



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
2012



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/0064/2011

**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
2012

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. Alternativas terapêuticas cada vez mais populares por sua eficácia no tratamento de diversas doenças são os fitoterápicos. A espécie *Pouteria nuda*, apesar de possuir poucos estudos ao seu respeito, em trabalhos *in vitro* demonstrou 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, propõe-se a avaliação do efeito *in vivo* do extrato da folha de *Pouteria nuda* sobre a artrite adjuvante. Foram utilizados 24 ratos albinos machos adultos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis com 12 semanas de idade e peso médio de 250-350g, mantidos sob condições ambientais, comida e água ad libitum, divididos em 4 grupos: 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 (MTX) (n=6) e Grupo IV: com indução de AA e expostos ao extrato aquoso de *P. nuda* (n=6). Administrou-se por via intraperitoneal (IP) 150µg/kg/semana de metotrexato (droga controle) e 300mg/kg/semana de extrato aquoso de *P. nuda* diluído em solução salina, ambos administrados nos dias 15 e 22 do experimento. Observou-se o surgimento de artrite nos animais induzidos, constatada visualmente pelo aumento do volume das articulações das patas traseiras. Comparando-se o grupo com artrite e não tratado (controle positivo) com o grupo tratado com MTX e o que recebeu o extrato de *P. nuda*, não houve diferença estatística que pudesse denotar melhora significativa da artrite no tempo em que se deu o experimento (p= 0,940 e p=0,216, respectivamente). Também não houve diferença de efeito entre o MTX e o extrato da *P. nuda* quanto à redução do volume articular no último dia (p=0,07). Não observou-se influência do MTX sobre o padrão leucocitário (p=1,0), valores séricos de ALT

($p=0,803$), uréia ($p=0,690$) e creatinina ($p=0,174$), o que evidenciou ausência de toxicidade hepática e renal. Todavia, a dose de 300mg/kg IP do extrato de *P. nuda* apresentou maior toxicidade hepática e renal ($p<0.05$), comparativamente aos outros grupos. Observou-se importante produção de citocinas inflamatórias no grupo controle positivo (não tratado), com 75% de animais altos produtores e no grupo tratado com o extrato aquoso de *P. nuda*. O grupo tratado com MTX apresentou mais de 75% de animais classificados como baixos produtores, assemelhando-se, quanto ao padrão de citocinas, ao grupo saudável ao fim do experimento ($p<0,05$). A toxicidade hepática e renal da dose de 300mg/Kg IP do extrato de *P. nuda* e os altos índices de citocinas no grupo com este tratamento apontam para o questionamento sobre que resultados seriam obtidos na ocasião de um experimento que avalie o mesmo objetivo do presente trabalho, porém com administração das terapias por via oral, uma importante diferença metodológica, com possíveis desfechos adversos dos evidenciados através deste experimento.

FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

Figura 1. Caracterização da artrite reumatóide.	09
Figura 2. Edema das patas traseiras.	18
Figura 3. Patas traseiras grupo controle negativo	18
Gráfico 1. Curva de artrite para os diferentes grupos medidos nos dias 0, 7, 14 e 21.	19
Gráfico 2. Médias dos volumes das patas traseiras. Grupos Controle positivo e MTX. Sem diferença estatística ($p=0,940$)	19
Gráfico 3. Médias dos volumes das patas traseiras. Grupos Controle positivo e <i>P. nuda</i> . Sem diferença estatística ($p=0,216$)	19
Gráfico 4. Elevação de leucócitos. Importante leucocitose no grupo tratado com extrato aquoso de <i>P. nuda</i> 300mg/kg IP ($p<0,05$). Ausência de influência da dose de MTX 150ug/semana sobre a leucometria ($p=1,0$)	21
Gráfico 5. Toxicidade hepática. Dose do extrato aquoso de <i>P. nuda</i> 300mg/kg IP com importante elevação de ALT ($p<0,05$)	21
Gráfico 6. Toxicidade renal. Elevação de uréia e creatinina no grupo tratado com extrato aquoso de <i>P. nuda</i> 300mg/kg IP ($p<0,05$). Ausência de influência da dose de MTX 150ug/semana ($p=0,690$; $p=0,174$, respectivamente)	21
Gráfico 7. Padrões de altos e baixos produtores de citocinas entre os grupos	23

