



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**Efeito Anti-inflamatório do Extrato da folha de *Pouteria nuda* na Artrite Induzida
por Adjuvante em Ratos Lewis**

Bolsista: Marcelo Miguel Brito de Oliveira, CNPq

MANAUS
2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA



RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0083/2011

**Efeito Anti-inflamatório do Extrato da folha de *Pouteria nuda* na Artrite Induzida
por Adjuvante em Ratos Lewis**

Vínculo:

**Projeto AÇÃO DO EXTRATO DE *Pouteria nuda* (Sapotaceae) EM ARTRITE INDUZIDA POR
ADJUVANTE EM RATOS LEWIS**

Instituição executora:

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

Órgão financiador:

CNPq

Processo aprovado número 482672/ 2010-2 - Edital MCT/CNPq 14/2010 – Universal

Bolsista: Marcelo Miguel Brito de Oliveira, CNPq
Orientador: Prof. Doutor José Fernando Marques Barcellos
Voluntários: Andrey Amorim de Lima
Silvania da Conceição Furtado

MANAUS
2011

RESUMO

A artrite reumatóide (AR) é a artropatia crônica inflamatória de maior prevalência e que mais causa invalidez, seja temporária ou permanente, a qual possui muitos de seus mecanismos fisiopatológicos ainda por serem elucidados. Sabe-se que AR é uma doença auto-imune, apresenta inflamação grave principalmente nas articulações periféricas de modo simétrico, resultando em destruição da cartilagem, erosão óssea e deformação das articulações. Apesar do avanço na compreensão sobre a AR ter possibilitado uma melhor apreciação dos reais mediadores da lesão articular, o que tem embasado a busca de terapias que suprimam essas moléculas pró-inflamatórias, como as que inibem o TNF- α , uma proporção significativa de pacientes com AR apresenta falha na resposta ou intolerância aos fármacos inibidores dessas moléculas, sendo ainda relatados muitos casos de toxicidade no uso dessas terapias, o que demonstra a necessidade de novas abordagens. Alternativas terapêuticas cada vez mais populares por sua eficácia no tratamento de diversas doenças são os fitoterápicos. Várias espécies de *Pouteria* (Família Sapotaceae) têm sido utilizadas na medicina popular para tratar febre, inflamação, dores nas costas, erupções da pele, úlceras e até diabetes. A espécie *Pouteria nuda*, apesar de possuir poucos estudos ao seu respeito, em trabalhos *in vitro* tem demonstrado ação anti-tumoral, aumento da atividade bactericida e da atividade hemolítica. Diante do bom desempenho de várias espécies da família Sapotaceae contra inúmeros distúrbios entre os quais os inflamatórios, e considerando o grande papel dos modelos experimentais como ferramentas indispensáveis para estudos terapêuticos, propõe-se a avaliação do efeito *in vivo* dos extratos da folha de *Pouteria nuda* sobre a artrite adjuvante, através do consagrado modelo de artrite adjuvante induzida em ratos Lewis.

FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

Figura 1. Caracterização da artrite reumatóide	8
Figura 2. Medida de Diâmetro de Pata Dianteira com edema <i>Grau 2</i>	23
Figura 3. Pápula do inoculado após 14 dias da inoculação.	24
Figura 4. Cinética de Artrite a em Modelo AIA mostrando pico máximo de artrite em torno do 200 dia de experimento.	25
Figura 5. A seta indica úlcera no local de inoculação relacionada a edema precoce e severidade.	26
Figura 6. Fotodocumentação para demonstração dos Escores de Artrite	28
Figura 7. Melhor efeito terapêutico esteve entre 75 e 150ug/ semana.	30
Figura 8. A Curva Dose-Resposta mostrou que doses acima de 150µg/semana não produzem efeito adicional para redução de edema.	30
Gráfico 1. Cinética de Artrite (Linha Azul) e Curva Padrão após Análise de Regressão.	25
Gráfico 2. Boxplot individual do diâmetro das patas traseiras em grupos de quatro animais.	27
Tabela 1. Principais resultados observados neste trabalho e sugestão de padrões para o modelo AA.	28

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	6
1. REVISÃO DE LITERATURA	7
1.1 ARTRITE REUMATÓIDE (AR)	7
1.1.1 CONCEITO E PREVALÊNCIA	7
1.1.2 FISIOPATOGENESE DA AR	7
1.1.3 TRATAMENTOS NA AR	8
1.2 FITOTERÁPICOS	10
1.3 MODELOS ANIMAIS	11
1.3.1 MODELO MURINO DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE (AIA)	12
1.3.2 MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND	13
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS	15
4. MÉTODOS	16
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO	16
4.2 ANIMAIS	17
4.3 O MÉTODO ANESTÉSICO COM HALOTANO	17
4.4 ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE	18
4.5 VIA DE ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO DA <i>Pouteria nuda</i>	16
4.6 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA	19
4.7 EUTANÁSIA	19
4.8 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	19
4.8.1 ESTEREOLOGIA	19
4.9 ESTATÍSTICA	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÃO	31
6. CRONOGRAMA	32
7. REFERÊNCIAS	33

INTRODUÇÃO

A artrite reumatóide (AR) é uma doença auto-imune que afeta vários sistemas do organismo à medida que a doença progride, sendo mais notável no quadro clínico a inflamação crônica que surge nas articulações. De etiologia desconhecida e, atualmente, sem cura, em poucos anos a deterioração articular demonstra-se altamente incapacitante, o que prejudica o desempenho laborativo dos pacientes e acarreta consideráveis gastos públicos com tratamentos que se apresentam apenas moduladores ou remissivos, além de propiciarem importantes efeitos colaterais tanto maiores quanto maior o tempo de uso, potência da droga e dose.

Diante desse cenário, tornam-se indispensáveis novos esforços na busca de drogas efetivas contra o processo inflamatório crônico, tal qual o da AR, e que, ao mesmo tempo, tragam consigo menos para-efeitos e/ou menos impacto econômico relacionado ao uso prolongado do fármaco. Para tanto, pesquisadores lançam mão de opções inovadoras de tratamento como os fitoterápicos, com cada vez mais caracterização bioquímica e eficácia comprovada em estudos controlados por placebo.

A família Sapotaceae abriga inúmeras espécies de plantas, incluindo as do gênero *Pouteria*, as quais têm sido popularmente utilizadas para tratar febre, inflamação, erupções cutâneas e até diabetes. A espécie *Pouteria nuda*, identificada na Reserva Adolpho Dunke, em Manaus, apresentou, *in-vitro*, excelentes resultados bactericidas (Carneiro *et al.*, 2008) e anti-tumorais (Carneiro, 2007), o que inspirou a curiosidade em observar sua atuação diante de um modelo experimental de inflamação crônica, como a artrite induzida por adjuvante em ratos.

Entre os modelos experimentais de artrite, o modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund em ratos Lewis demonstrou-se muito eficiente em gerar um quadro de inflamação crônica articular ao longo de seus mais de 50 anos de existência. Isso é justificado pela suscetibilidade inata dessa linhagem a responder de modo intenso a um estímulo inflamatório, o que permite a realização e reprodutibilidade de inúmeros estudos relacionados ao teste de terapias candidatas a futuros tratamentos para quadros semelhantes em seres humanos.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 ARTRITE REUMATÓIDE

1.1.1 CONCEITO E PREVALÊNCIA

A artrite reumatóide (AR) é a artropatia crônica inflamatória de maior prevalência e que mais causa invalidez, quer temporária, quer permanente, a qual possui muitos de seus mecanismos fisiopatológicos ainda por serem elucidados (Silva Júnior; Rocha, 2006). Sabe-se que AR é uma doença auto-imune, apresenta inflamação crônica principalmente nas articulações periféricas de modo simétrico, resultando em destruição da cartilagem, erosão óssea e deformação das articulações (Zeidler *et al.*, 1998). Acomete duas a três vezes mais as mulheres do que os homens (Kumar *et al.*, 2005) e tende a aparecer na quarta década de vida, com pico de incidência na quinta década (Alamanos; Drosos, 2005).

A morbidade e mortalidade nos pacientes com artrite reumatóide apresentam-se maiores se comparados com a população normal, implicando na redução em dez anos da expectativa de vida (Symmons *et al.*, 1998). Cerca de 50% dos pacientes são considerados incapacitados para o trabalho neste período de evolução (Young *et al.*, 2007).

1.1.2 FISIOPATOGÊNESE DA ARTRITE REUMATÓIDE

Acredita-se que a AR seja uma doença auto-imune desencadeada pela exposição de um hospedeiro geneticamente suscetível a um antígeno artritogênico desconhecido. É a manutenção da reação auto-imune, com ativação das células T helper CD4+ e outros linfócitos, e a liberação local de outros mediadores e citocinas que destroem a articulação, pela formação de tecido inflamatório infiltrativo – *pannus* –, erosão da cartilagem e erosão óssea (Kumar *et al.*, 2005). Entre esses mediadores têm destaque o Fator de Necrose Tumoral (TNF) e a Interleucina – 1 (IL-1), citocinas pró-inflamatórias primárias (Range *et al.*, 2008) as quais têm sido alvo de terapias anti-citocina, especialmente contra o TNF (Kumar *et al.*, 2005).

