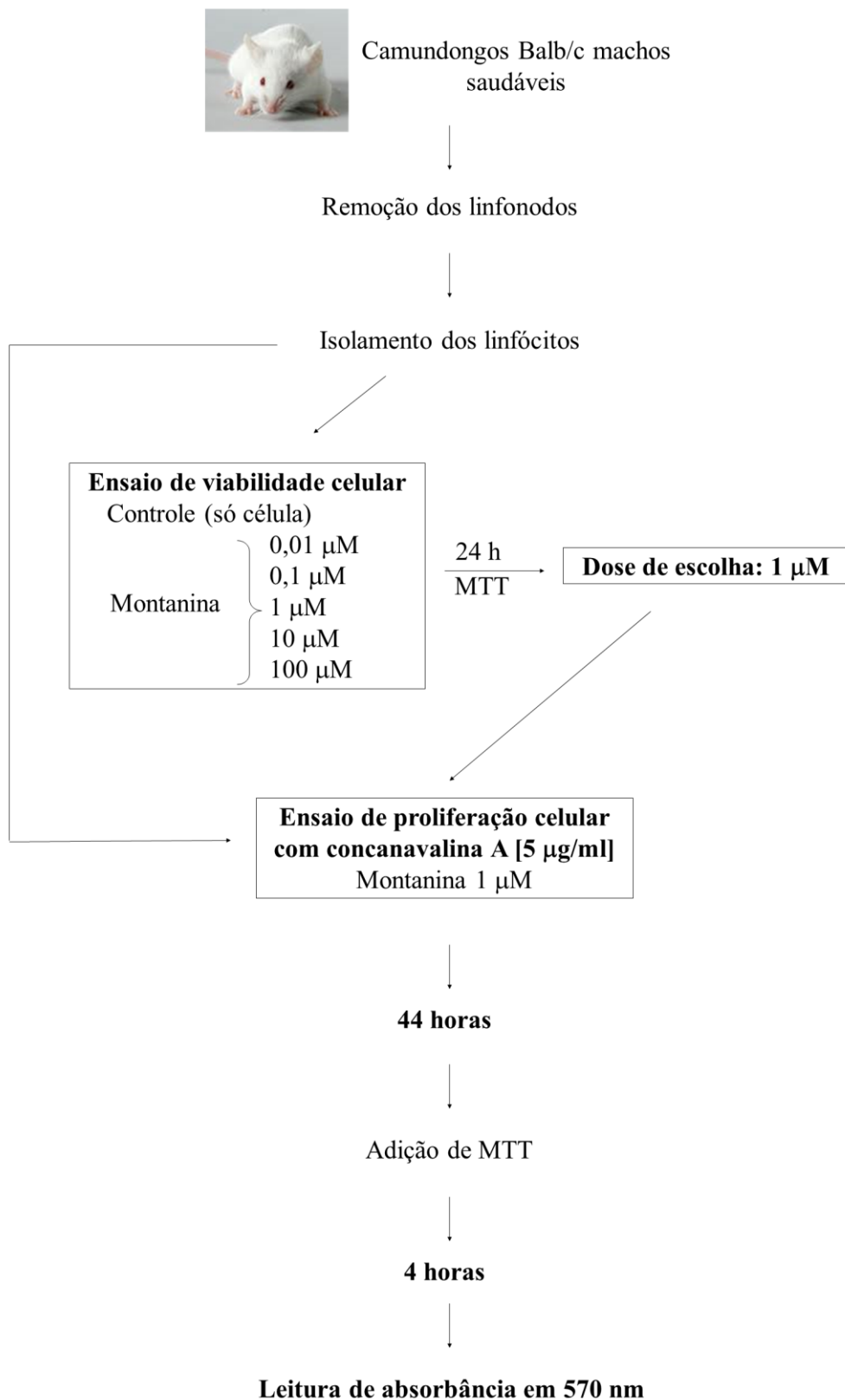
**Coleta das articulações tibiotarsais**  
Escore histológico de severidade

**Coleta do fígado**  
Análise histológica de toxicidade



## ANEXO IV – FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL DA AVALIAÇÃO *IN VITRO* SOBRE LINFÓCITOS

### Ensaio *in vitro* - efeito sobre linfócitos



## ANEXO V – FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL DA AVALIAÇÃO *IN VITRO* SOBRE FLS

### Ensaio *in vitro* - efeito sobre FLS



Camundongos DBA/1J machos  
artríticos



Remoção das articulações afetadas



Isolamento dos FLS



**Após 5 passagens (tripsinizações)**

Obtenção de cultura purificada de FLS