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	07
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	08
1.1 ARTRITE REUMATÓIDE	08
1.1.1 CONCEITO E PREVALÊNCIA	08
1.1.2 FISIOPATOGÊNESE DA ARTRITE REUMATÓIDE	08
1.1.3 TRATAMENTOS NA ARTRITE REUMATÓIDE	09
1.2 FITOTERÁPICOS	10
1.3 MODELOS ANIMAIS	11
1.3.1 MODELO MURINO DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE	11
1.3.2 MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. MÉTODOS	14
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	14
3.2 ANIMAIS	14
3.3 ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE (AA)	15
3.4 VIA E DOSE DE ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO DE <i>Pouteria nuda</i> E DO METOTREXATO	15
3.5 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA POR EDEMA DE PATA	15
3.6 PUNÇÃO SANGUÍNEA E EUTANÁSIA	16
3.7 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS TNF- α E IL1- α	16
3.8 ESTATÍSTICA	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 EFEITO DA TERAPIA COM EXTRATO AQUOSO DE <i>P.nuda</i>	18
4.1.2 ÍNDICES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS	20
4.1.3 PERFIL DE CITOCINAS	22
5. CONCLUSÃO	25
6. CRONOGRAMA	26
ANEXOS	27
REFERENCIAS	29

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 BIBLIOGRÁFICA

1.1 ARTRITE REUMATÓIDE

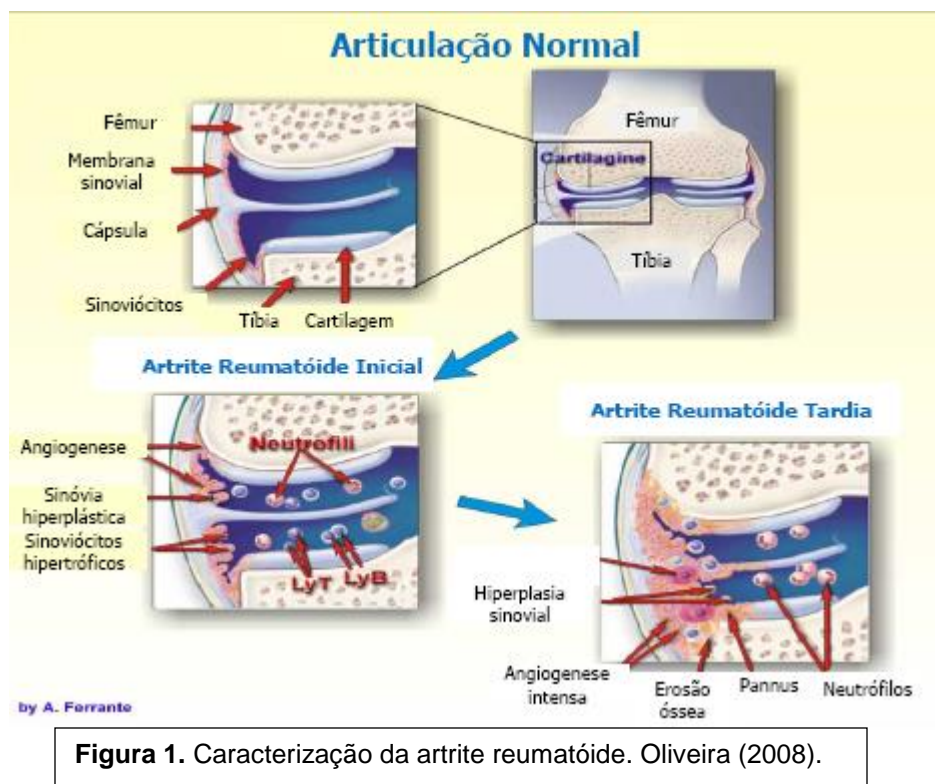
1.1.1 CONCEITO E PREVALÊNCIA

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 FISIOPATOGENESE 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).



1.1.3 TRATAMENTOS NA ARTRITE REUMATÓIDE

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 fulgaz (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 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). 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).