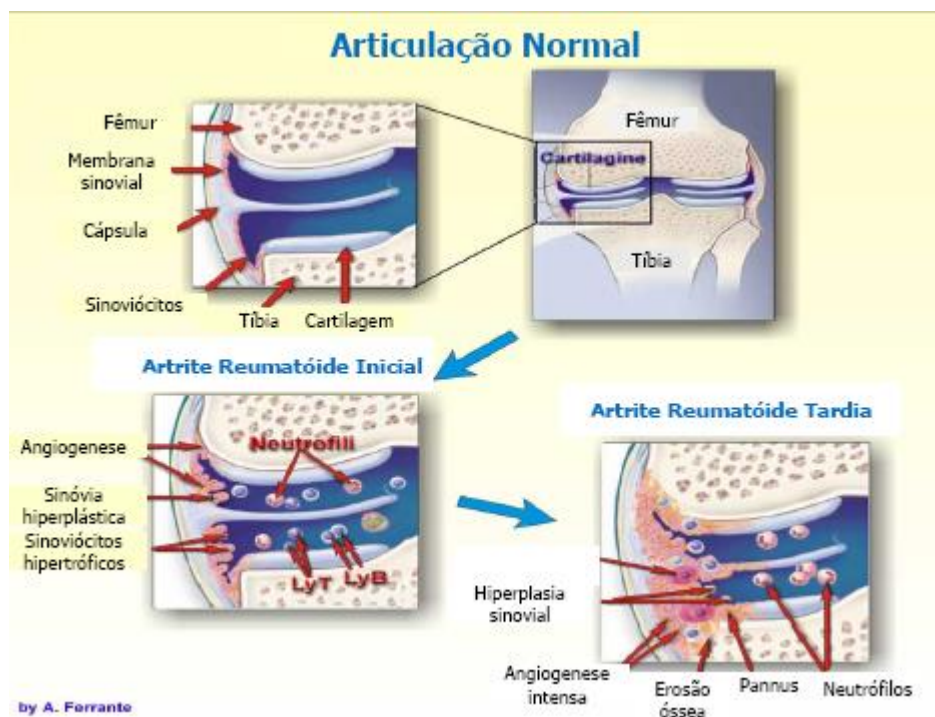


Figura 1. Caracterização da artrite reumatóide. Oliveira (2008).

1.1.3 TRATAMENTOS NA ARTRITE REUMATÓIDE

Segundo Kumar *et al.* (2005), talvez o principal avanço na compreensão sobre a AR tenha sido uma melhor apreciação dos reais mediadores da lesão articular, o que tem embasado a busca de terapias que suprimam essas moléculas pró-inflamatórias, como as que inibem o TNF- α . No entanto, uma proporção significativa de pacientes com AR e que apresentam falha na resposta ou intolerância aos fármacos inibidores de TNF- α tem indicado que outras moléculas inflamatórias ou vias imunológicas conduzem à síndrome clínica nessa população (Finger; Schneinberg, 2007). É devido a esse mosaico fisiopatogenético da doença e desconhecimento de meios para a cura ou prevenção, que instituições como o Colégio Americano de Reumatologia recomendam um possível diagnóstico precoce e tratamento com agentes anti-reumáticos, a fim de diminuir o avanço da doença para um estágio de dano articular irreversível. A problemática encontrada na maioria dos casos, mesmo com o diagnóstico precoce, é que as medicações disponíveis são limitadas em eficácia, pois só há supressão do

processo inflamatório, seja de forma imediata, mas fulgax (esteróides e anti-inflamatórios não hormonais), ou pela modificação, a longo prazo, do curso da doença (metotrexate, hidroxicloroquina, sulfassalazina, leflunamide, ciclosporina-A), além da significativa toxicidade em muitos casos (Soeken *et al.*, 2003; O'Dell, 2004).

O tratamento da AR deve ser iniciado o mais rápido possível, a fim de induzir o controle da doença e, preferencialmente, sua remissão (Fries *et al.*, 1996). Vários estudos têm demonstrado melhor resposta terapêutica, menor destruição articular e menor perda funcional nos pacientes tratados mais precocemente, no primeiro ano dos sintomas (Emery, 1994; Van Der Horst-Bruinsma *et al.*, 1998).

O metotrexato, um imunossupressor largamente utilizado a partir dos anos 80, é atualmente reconhecido como a droga de referência para o tratamento da AR. Se usado como monoterapia, é capaz de controlar as manifestações clínicas, levar a melhora funcional e deter a progressão radiológica (Choi *et al.*, 2002). Foi também demonstrada a sua capacidade de intervir com o prognóstico da doença, sendo implicado na redução da mortalidade cardiovascular associada à AR (Carette, 2007).

As recentes terapias biológicas aprovadas para o tratamento da AR, produzidas por tecnologia de proteínas recombinantes e projetadas especificamente para influenciar a resposta imune podem ser divididas em dois grupos: os agentes anti-TNF, já com aproximadamente 10 anos de experiência de uso, e os mais recentes agentes aprovados para uso comercial no Brasil entre 2006-2007, os quais têm diferentes mecanismos de ação (Oslen, 2004).

A citocina TNF, pró-inflamatória, é liberada por monócitos ativados, macrófagos, linfócitos T, fibroblastos, células endoteliais e está profundamente envolvida na patogênese da AR. Vários inibidores de TNF foram e estão sendo desenvolvidos para o tratamento da AR. Atualmente, três estão disponíveis para uso comercial, dois anticorpos monoclonais anti-TNF (um quimérico – Infliximab – e outro totalmente humano – adalimumabe) e um receptor solúvel do TNF (etanercepte – proteína de fusão composta do receptor TNF ligado à porção Fc de uma imunoglobulina humana) (Oslen, 2004).

Terapêuticas biológicas que não têm o TNF como alvo, como o Rituximab e Abatacepte, já foram aprovados para o tratamento da AR (Edwards, 2004; Kremer *et al.*, 2006).

O Rituximab, anticorpo monoclonal quimérico anti-CD20, antígeno presente na superfície dos linfócitos B, foi liberado para uso em pacientes com artrite reumatóide refratária às drogas modificadoras de curso da doença habituais e aos agentes anti-TNF. Sua eficácia destacou o papel do linfócito B na AR, quer como precursor dos plasmócitos produtores de anticorpos e, portanto, capaz de formação de complexos imunes e ativação de complemento, quer como produtor de citocinas, apresentador de antígenos para o linfócito T e capaz de expressar sinais co-estimulatórios (Kremer *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2006).

No entanto, essas terapias ainda apresentam efeitos adversos significativos e devem ser mantidas por longo prazo, pois não são curativas da doença (Guidelines, 2002). Pacientes com AR têm risco aumentado de infecção, incluindo infecções granulomatosas como a tuberculose, particularmente de pulmão, ossos/articulações e pele com o uso de terapias biológicas (Doran *et al.*, 2002). Parece haver risco adicional quando administradas em combinação com outras terapias tradicionais para AR (Genovese *et al.*, 2004). Também há risco aumentado de desenvolvimento de linfomas em pacientes com AR tratados com inibidores do TNF, mas ainda não é consenso se esse risco se deve à doença de base em suas formas mais graves ou ao agente anti-TNF propriamente dito (Desai *et al.*, 2006). Outros efeitos adversos relatados com os agentes anti-TNF incluem descompensação de insuficiência cardíaca, desenvolvimento de auto-anticorpos, e anticorpos anti-DNA, citopenias, elevação de enzimas hepáticas, vasculites cutâneas e síndromes desmielinizantes. Dessa forma, novas formas de terapia necessitam ser exploradas continuamente.

1.2 FITOTERÁPICOS

Alternativas terapêuticas que cada vez mais geram publicações são os fitoterápicos. Populares como preparações de plantas medicinais com histórico de eficácia comprovada – e tema de vários estudos em pacientes com doenças reumáticas (Rosa;

Machado 2007) – muitos já possuem caracterização bioquímica e provas de eficácia em testes clínicos controlados por placebo. A família Sapotaceae tem cerca de 1250 espécies de plantas, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia e da América do Sul (Swenson e Anderberg, 2005). Como exemplos de uso terapêuticos, a *Vitellaria paradoxa* tem sido utilizada para fins analgésicos (Lawal *et al.*, 2010) e a *Pouteria campechiana* é usada como antipirético no México e para tratamento de erupções cutâneas em Cuba (Manosroi *et al.*, 2005).

Várias espécies de *Pouteria* (Família Sapotaceae) têm sido utilizadas na medicina popular para tratar febre, inflamação, erupções da pele, úlceras, diabetes (Ma *et al.*, 2004; Montenegro *et al.*, 2006), diarreias (Perfeito *et al.*, 2005), náuseas, vômitos, dores nas costas, além de estimular a lactação em mães que estão amamentando (Manosroi *et al.*, 2006). A espécie *Pouteria nuda*, apesar de possuir poucos estudos ao seu respeito, em trabalhos *in vitro*, tem demonstrado ação citotóxica em células tumorais do Sistema Nervoso Central (SF295) e de mama (MDA-MB435) (Carneiro, 2007), aumento da atividade bactericida contra *Mycobacterium smegmatis*, *Escherichia coli* e *Streptococcus oralis* (Carneiro *et al.*, 2008). Diante desse potencial terapêutico do gênero *Pouteria* e da evolução da fitoterapia ao longo dos tempos, desde as preparações mais rudimentares até as formas farmacêuticas mais sofisticadas (Rosa; Machado, 2007), propõe-se o estudo da Sapotacea *Pouteria nuda* como possível agente anti-inflamatório, em um modelo experimental de artrite induzida por adjuvante em ratos Lewis.