No entanto, essas terapias ainda apresentam efeitos adversos significativos e devem ser mantidas por longo prazo, pois não são curativas da doença (Guidelines, 2002). 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), diarréias (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

Esses três trabalhos sobre estudos terapêuticos experimentais para 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). 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). 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).

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.

2. OBJETIVOS

2.1 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.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) 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.
- B) Avaliar o efeito do extrato aquoso da folha de *P. nuda* na inflamação articular através do valor sérico das citocinas IL-1 e TNF- α
- C) Avaliar a toxicidade hepática e renal através hemograma e bioquímica

3. MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

O extrato aquoso da *Pouteria nuda*, planta coletada na Reserva Adolpho Ducke, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), foi 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).

3.2 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.

Foram utilizados 24 ratos albinos machos adultos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis com 12 semanas de idade e peso médio de 250-350g, 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*). Divididos em:

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 (MTX) (n=6).

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

3.3 ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE (AA)

Após a anestesia dos animais com Isoflurano a 3% (inalação por 2-3 min) (Sauzen *et al.*, 2009; Waynforth e Flecknell, 1991), a área que recebeu a injeção foi tricotomizada e degermada com álcool iodado (1%). A indução da artrite foi feita mediante injeção de 0,1mL de adjuvante completo de Freud (Difco®) em dose única contendo 1µg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA, ATCC25177) na base da cauda (Zhang *et al.*, 2009), com uma seringa de 1 mL e agulha 13 x 4,5 mm.

3.4 VIA E DOSE DE ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO DE *Pouteria nuda* E METOTREXATO

Seguindo metodologias de trabalhos anteriores (McPhee *et al.*, 2010; Okamoto *et al.*, 2010), optou-se pela via de administração intraperitoneal (IP) tanto para o metotrexato (droga controle) 150mg/kg/semana quanto para o extrato aquoso de *P. nuda* 300mg/kg/semana diluído em solução salina administrados nos dias 15 e 22 do experimento.

3.5 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA POR EDEMA DE PATA

O edema das patas foi avaliado por observador treinado o qual não participou do planejamento do experimento (avaliação cega). O volume das patas traseiras foi medido nos dias 0, 7, 14, 21 de experimento através de pletismômetro digital (Insight®). Os valores foram medidos em mL correspondente ao deslocamento de líquido na cuba do aparelho, apresentados em marcador digital. O percentual do edema foi calculado através da fórmula: $1 - \frac{Vt}{Vc} \times 100$, onde Vt corresponde ao volume de uma pata tratada e Vc o volume da pata controle.

3.6 PUNÇÃO SANGUÍNEA E EUTANÁSIA

As amostras de sangue para a análise de citocinas por citometria de fluxo, hemograma e bioquímica foram obtidas através de punção cardíaca (Waynforth e Flecknell, 1991). A eutanásia foi realizada pelo método de exsanguinação, seguindo orientações dos mesmos autores.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS TNF- α E IL1- α

A dosagem de citocinas TNF- α e IL1- α no soro foi realizada por Citometria de Fluxo CBA (Cytometric Bead Array), usando-se os kits CBA flex rat (code 558309, BD® Biosciences) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Foi utilizado o Citômetro de Fluxo FACScalibur® da Becton Dickinson (BD) para leitura das amostras. Para o cálculo das concentrações e intensidade média de fluorescência de cada citocina foi utilizado o software FCAP array™ versão 1.0.1.

Seis populações de beads com diferentes intensidades de fluorescência foram conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturadas para formar o CBA e lidas no canal FL-3 do citômetro de fluxo. As populações de beads foram visualizadas de acordo com as respectivas intensidades de fluorescência. As beads de captura das citocinas foram misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE, e depois encubadas com as amostras para formar o ensaio “sanduiche”. Os tubos para aquisição foram preparados com 50 μ l da amostra de sangue, 50 μ l da amostra de beads e 50 μ l do reagente de detecção Th1/Th2 PE. Os tubos foram homogeneizados e incubados por três horas, em temperatura ambiente, no escuro.

3.8 ESTATÍSTICA

Os resultados foram testados quanto a sua normalidade, independência e homocedacidade através de testes estatísticos. Para os resultados que apresentaram comportamento aceitável para estes pressupostos, uma ANOVA e pós-teste t de Tukey

para comparação entre grupos foi aplicada. Testes para a diferença entre as médias foram feitos nos caso em que houve rejeição da hipótese nula, isto é, onde confirmou-se estatisticamente diferença entre as médias. Para dados que não satisfizeram estes pressupostos, testes não paramétricos foram aplicados.

O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5%. As análises estatísticas foram realizadas através de programa GraphPad Prism Package (San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFEITO DA TERAPIA COM EXTRATO AQUOSO DE *P.nuda*

A pletismometria das patas traseiras foi realizada dos dias 0 ao 21 do experimento terapêutico (gráfico 3). Observou-se o surgimento de artrite nos animais induzidos, constatada visualmente pelo aumento do volume das articulações das patas traseiras (figuras 8 e 9) e pelo reflexo de defesa dos animais ao protegerem as patas afetadas do contato com a superfície da gaiola.



Figura 2. Edema das patas traseiras



Figura 3. Patas traseiras grupo controle negativo

A cinética da média dos volumes das patas traseiras dos animais demonstra uma redução nos grupos tratados tanto com o MTX quanto com o extrato da *P. nuda*, se comparados ao grupo não tratado – controle positivo – o qual permaneceu com edema progressivo até o último dia do experimento (gráfico 3).

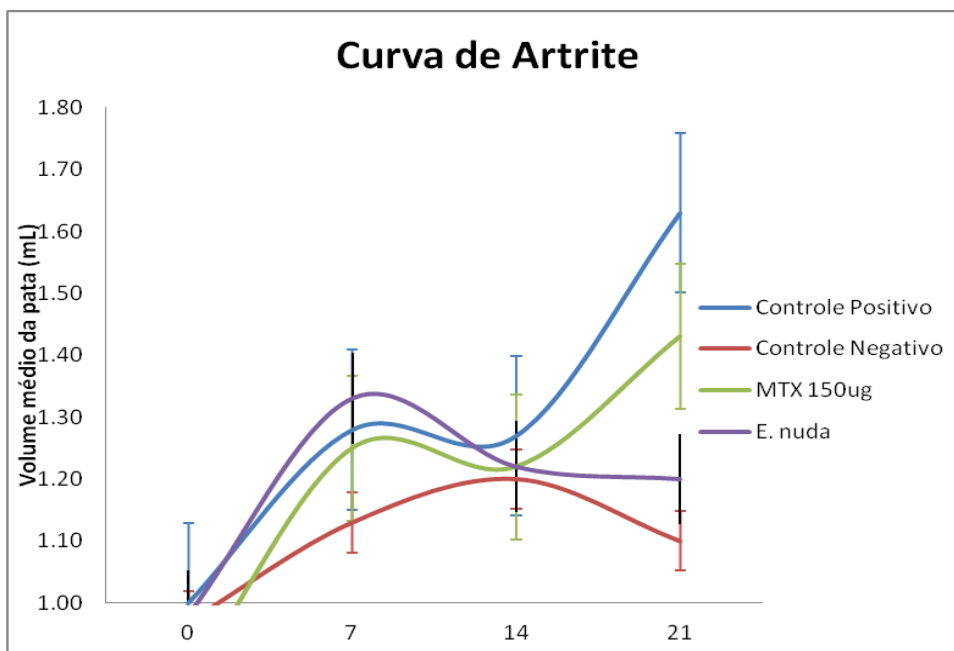


Grafico 1. Curva de artrite para os diferentes grupos medidos nos dias 0, 7, 14 e 21. Grupo tratado com *P. nuda* mostrou redução do edema (ml) no 21º dia.

Após Análise de variância (ANOVA) e pós-teste com teste t de Tukey para comparação das médias, comparando-se o grupo tratado com extrato de *P. nuda* com o grupo controle negativo (sem tratamento), foi verificado desaparecimento da diferença entre os grupos observada no dia 07 do experimento ($p < 0,05$), quando era notável a artrite nos grupos em tratamento. No fim do experimento (dia 24), não foi observada diferença estatística entre o volume das patas do grupo saudável e o tratado com o extrato ($p = 0,209$), sugerindo redução do inflamação local neste último.