1.3 MODELOS ANIMAIS

O surgimento e aprimoramento de diversas condutas terapêuticas para enfermidades que acometem o ser humano tiveram como uma etapa para o seu desenvolvimento a experimentação animal. São alguns exemplos a criação de vacinas contra muitas doenças, técnicas para transplante de órgãos e métodos para o uso de fármacos anestésicos, antidepressivos, além da descoberta da insulina, entre incontáveis outras contribuições que o uso de animais de laboratório trouxe para o avanço do conhecimento tecnológico e científico (Chorilli *et al.*, 2007). No âmbito da

AR, encontram-se trabalhos recentemente publicados como o estudo dos efeitos profiláticos e terapêuticos dos ácidos graxos do mexilhão australiano *Mytilus edulis* na artrite adjuvante induzida em ratos Wistar (McPhee *et al.*, 2010), a inibição da via de sinalização do NF-κB por Fusadil como uma potencial estratégia terapêutica para a artrite reumatóide, testada em fêmeas de ratos Lewis (Okamoto *et al.*, 2010), e o papel protetor da regulação mediada por proteínas hsp65 na artrite autoimune, um trabalho também realizado com ratos Lewis (Durai *et al.*, 2009).

Esses três trabalhos sobre estudos terapêuticos experimentais contra a AR (McPhee *et al.*, 2010; Okamoto *et al.*, 2010; Durai *et al.*, 2009) têm em comum a indução de uma inflamação crônica nas articulações de ratos através da injeção intradérmica de uma suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium butyricum* em parafina líquida. Tal suspensão é conhecida como Adjuvante Completo de Freund. A artrite induzida por adjuvante (AA) é um modelo muito usado porque reproduz em laboratório, com bastante similaridade clínica e histopatológica, a artrite reumatóide humana (Knight *et al.*, 1992; Mia *et al.*, 2008; Banik *et al.*, 2002).

1.3.1 MODELO MURINO DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE

O modelo de artrite induzida por adjuvante (AA) foi o primeiro modelo experimental de artrite descrito em 1956 (Pearson, 1956; Waksman, 1962), em um tempo em que as doenças auto-imunes afetavam o sistema nervoso central, sistema nervoso periférico, tireóide e olhos, e a auto-imunidade começou a ser considerada um mecanismo significativo na patogênese da doença inflamatória específica do órgão (Waksman, 1962).

A AA tem sido um modelo experimental amplamente estudado por possuir inúmeras semelhanças com a artrite reumatóide humana (AR) em termos de histopatologia e respostas a drogas anti-inflamatórias e imunomoduladoras (Pearson, 1956). Embora a etiologia da AA não seja totalmente conhecida, estudos indicam que os linfócitos T, macrófagos e células sinoviais proliferantes desempenham os principais

papéis no desenvolvimento e manutenção da doença (Bersani-Amado *et al.*, 1990). O fator de necrose tumoral (TNF), as interleucinas (IL-1 e IL-6) e as prostaglandinas têm sido apontados como os principais mediadores da patogênese da AR por modularem a migração de células, a ativação de células T e B, proliferação sinovial e a destruição da cartilagem e erosão óssea (Choy *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 1996).

A artrite induzida por adjuvante é um processo subagudo desencadeado após uma injeção intradérmica de micobactéria ou organismo similar emulsificado em óleo adjuvante na base da cauda de ratos Lewis (Pearson, 1956). É uma doença poliarticular que afeta, primariamente, os tornozelos, punhos e pequenas articulações, incluindo as articulações interfalangeanas terminais. A primeira lesão é uma sinovite severa, seguida por periartrite, peritendinite e periostite, formação de *pannus* (tecido sinovial proliferativo com características invasivas locais), com destruição da cartilagem, destruição óssea e, finalmente, fibrose ou anquilose óssea. As lesões iniciam-se com infiltração de linfócitos e histiócitos sobre pequenos vasos e as mudanças secundárias incluem edema, deposição de fibrina e focos de necrose com presença de vários granulócitos acompanhados pela proliferação de sinoviócitos e fibroblastos, ativação de osteoblastos e osteoclastos e destruição óssea (Van Eden *et al.*, 1985).

Deste modo, o modelo de artrite induzida por adjuvante permite avaliar parâmetros da resposta inflamatória imunomediada. Estudos comparativos entre animais artríticos tratados com drogas que interferem mais especificamente sobre a resposta inflamatória ou a resposta imunológica podem auxiliar no entendimento dos mecanismos implicados na evolução da artrite reumatóide (Granado *et al.*, 2005).

1.3.2 MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND

O modelo experimental de artrite induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA) em ratos é muito empregado na investigação de novas terapias para artropatias inflamatórias crônicas, como a artrite reumatóide (Joe; Wilder, 1999). Nesse modelo, a artrite é induzida através da injeção intradérmica na base da cauda de uma suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium butyricum* em parafina líquida

(Knight *et al.*, 1992; Mia *et al.*, 2008; Banik *et al.*, 2002). O CFA atua como estímulo de respostas imunológicas a antígenos, incluindo imunidade celular e aumento da produção de certas imunoglobulinas, levando ao desenvolvimento de uma reação articular inflamatória intensa dependente de células T. Há aumento persistente da produção local e sistêmica de TNF, IL-1 beta, e IL-6. O desenvolvimento da artrite induzida por CFA inicia-se 4 a 7 dias após a inoculação. Por apresentar características inflamatórias, incluindo elevação de citocinas e resposta variável a diferentes drogas imunossupressoras, esse modelo tem-se demonstrado útil no estudo de mecanismos imunopatogênicos da artrite reumatóide e no estudo pré-clínico de novas terapias (Inglis *et al.*, 2005).

Um ponto crucial na escolha do modelo experimental é a suscetibilidade do animal à indução, que varia de acordo com a linhagem de rato utilizada e o antígeno indutor. Inúmeras publicações têm demonstrado uma tendência por parte dos pesquisadores à indução de AA em ratos Wistars com *M. tuberculosis* e em Lewis com *M. butyricum* (Duplet *et al.*, 2006; Oliveira, 2008; Sauzen *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2006). Ao estudar a susceptibilidade à AA entre essas duas linhagens, foi detectada uma incidência de artrite de 100% em ratos Lewis e de 64% em Wistars, induzidos com *M. butyricum* (Banik *et al.*, 2002). A explicação para a grande incidência em Lewis estaria na característica inata desta linhagem de superprodução de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF- α , enquanto os Wistars apresentam os mesmos mediadores em resposta ao mesmo estresse inflamatório, porém em níveis séricos mais baixos (Banik *et al.*, 2002).

2. JUSTIFICATIVA

A justificativa do presente estudo é advinda da necessidade de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da artrite reumatóide (AR), as quais, quando propostas, devem ser testadas em modelos animais. Estes precisam ter facilidade de implementação, animais acessíveis, boa reprodutibilidade e as condições mais próximas possíveis da artrite reumatóide humana. Um modelo que atende muito bem a esses requisitos é a artrite induzida por adjuvante completo de Freund em ratos Lewis,

cujo indutor pode ter como antígeno *Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium butyricum*. Propõe-se o estudo da atividade anti-inflamatória da *Pouteria nuda* na AR *in-vivo*, por não haver trabalhos com esta espécie nessa vertente e devido ao potencial terapêutico no tratamento da inflamação detectado em outras espécies da família Sapotaceae.

2.1 JUSTIFICATIVA DE RENOVAÇÃO DO PROJETO

Justifica-se a renovação do projeto para o próximo período 2011/2012, tendo em vista que o mesmo está vinculado ao Projeto DINTER No. 482672/2010-2 – Edital MCT/CNPQ 14/2010 – Universal, com verba liberada em dezembro de 2010, material de consumo dependente de importação disponibilizado somente em abril de 2011 e a confecção das lâminas das articulações, microscopia para estudo histopatológico, tabulação e análise dos resultados levarem 8 meses para serem concluídos. Deste modo, de posse dos dados dos experimentos pilotos realizados até o momento, a avaliação terapêutica está prevista para o segundo semestre de 2011, estabelecendo-se tempo hábil para preparação do biotério e aclimatação dos animais. Ficando o primeiro semestre de 2012 destinado à tabulação, análise e divulgação dos resultados.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito terapêutico do extrato da folha de *Pouteria nuda* no modelo experimental de artrite induzida por Adjuvante Completo de Freund em ratos Lewis.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Reproduzir o modelo de artrite por adjuvante completo de Freund (CFA) em ratos Lewis.
- B) Padronizar a dose de metotrexato a ser usada no grupo controle.
- C) Avaliar o efeito da terapia com extrato aquoso, da folha de *P. nuda*, através de um escore clínico de edema, comparando-o entre os grupos tratados e os grupos controle.
- D) Avaliar o efeito do extrato aquoso da folha de *P. nuda* na inflamação crônica articular através de histopatologia.

4. MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

O extrato aquoso da *Pouteria nuda*, planta coletada na Reserva Adolpho Ducke, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), será cedido pelos doutores Adrian Martin Pohlit (INPA) e Ana Lúcia Basílio Carneiro (UFAM-Estudos em Biotecnologia).

A *Pouteria nuda* é uma espécie do gênero *Pouteria*, da família Sapotaceae e não possui ainda nome popular. Foi coletada e processada para obtenção dos extratos utilizando-se água, metanol e clorofórmio como solventes. Os extratos obtidos das folhas, galhos e cascas tiveram um teor extrativo variando entre 7 e 30%, onde o melhor rendimento foi obtido com o extrato aquoso das folhas (32,15%) (Carneiro, 2007).

4.2 ANIMAIS

Todos os procedimentos experimentais descritos neste trabalho foram aprovados pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL da Universidade Federal do Amazonas (CEEA-UFAM) e registrados sob o número de protocolo 015/2010.

Os experimentos serão realizados com ratos Lewis machos, com idade entre 5 a 6 semanas (190-210g), mantidos sob condições ambientais controladas ($24^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de 40-60%, ciclos dia/ noite alternados de 7 às 19 h, comida e água *ad libitum*). Colocar-se-á 1 animal por gaiola e todos serão devidamente aclimatados uma semana antes dos experimentos. Os assoalhos das gaiolas serão forrados com pedaços de papel para minimizar a possibilidade de contato doloroso com a superfície dura (Zhang *et al.*, 2009).

Os grupos terão os seguintes tamanhos amostrais:

Grupo I: controle negativo – sem indução e sem tratamento (n=6).

Grupo II: controle positivo – com indução e sem tratamento (n=6).

Grupo III: com indução de AA e expostos ao tratamento com metotrexato (n=6).

Grupo IV: com indução de AA e expostos ao extrato aquoso (n=6).

4.3 O MÉTODO ANESTÉSICO COM HALOTANO E COMPOSTO DE XILASINA E CETAMINA

O Halotano é um anestésico inalatório potente, de fácil vaporização, não-inflamável e não-explosivo. Por não irritar as vias respiratórias, é um excelente anestésico para uso em ratos (Waynforth e Flecknell, 1991). De acordo com trabalhos já publicados a respeito da concentração adequada para ratos, pode ser feita a indução com concentração de 3%, durante um período de 2 a 3 min (Waynforth e Flecknell, 1991; Sauzen *et al.*, 2009). Como não serão realizados atos cirúrgicos longos, o método anestésico será limitado à indução, não sendo necessária a etapa de manutenção anestésica.

Para a indução, será utilizado o modelo de aparelho experimental para anestesia de animais de pequeno porte, desenvolvido por professores do departamento de

cirurgia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Vivas *et al.*, 2007). O dispositivo de fácil fabricação consiste dos seguintes materiais: uma câmara de indução (vol. 3.880 mL) (1) com válvula unidirecional (2), um cilindro de vidro parcialmente preenchido com água (3), um compressor (4), um tubo direcionador de fluxo em forma de Y conectado a dois reguladores de fluxo (5), um frasco de plástico (6) e um tubo de ensaio contendo uma agulha, onde o anestésico será colocado (7). O aparato permite a indução anestésica através da regulação do fluxo de anestésico para a câmara de indução com grandes ou pequenas bolhas.

Segundo (Waynforth e Flecknell, 1991), a associação de xilasina e cetamina (razão 3:2, respectivamente) também se demonstra como ótimo anestésico, de administração prática (injeção intramuscular, sem necessidade de aparatos) e com boa duração – aproximadamente, 50 min.

4.4 ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE (AA)

O CFA será preparado com 100 mg de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) mortos pelo calor e liofilizados, emulsificados em 20 ml de óleo mineral . O *Mycobacterium* deve ser macerado com 2 ml de óleo mineral em grau e pistilo por dois minutos e em seguida emulsificado nos 18 ml restantes, através de seringas conectadas por tempo superior a 10 minutos (Best, 1984).

Após a anestesia dos animais com halotano a 3% (inalação por 2-3 min) (Sauzen *et al.*, 2009; Waynforth e Flecknell, 1991), a área que receberá a injeção será depilada e uma solução de álcool iodado (1%) será aplicada nessa superfície para antissepsia. A indução da artrite será feita mediante injeção subcutânea de 200 μ L (0,2 ml) da solução de CFA (5mg/ml de Mtb) na base da cauda (Zhang *et al.*, 2009), com uma seringa de 1 mL e agulha 13 x 4,5 mm. Esse dia será chamado de dia 0 (zero). De acordo com experiências semelhantes quanto à linhagem de ratos e perfil do indutor (McPhee *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009) os primeiros sinais da artrite devem aparecer entre 8 a 11 dias após a injeção.

4.5 VIA DE ADMINISTRAÇÃO DOS EXTRATOS DA *Pouteria nuda*

O extrato de *P. nuda* será administrado por via oral, através de gavagem (intubação gástrica)(Chengelis, 2008). A dosagem administrada do extrato aquoso para todos os animais será de 10 mL/Kg (Chengelis, 2008).

4.6 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

A evolução do edema de pata será avaliada através do paquímetro digital MITUTOYO Série 500 “Absolut” (precisão de 0,02 mm). (Lima, 2008; Rodrigues *et al.*, 2007).

4.7 EUTANÁSIA

Seguindo as orientações de Waynforth e Flecknell (1991), a eutanásia será realizada através de overdose anestésica de pentobarbital (120 mg/Kg) administrado intraperitonealmente, o que levará os animais ao óbito devido à paralisia do músculo diafragmático e do coração, após um estágio de sonolência. Para assegurar o procedimento, deverá ser feito o deslocamento cervical subsequente.

Serão submetidos ao método os 24 animais, dois de cada vez.

4.8 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Após a eutanásia, a pata com artrite induzida será excisada e fixada em formol a 10% para preservação tecidual. Os pelos das patas serão cortados e a pele será mantida. As patas serão descalcificadas em solução de ácido nítrico a 10 % durante 27 horas (Oliveira, 2008). Em seguida as peças serão preparadas para histologia convencional (inclusão em parafina).

Os blocos de parafina serão cortados em série com a utilização de um micrótomo American Optical Spencer 820 para confecção das lâminas histológicas. As lâminas preparadas serão contra-coradas com Hematoxilina-Eosina e Alcian Blue pH 2.5.

As lâminas coradas serão analisadas e descritas e os melhores campos serão fotografados utilizando-se um microscópio Olympus BX41 acoplado a uma câmera fotográfica C35DX.

Será utilizado o protocolo descrito por Brenner *et al.* (2005) para avaliar os seguintes parâmetros da articulação tíbio-talar:

Histopatologia da Articulação – Protocolo de Interpretação

Animal: _____

1. Infiltrado Inflamatório Mononuclear
2. Hiperplasia Sinovial
3. Extensão da Formação de Pannus
4. Fibrose Sinovial
5. Angiogênese Sinovial
6. Erosão da Cartilagem
7. Erosão Óssea

4.8.1 ESTEREOLOGIA

Para a quantificação dos parâmetros histológicos descritos no protocolo de Brenner *et al.* (2005) propõe-se o uso da estereologia. Estudos estereológicos são cada vez mais freqüentes na literatura, particularmente nos campos do desenvolvimento/ evolução, patologia e neurociências. O desafio da estereologia é interpretar o arranjo estrutural tridimensional interno com base na análise de cortes da estrutura que mostram apenas uma informação bidimensional. São utilizados os métodos de avaliação de volume de Cavalieri e de Scherle. Um conjunto de ações é necessário para quantificar estruturas morfológicas adequadamente (sem viés e de

modo reproduzível): amostragem correta, cortes aleatórios e uniformemente isotrópicos (princípio de Delesse), ferramentas estereológicas atualizadas (disector, fractionator, nucleator, etc). Usando corretamente a estereologia pode-se realizar estudos quantitativos com pouco esforço. Eficiência em estereologia significa contar uma amostra de cortes mínima (pouco trabalho), gastando pouco (para preparar os cortes para análise), mas com boa acurácia (Lacerda, 2003).

O estudo estereológico será feito utilizando-se um sistema digital de processamento e análise de imagens em computador. O sistema consiste de Microscópio Leica, ao qual será acoplada uma microcâmara de vídeo Sony, que capta as imagens das lâminas histológicas. Cada componente histológico de interesse na articulação será analisado através dos princípios mencionados acima no programa para análise morfométrica Axio Visio, considerando o peso do animal. Serão gerados resultados quantitativos sobre a densidade volumétrica da sinóvia, da cartilagem articular, vasos sanguíneos, macrófagos, linfócitos e osso, o que permitirá avaliar o efeito das terapias em teste de modo reproduzível.

4.9 ESTATÍSTICA

Para a análise descritiva dos dados serão utilizadas ferramentas de estatística básica que serão expostas através de tabelas e gráficos variados.

Os resultados serão testados quanto a sua normalidade, independência e homocedacidade através de testes estatísticos. Caso os resultados apresentem comportamento aceitável para estes pressupostos, uma ANOVA para comparação entre grupos será aplicada. Testes para a diferença entre as médias serão feitos caso haja rejeição da hipótese nula, isto é, se confirme estatisticamente diferença entre as médias. Se os mesmos não satisfizerem estes pressupostos, testes não paramétricos serão aplicados.