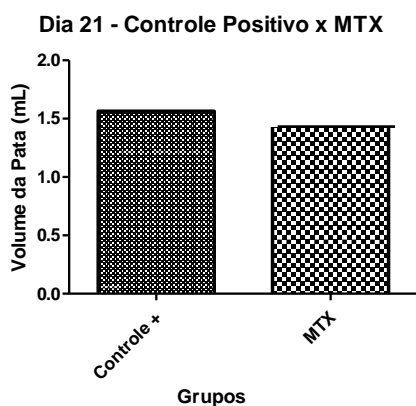


Grafico 2. Médias dos volumes das patas traseiras. Grupos Controle positivo e MTX. Sem diferença estatística ($p = 0,940$)

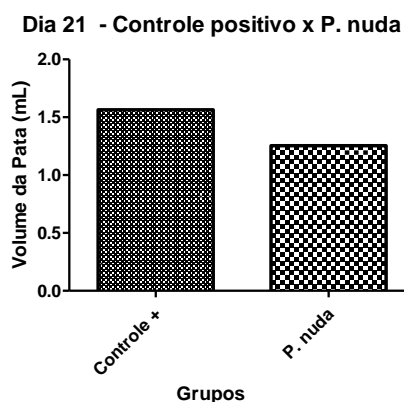


Grafico 3. Médias dos volumes das patas traseiras. Grupos Controle positivo e *P. nuda*. Sem diferença estatística ($p = 0,216$)

Por outro lado, comparando-se o grupo com artrite e não tratado (controle positivo) com o grupo tratado com MTX e o que recebeu o extrato de *P. nuda*, não houve diferença estatística que pudesse denotar melhora significativa da artrite no tempo em que se deu o experimento ($p= 0,940$ e $p=0,216$, respectivamente). Também não houve diferença de efeito entre o MTX e o extrato da *P. nuda* quanto à redução do volume articular no último dia ($p=0,07$). Tais observações podem ter diferentes significados. O tempo e dose dos tratamentos podem ter sido insuficientes, admitindo-se que foram iniciados no dia 15, com dose semanal (baseado na administração semanal do MTX intra-peritonealmente), havendo 10 dias para a ação da primeira dose, porém, apenas 3 dias para a ação da segunda dose, considerando-se que a eutanásia ocorreu logo após este último período. No entanto, é possível também que doses diárias da medicação do grupo controle e do grupo teste pudessem evidenciar maior e significativo efeito anti-artrítico, como no trabalho de McPhee *et al.* (2009), que analisou o efeito anti-inflamatório de ácidos graxos do molusco *Mittilus edulis* na artrite induzida por adjuvante em ratos. O grupo tratado com a droga controle recebeu Piroxicam 2,5 mg/Kg via oral, diariamente, por 7 dias antes da eutanásia com significativo efeito de redução do edema de pata ($p<0,05$), tendo a terapia com os ácidos graxos do mexilhão seguido o mesmo protocolo de tempo e via de administração com equivalente efeito anti-inflamatório.

4.1.2 ÍNDICES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Foi realizado Hemograma completo e avaliados os índices (WBC - leucócitos: total e diferencial, RBC - hemácias, HG - hemoglobina, HCT - hematócrito, VCM - volume corpuscular médio, HCM - hemoglobina corpuscular média, CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média, RDW - índice que avalia a diferença de tamanho entre as hemácias, CP - contagem de plaquetas). Entre os parâmetros bioquímicos foram determinadas as concentrações das enzimas hepáticas dentre elas: AST - aspartatoaminotransferase, ALT - alanina aminotransferase, FAL - fosfatase alcalina, GGT - gama glutamil tranferase, BT - Bilirrubina total.