O nível de significância adotado para todas as análises será de 5%. As análises estatísticas serão realizadas nos pacotes estatísticos R e/ ou Minitab.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PROTOCOLO PARA PADRONIZAÇÃO DO MODELO LOCAL DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE

O primeiro experimento piloto objetivou a reprodução do modelo experimental de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA), a fim de estabelecer o pico da artrite, considerando que o experimento será realizado na região amazônica, o que sugere a possibilidade de que a evolução natural da AA não obedeça fielmente o curso padronizado pela literatura.

O padrão evolutivo da AA mais descrito é caracterizado pelo surgimento dos primeiros sinais artríticos 7 dias após a inoculação do adjuvante de Freund (CFA) na base da cauda, com alterações histológicas articulares e edema de pata. O quadro progride com o agravamento das alterações e do edema por mais 7 dias. Em torno de 14 a 20 dias após a inoculação do CFA, o estado patológico é máximo, com as maiores alterações inflamatórias macro e microscópicas, fase chamada de pico. A partir deste ponto, o quadro involui naturalmente, o edema desaparece, restando apenas as modificações histológicas.

Por isso, é importante estabelecer muito bem esses momentos cruciais do modelo na linha do tempo, dado que a doença produzida no rato é auto-limitada, o que inspira cuidados para saber exatamente quando instituir as terapias e quando coletar as amostras para avaliar os efeitos, a fim de excluir do experimento a fase de involução natural da artrite, de modo que essa não seja falsamente confundida com um possível efeito positivo da terapia em teste.

Animais. Foram utilizadas 16 ratos Lewis, pesando entre 175 e 220g, mantidos aclimatados sob temperatura 18-24°C, com oferta de água e ração *ad libitum*. Os animais foram divididos em grupos de quatro ratos e mantidos em gaiolas apropriadas na sala de experimentação do Biotério Central da Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

Avaliação da Severidade de Artrite. A severidade de artrite foi avaliada pela medida do diâmetro das patas dianteiras e traseiras ao nível das metacarpo e metatarsofalangeanas, utilizando-se um paquímetro digital Starret® (Figura 1), sendo o diâmetro expresso em milímetros. Também foi obtido o Escore de Severidade de Artrite (ESA), segundo os graus: *Grau Zero* – sem artrite ou eritema; *Grau 1* - leve eritema ou edema de um dedo; *Grau 2* - eritema e edema em mais de um dedo; *Grau 3* - eritema e edema de tornozelo ou punho; *Grau 4* - completo edema e eritema dos dedos a tornozelo ou punho, além de incapacidade de dobrar o punho ou tornozelo. O escore foi obtido para as quatro patas de cada animal, num escore total de 16/animal. O Escore Total de Severidade (ETS) representa a soma dos escores totais dos animais que foram anotados nos dias 0, 7, 22, 29 e 40, podendo-se atingir um ETS 256 quando se considera que foram utilizados 16 animais neste experimento. As duas formas de avaliação de severidade de artrite, o diâmetro das patas e escore visual de severidade, foram obtidas por observadores diferentes nos mesmos dias. A partir dos Escores Totais de Severidade foi obtida a curva de cinética de artrite para este protocolo (Gráfico 1).



Figura 2. Medida de Diâmetro de Pata Dianteira com edema *Grau 2*. O paquímetro é posicionado junto as metacarpofalangeanas e não deve exercer pressão suficiente para deformar a articulação.

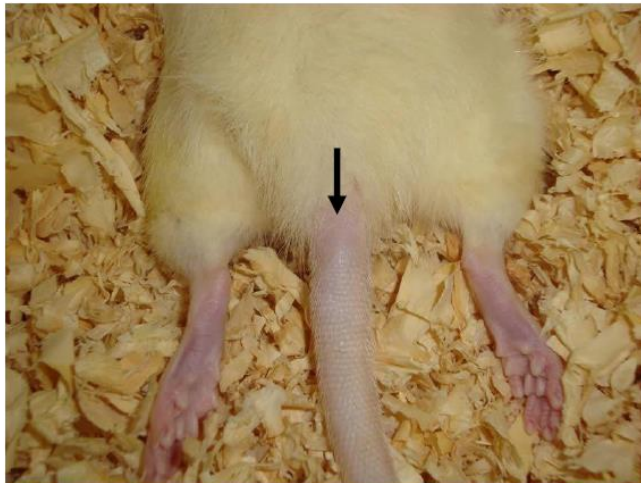


Figura 3. A seta indica a pápula do inoculado após 14 dias de inoculação, indicando que o procedimento foi realizado corretamente induzindo inflamação. Adicionalmente é possível visualizar o aspecto violáceo das patas traseiras com edema até o joelho, sem anquilose, caracterizando artrite *Grau 3* (14º dia).

Análise Estatística: Os diâmetros das patas expressos em milímetros foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) e através do teste de Tukey para comparação das médias. Para a obtenção da curva padrão de cinética da artrite, foi aplicada análise de regressão com modelo polinomial. As análises foram realizadas no software Minitab.

O Gráfico 1 mostra a Curva Cinética de Artrite no modelo em estudo. A linha em azul mostra a curva obtida e a linha preta o resultado da regressão polinomial com $R^2=0,7161$. O gráfico mostra o início do edema em torno do 20º dia de experimento, com um pico máximo no escore de artrite no dia 29 de experimento, seguida de recuperação total no 45º dia. Aplicando-se o modelo ($y = 0,0004x^4 - 0,0487x^3 + 1,603x^2 - 11,32x + 4,2466$) o pico máximo de edema previsto situa-se entre o 25 e 30º dia de experimento (Tabela 1). Esses dados estão em contraste com as observações de outros autores que situam o pico de artrite em torno do 14º ao 20º dia de experimentação (Figura 3). Resultados semelhantes podem ser observados na análise da cinética de artrite através do Diâmetro das Patas (Gráfico 2), com a diferença que por este método de aferição de severidade, a artrite só é notada a partir do 20º dia com

significância estatística apenas entre o 7º e 40º dia de experimento (Nível de Confiança 99,25% e $p=0,001$).

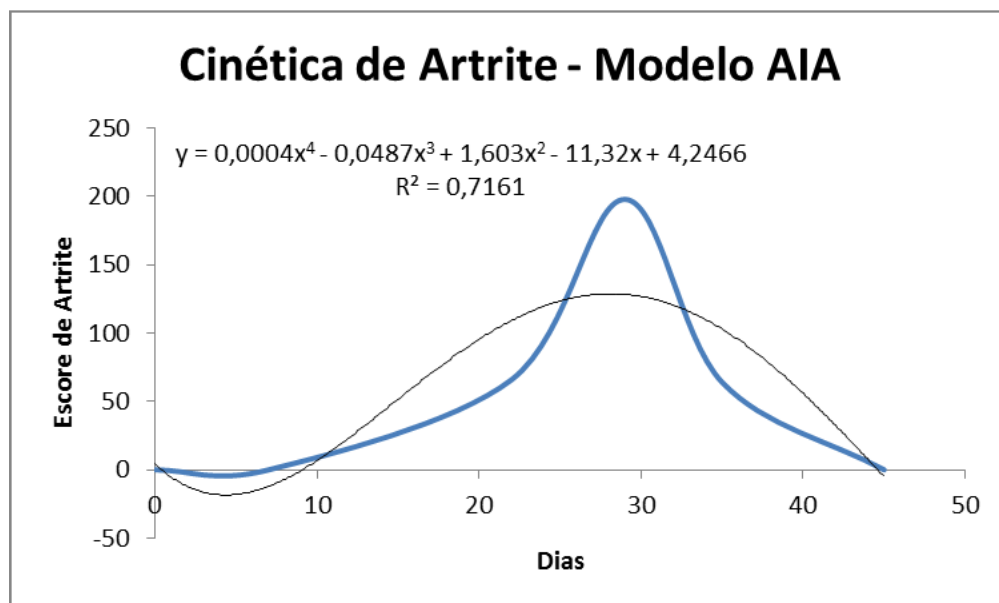


Gráfico 1. Cinética de Artrite (Linha Azul) e Curva Padrão após Análise de Regressão. O Pico de Artrite encontra-se deslocado à direita em contraste com dados da literatura.

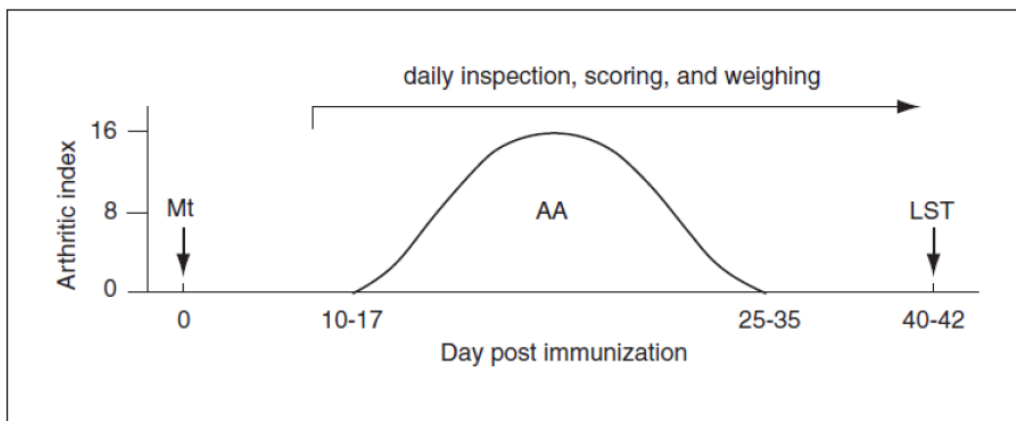


Figura 4. Cinética de Artrite a em Modelo AIA mostrando pico máximo de artrite em torno do 20º dia de experimento. Extraído de Van Eden *et al.* (2001).

Alguns fatores podem estar relacionados a este comportamento atípico. Sabe-se que animais mais jovens e de menor peso tem maior resistência ao desenvolvimento de artrite em contraste com os mais pesados (Van Eden, Wagenaar-Hilbers *et al.*, 2001). Foi observado que os animais de maior peso (em torno de 200g) desenvolveram

artrite mais precoce e mais severa. Também houve artrite precoce nos animais que desenvolveram úlceras na cauda, no local de inoculação (Figura 6).

Por outro lado, Van Eden *et al.* (2001) consideram que o uso de CFA preparados pelo fabricante e estocados por longos períodos não se constituem bons indutores de AA. Este trabalho fez uso do CFA (Difco) preparado pelo fabricante (vide metodologia). Cabe ressaltar que um número diversificado de Micobactérias pode ser utilizado na indução de artrite (Whitehouse, 2007).

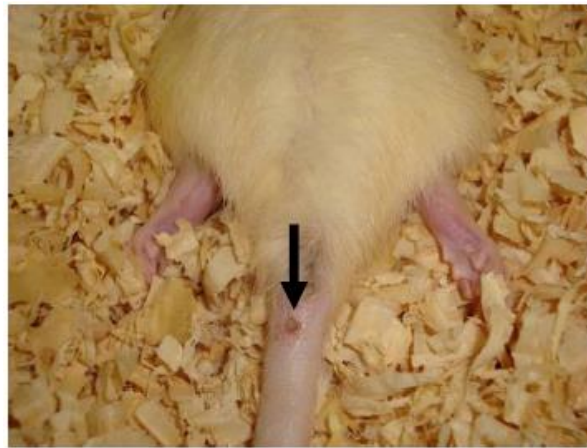


Figura 5. A seta indica úlcera no local de inoculação relacionada a edema precoce e severidade.

Variações de medida de diâmetro nas patas durante os procedimentos de aferição com paquímetro (dependente do pesquisador), a grande amplitude do peso dos ratos (175 a 220g) pode ter influenciado as medidas dos dias 7, 14 e 29 de modo a diferença estatística entre estes dias não ser significativa (Gráfico 2). Ratas de maior peso iniciando artrite mais precoce também podem ter contribuído com estas variações.

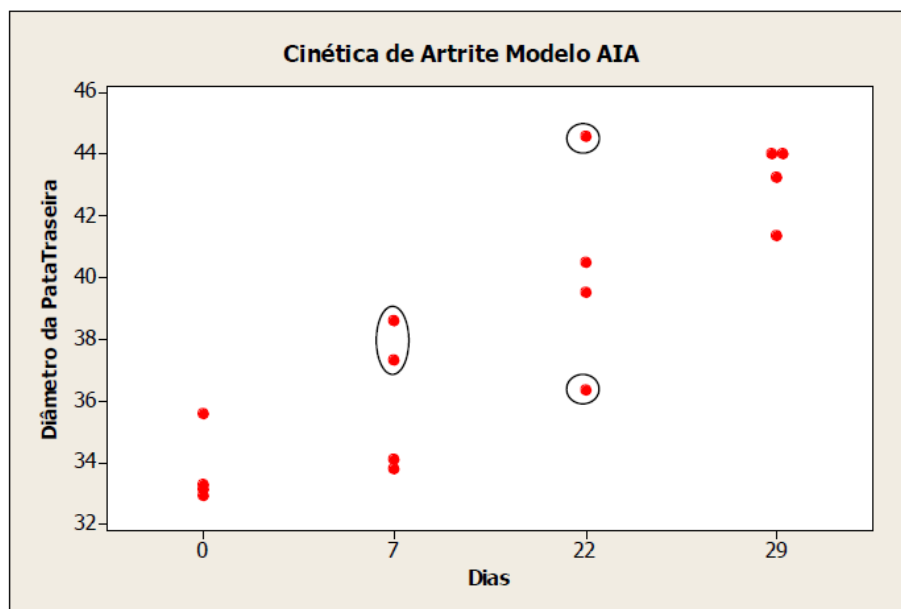


Gráfico 2. Boxplot individual do diâmetro das patas traseiras em grupos de quatro animais, mostrando a ampla variação de medidas, quando feitas nas metacarpofalangeanas.

Cerca de 100% dos animais desenvolveram algum grau de artrite, sem os graus 3 e 4 (mais severos) mais prevalentes entre as ratas, sobretudo as de maior peso (Figura 4). A comparação dos resultados de avaliação de severidade de artrite por diferentes observadores e métodos demonstra que houve artrite e ambos os métodos detectaram (com diferenças) o fenômeno de edema.

De conformidade com os objetivos deste trabalho, na Tabela 1 estão relacionados os procedimentos adotados neste projeto, seus resultados, bem como as modificações de protocolo a fim de otimizar resultados em outros experimentos. Em relação à mensuração de artrite, pode-se destacar como procedimentos alternativos adotados a aferição de diâmetro de edema nos joelhos.

Tabela 1. Principais resultados observados neste trabalho e sugestão de padrões para o modelo AA.

Item	Padrões Utilizados e Resultados	Padrões Adotados
Número de Animais	16	Grupo Mínimo – 8 animais
Sexo	Fêmeas	À Critério do Pesquisador
Peso	175 – 220g	200 – 220g
Adjuvante Completo de Freud	Difco – <i>M. tuberculosis</i> cepa H37Ra	Alternativa: <i>M. bovis</i> (Butantã)
Incidência de Artrite	98 – 100%	-
Pico de Artrite (dias)	29 dias	27 ^o a 35 ^o dias (Curva Padrão)
Diâmetro Dianteiro Máximo (Média/Mediana)	36,27 / 36,47 no 29 ^o dia	-
Diâmetro Trazeiro Máximo (Média/Mediana)	43,63 / 43,16 no 29 ^o dia	-
Escore Máximo/animal	11,62	-
Escore Total Máximo	198 no 29 ^o dia	122 no 27 e 35 ^o dias
Recuperação Total	45 dias	45 dias
Período Ideal para Experimentação de Fármacos	0 e 7 ^o dias	0 - 10 ^o dias
Dias Ideais para Avaliação de Severidade	0, 7 ^o , 14 ^o , 28-32 ^o , 40 ^o , 45 ^o dias	-
Locais Ideais para Medida de Diâmetro	Metatarsofalangeanas	Joelho Posterior
Dias de Sacrifício para Análise Histopatológica	14 ^o , 25 ^o , 35 ^o e 40 ^o dias	-



Figura 6. Fotodocumentação para demonstração dos Escores de Artrite. À esquerda as setas pretas indicam edema de metacarpo falangeanas em dois dedos, com ausência de edema em alguns (seta vermelha), edema de punho, sem anquilose caracterizando Grau 2 de severidade. A seta laranja (à direita) anquilose de joelho, com marcado edema (Grau4). Abaixo à edema acentuado dos dedos das patas dianteiras, no detalhe ausência de edema do punho (seta branca).

5.2 EXPERIMENTO PILOTO PARA PADRONIZAÇÃO DA DOSE CONTROLE DE METOTREXATO

Para padronizar a dose do metotrexato foram utilizados 24 ratos Lewis, machos adultos, com peso entre 190g e 220g, divididos em seis grupos de 4 animais, sendo um grupo Controle negativo (sem indução e sem tratamento); um grupo Controle positivo (com indução e sem tratamento), e 4 grupos Testes (com indução e tratamento com metotrexato), sendo estes grupos separados nas doses semanais de 25µg, 75µg, 150µg e 250µg. Essas doses foram calculadas a partir de doses usadas em humanos entre 0,1mg e 2mg/Kg/Semana. Os animais foram inoculados com adjuvante de Freund na base da cauda no dia zero, além de receber duas doses de MTX, correspondentes, nos dia 14 e 21 do experimento. No dia 28 foram realizadas a pesagem, coleta de sangue e eutanásia. O edema da pata direita dos ratos de diferentes grupos foi medido por paquimetria (mm). A partir das amostras de sangue foram realizados hemograma e bioquímica. Os resultados foram analisados estatisticamente através de Análise de Variância (ANOVA) para comparação de médias (assumindo $p < 0,05$) e Teste de Tukey para análise pos-hoc. A Curva Dose-Resposta mostrou que doses acima de 150µg/semana não produzem efeito adicional para redução de edema. Além disso, a comparação da leucometria dos diferentes grupos mostrou que não houve influência do metotrexato sobre a contagem de células nas doses selecionadas ($p = 0,308$). O estudo da função hepática revelou que a dose de 250µg/semana foi a mais hepatotóxica ($p = 0,040$).

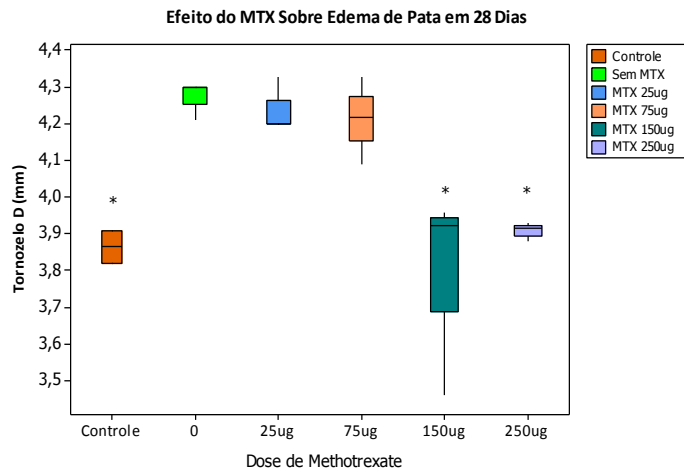


Figura 7. Melhor efeito terapêutico esteve entre 75 e 150ug/ semana.

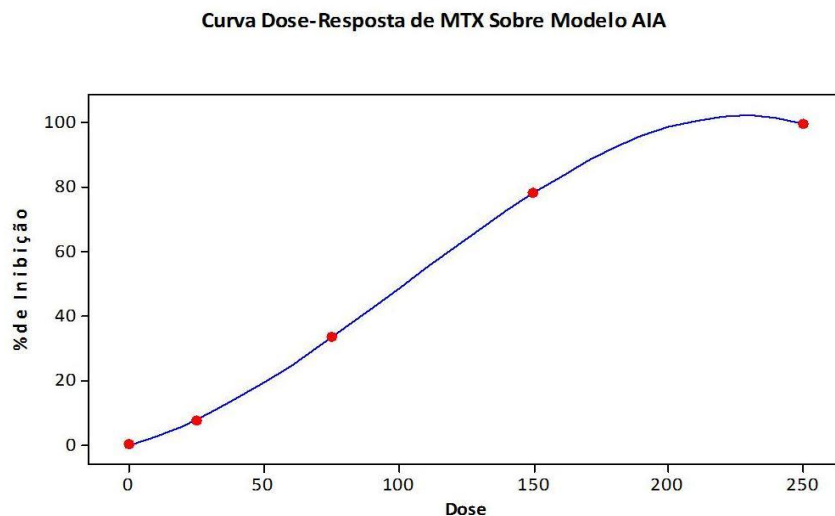


Figura 8. A Curva Dose-Resposta mostrou que doses acima de 150 μ g/semana não produzem efeito adicional para redução de edema.

Os resultados deste experimento piloto foram apresentados na VI Reunião Regional da Federação de Sociedade de Biologia Experimental – FeSBE, realizada no Centro de Convenções do Studio 5, de 26 a 28 de maio de 2011, na forma de pôster , sob o título **PADRONIZAÇÃO DA DOSE DE METOTREXATO EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE EM RATOS LEWIS**

6. CONCLUSÃO

O modelo experimental de artrite induzida por adjuvante para avaliações terapêuticas pode ser reproduzido de modo eficiente nas condições locais. Os dados experimentais como a Curva Padrão para Cinética de Artrite e a Curva Dose-Resposta do metotrexato permitiram o delineamento dos padrões a serem adotados no futuro experimento para a avaliação da eficácia terapêutica do extrato aquoso da *Pouteria nuda*, a ser realizado no segundo semestre de 2011. A análise histológica, onde antigamente era comum o uso de protocolos geradores de dados observador-dependente, com o auxílio da estereologia, possibilitará uma avaliação confiável da influência do extrato no dano articular, ao combinar métodos sistematizados e randomizados de coleta de amostras com a análise de programas de computador específicos. Sem dúvida, os resultados serão muito mais confiáveis e reprodutíveis.

7. CRONOGRAMA

Nº	Descrição	Ago 2010	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2011	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
	Revisão de Literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
	Aclimação dos animais				X			X					
	Experimento piloto					X	X	X					
	Experimento							X	X				
	Coleta de dados							X	X	X	X		
	Avaliação e tabulação dos resultados											X	X
	Entrega do relatório semestral						X						
	- - Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória) - Preparação da Apresentação Final para o Congresso (atividade obrigatória)											X	X

7. REFERÊNCIAS

1. ALAMANOS, Y.; DROSOS, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev**, v. 4, n. 3, p. 130-136, 2005.
2. ANDERSON, G.D. *et al.* Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. **J Clin Invest**, v. 97, n. 11, p. 2672-9. 1996.
3. BANIK *et al.* Reexamination of the Difference in Susceptibility to Adjuvant-Induced Arthritis among Lew/Crj, Slc/Wistar/ST and Slc/SD Rats. **Exp. Animal**. v. 51, n. 2, p. 197-201, 2002.
4. BERSANI-AMADO, C.A. *et al.* Comparative study of adjuvant induced arthritis in susceptible and resistant strains of rats. I. Effect of cyclophosphamide. **J Rheumatol**, v. 17, n. 2, p. 149-52, 1990.
5. BEST, R. *et al.* Effect of particle size of dried *Mycobacteria* on adjuvant induced arthritis in the rat. **Agent actions**, v. 14, n. 2, p. 265-268, 1984.
6. BRENNER, M. *et al.* The non-MHC quantitative trait locus Cia5 contains three major arthritis genes that differentially regulate disease severity, pannus formation, joint damage in collagen- and pristane-induced arthritis. **J Immunol.**, v. 174, p. 7894-7903, 2005.
7. CARNEIRO, A. L. Potencial citotóxico e Anti-microbiano de Plantas da Reserva Ducke, Manaus-AM. Tese de Doutorado em Biotecnologia. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Amazonas 2007.
8. CARETTE, S. All patients with rheumatoid arthritis should receive corticosteroids as part of their management. **J Rheumatol**, v. 34, n. 4, p. 656-660, 2007.
9. CHENGELIS, C. P. *et al.* 28-Day oral (gavage) toxicity studies of green tea catechins prepared for beverages in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 978-989, 2008.
10. CHOI, H.K., *et al.* Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid Arthritis: a prospective study. **Lancet**, v. 359, n. 9313, p. 1173-1177, 2002.
11. CHORILLI, M; MICHELIN, D.C.; SALGADO, R. H. N.; Animais de laboratório: O camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, n.1, p. 11-23, 2007.
12. CHOY, E.H. *et al.* Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**, v. 344, n. 12, p. 907-16, 2001.
13. COHEN, I.R. *et al.* T lymphocyte clones illuminate pathogenesis and affect therapy of experimental arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 28, n. 8, p. 841-5, 1985.
14. DAMY, S. B. *et al.* Aspectos fundamentais da experimentação animal: aplicações em cirurgia experimental. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 56, n. 1, p. 103-111, 2010.
15. DESAI, S.B and D.E FURST, Problems encountered during anti-tumour necrosis factor therapy. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 20, n. 4, p. 757-90, 2006.
16. DORAN, M.F. *et al.* Predictors of infection in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 46, n. 9, p. 2294-300. 2002.

16. DUPLAN, V. *et al.*, In the rat, citrullinated autologous fibrogen is immunogenic but the induced autoimmune response is not arthritogenic. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 145, p. 502-512, 2006.
17. DURAI, MALARVIZHI *et al.*, Self heat-shock protein 65-mediated regulation of autoimmune arthritis, **Journal autoimmunity**, v. 33, p. 208-213, set. 2009.
18. EDWARDS, J.C. *et al.* Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**, v. 350, n. 25, p. 2572-81. 2004.
19. EMERY, P. The Roche Rheumatology Prize Lecture. The optimal management of early rheumatoid disease: the key to preventing disability. **Br J Rheumatol**, v. 33, n. 8, p. 765-768, 1994.
20. FINGER, EDUARDO; SCHEINBERG, M. A.; Rituximab (Mabthera), uma nova abordagem para tratamento da artrite reumatóide. Uma revisão sistemática. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein: **Einstein**, São Paulo, v. 5, n. 4, p. 378-386, 2007.
21. FRIES, J.F, *et al.* Reduction in long term disability in patients with rheumatoid arthritis by disease-modifying antirheumatic drug-based treatment strategies. **Arthritis Rheum**, v. 39, n. 4. P. 616-622. 1996.
22. GENOVESE, M.C. *et al.* Combination therapy with etanercept and anakinra in the treatment of patients with rheumatoid arthritis who have been treated unsuccessfully with methotrexate. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 5, p. 1412-9, 2004.
23. GRANADO, M. *et al.* Anti-inflammatory effect of the ghrelin agonist growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in arthritic rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, n. 3, p. E486-92, 2005.
24. GUIDELINES for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update. **Arthritis Rheum**, v. 46, n. 2, p. 328-346. 2002.
25. INGLIS, J.J. *et al.* The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. **Arthritis Res Ther**, v.7, n. 4, p. R807-16, 2005.
26. JOE, B. and WILDER, R.L.. Animal models of rheumatoid arthritis. **Mol Med Today**, v. 5, n. 8, p.367-369. 1999.
27. KNIGHT B, KATZ DR, ISENBERG DA, IBRAHIM MA, LE PAGE S, HUTCHINGS P, SCHWARTZ RS, COOKE A. Induction of adjuvant arthritis in mice. **Clin Exp Immunol**. Dec: 90 (3):459-65. 1992.
28. KREMER, J.M. *et al.* Effects of abatacept in patients with methotrexate-resistant active rheumatoid arthritis: a randomized trial. **Ann Intern Med**, v. 144, n. 12, p. 865-76. 2006.
29. KUMAR; ABBAS; FAUSTO. **Robbins e Cotran, Patologia – Bases patológicas das doenças**. Tradução de Raimundo Rodrigues Santos. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 1367. Título original: Robbins and Cotran, Pathologic Bases of Diseases.
30. LACERDA, CARLOS A.M. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cienc**, v.75, n.4, 2003.

31. LAWAL, I. O.; UZOKWE, N. E.; IGBOANUGO, A. B. I.; ADIO, A. F.; AWOSAN, E. A.; NWOGWUGWU, J. O.; FALOYE, B.; OLATUNJI, B. P.; ADESOGA, A. A. Ethno Medicinal information on collation and identification of some medicinal plants in Research Institutes of South-west Nigeria. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 1. p. 001-007, Jan, 2010.
32. LIMA, A. B. **Estudo da ação antinociceptiva do 1-nitro-2-feniletano, principal constituinte da *Aniba canelilla***. 69 f. Dissertação de Mestrado para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.
33. MA, J.; YANG, H.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. Analysis of polyphenolic antioxidants from the fruits of three *Pouteria* species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. **J Agric Food Chem**, v. 52, p. 5873-5878, 2004.
34. MACPHEE, S. *et al.* Profilatic and therapeutic effects of *Mytilus edulis* fatty acids on adjuvant-induced arthritis in male Wistar rats, **Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids**, doi: 10.1016/j.plefa.2009.12.003, 2010.
35. MANOSROI, A. *et al.* Effects of *Pouteria cambodiana* extracts on in vitro immunomodulatory activity of mouse immune system. **Fitoterapia** v. 77, p. 189-193, 2006.
36. MANOSROI, A. *et al.* In vitro immunomodulatory effect of *Pouteria cambodiana* (Pierre ex Dubard) Baehni extract. **J Ethnopharmacol** v. 101, p. 90-94, 2005.
37. MIA M. Y. *et al.* The Dynamics of Articular Leukocyte Traffcking and the Immune Response to Self Heat-Shoch Protein 65 Influence Arthritis Susceptibility. **J Clin Immunol**, v. 28, p. 420-431, Mai. 2008.
38. MONTENEGRO, L.H.M.; OLIVEIRA, P.E.S.; CONSERVA, L.M.; ROCHAM, E.M.M.; BRITO, A.C.; ARAÚJO, R.M.; TREVISAN, M.T.S.; LEMOS, R.P.L. Triterpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterástico de *Pouteria venosa* L (Sapotaceae). **Rev Bras Farmac.** , v. 16, p. 611-617, 2006.
39. MURCH, S. J.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P. K. Phytofarmaceuticals: Problems, Limitations, and Solutions. **Alt Med** , v. 4, n. 2, p. 33-37, 2000.
40. NUNES, M. V. O. *et al.* Comparação do perfil de anticorpos anti-imunoglobulina G em murinos imunizados com IgG humana associada a diferentes a diferentes adjuvantes. **Rev Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 1, p. 44-50, 2009.
41. O'DELL, J. R. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 350, p.2167-2179, maio. 2004.
42. OKAMOTO, HIROSCHI *et al.* Inhibition of NF-κB Signaling by Fusadil as a Potential Therapeutic Strategy for Rheumatoid Arthritis, **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, n. 1, p. 82-92, Jan 2010.
43. OLIVEIRA, P. G. **Efeito da administração do antagonista do receptor de bombesina/ peptídeo liberador de gastrina RC-3095 na artrite induzida por CFA em ratos Wistar**. 76 f. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-

- Graduação em Ciências Médicas. Área de concentração: Reumatologia – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
44. OLSEN, N.J. and C.M. STEIN. New drugs for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, v. 350, n. 21, p. 2167-79, 2004.
 45. PEARSON, C.M. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. ***Proc Soc Exp Biol Med***, v. 91, n. 1, p. 95-101, 1956.
 46. PEARSON, C.M. Studies of polyarthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant. General clinical and pathologic characteristics and some modifying factors. ***Arthritis and Rheumatism***, v. 2, p. 440-459, 1959.
 47. PERFEITO, J.P. *et al.* Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. ***Rev Bras Farmac***, v. 15, p. 183-186, 2005.
 48. RANG, H. P. *et al.* **Rang e Dale – Farmacologia**. Tradução de Adriana Paulino do Nascimento. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 223. Título original: Rang and Dale's Pharmacology.
 49. RODRIGUES, L. A *et al.* Potencialização do efeito antiinflamatório e antinociceptivo do diclofenaco e da nimesulida por vitaminas do complexo B. ***Rev. Ciênc. Farm. Apl.***, v. 28, n. 1, p. 45-49, 2007.
 50. RONG, X. *et al.* A 35-day gavage safety assessment of ginger in rats. ***Regulatory Toxicology and Pharmacology***, v. 54, p. 118-123, 2009.
 51. ROSA, C.; MACHADO, C. A. Plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças reumáticas: revisão. ***Rev. Bras. Farm.***, v. 88, n. 1, p. 28-32, 2007.
 52. SAUZEM, P. D. *et al.* Effect of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles on chronic inflammatory pain model in rats. ***European Journal of Pharmacology***. v. 616, p. 91-100, 2009.
 53. SHARP, PATRICK E.; LA REGINA, MARIE C. ***The Laboratory Rat***. New York: CRC Press, 1998.
 54. SILVA JÚNIOR, F. S.; ROCHA, F. A. C. Artrite induzida por Zymosan em ratos – Mecanismos envolvidos na hipernocicepção e na lise da cartilagem articular. ***Acta Reum. Port.*** v. 31, p. 143-9, 2006.
 55. SOEKEN, K. L. *et al.* Herbal medicines for the treatment of rheumatoid arthritis : a systematic review. ***Rheumatology***, v. 42, p. 652-659, 2003.
 56. STILLS JR., HAROLD F. Adjuvants and antibody production: Dispelling the Myths Associated with Freund's Complete and Other Adjuvants. ***Ilar J.***, v. 46, n.3, p. 280-293, 2005.
 57. SWENSON, U.; ANDERBERG, A. A. Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales). ***Cladistics***, v. 21, p. 101-130, 2005.
 58. SYMMONS, D.P., *et al.* Longterm mortality outcome in patients with rheumatoid arthritis: early presenters continue to do well. ***J Rheumatol***, V. 25, n. 6, p. 1072-7, 1998.
 59. VAN DER HORST-BRUIJNSMA, I.E., *et al.* Diagnoses and course of early-onset arthritis: results of a special early arthritis clinic compared to routine patient care. ***Br J Rheumatol***, v. 37, n. 10, p. 1084-1088, 1998.

60. VAN EDEN, W *et al.* Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to Mycobacterium tuberculosis and to cartilage proteoglycans. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 15, p. 5117-20, 1985.
61. VAN EDEN, W.; WAGENAAR-HILBERS, J. P.; WAUBEN, M. H. Adjuvant Arthritis in the Rat. **John Wiley & Sons, Inc.**, 2001. ISBN 9780471142737.
62. VIVAS, L. A. M. *et al.* Aparelho de anestesia experimental para animais de pequeno porte. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 22, n. 3, 2007.
63. WAKSMAN, B.H. Auto-immunization and the lesions of autoimmunity. **Medicine (Baltimore)**, v. 41, p.93-141, 1962.
64. WAYNFORTH. H. B.; FLECKNELL, P. A. **Experimental and Surgical Technique in the rat**. 2. ed. San Diego, CA: Academic Press, 1992.
65. WHITEHOUSE, M. Adjuvant arthritis 50 years on: the impact of the 1956 article by C. M. Pearson, 'Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants'. **Inflammation Research**, v. 56, n. 4, p. 133-138, 2007.
66. WILSON, A. W. *et al.* An animal model of chronic inflammation pain: Pharmacological and temporal differentiation from acute models. **European Journal of Pain**. v. 10, p. 537-549, 2006.
67. YOUNG, A. *et al.* Mortality in rheumatoid arthritis. Increased in the early course of disease, in ischaemic heart disease and pulmonary fibrosis. **Rheumatology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 650-7, 2007.
68. ZEIDLER, H. W. *et al.* Progression of joint damage in early active severe rheumatoid arthritis during 18 months of treatment : comparison of low-dose cyclosporine and parental gold. **Br. J. Rheumatol.** v.37, p. 874-882, 1998.
69. ZHANG, RUI-XIN *et al.* Extract of Chinese herbal formula *Huo Luo Xiao Ling Dan* inhibited adjuvant arthritis in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 121, n. 3, p. 366, Jan. 2009.
70. ZHOU, Z. Q. *et al.* Ketamine inhibits polymorphonuclear leucocyte CD11b expression and respiratory burst activity in endotoxemic rats. **Inflamm Res**, v. 56, n. 4, p. 149-53, Apr 2007.