Ao assumir que os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais do experimento apresentam distribuição normal, foi aplicada análise de variância (ANOVA) e pós-teste com teste t de Tukey para comparação das médias entre os grupos. Não observou-se influência da dose de 150ug/semana de MTX sobre o padrão leucocitário ($p=1,0$), valores séricos de ALT ($p=0,803$), uréia ($p=0,690$) e creatinina ($p=0,174$), o que evidenciou ausência de toxicidade hepática e renal. Todavia, a dose de 300mg/kg IP do extrato de *P. nuda* apresentou maior toxicidade hepática e renal ($p<0.05$), comparativamente aos outros grupos (figuras).

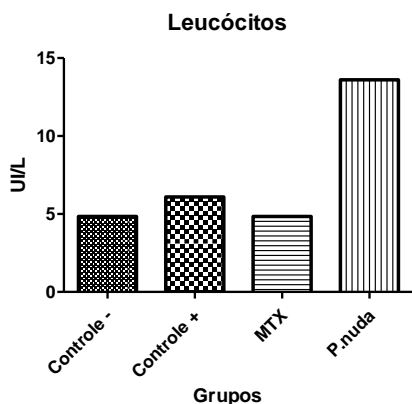


Gráfico 4. Elevação de leucócitos. Importante leucocitose no grupo tratado com extrato aquoso de *P. nuda* 300mg/kg IP ($p<0,05$). Ausência de influência da dose de MTX 150ug/semana sobre a leucometria ($p=1,0$)

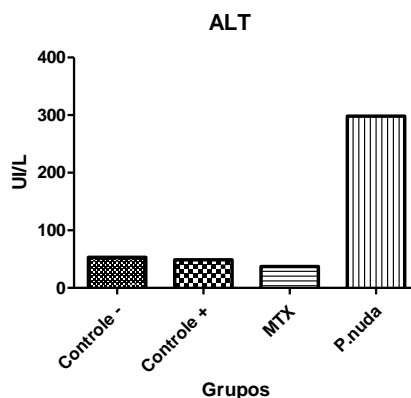


Gráfico 5. Toxicidade hepática. Dose do extrato aquoso de *P. nuda* 300mg/kg IP com importante elevação de ALT ($p<0,05$)

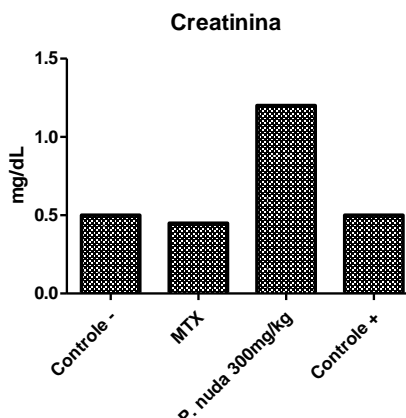
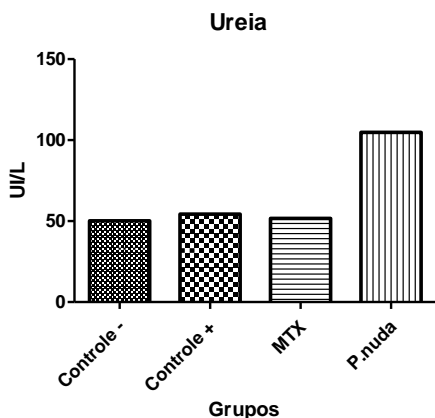


Gráfico 6. Toxicidade renal. Elevação de uréia e creatinina no grupo tratado com extrato aquoso de *P. nuda* 300mg/kg IP ($p<0,05$). Ausência de influência da dose de MTX 150ug/semana ($p=0,690$; $p=0,174$, respectivamente)

A leucocitose marcante no grupo tratado com extrato aquoso de *P. nuda* 300mg/dL IP, comparativamente aos outros grupos, em especial ao grupo saudável (controle negativo), chama atenção para a possível inflamação na cavidade peritoneal (peritonite) promovida pela presença de substâncias ainda não identificadas na composição do extrato bruto da planta, apesar de ter sido diluído em salina para a administração.

Quanto à toxicidade hepática e renal, é importante observar que, ao administrar IP as doses das terapias, a quase totalidade das substâncias presentes nessas doses sofreu o metabolismo de primeira passagem pelo fígado, após a absorção pela rede dos vasos mesentéricos, aumentando as chances de efeitos danosos ao organismo diante a formação de metabólitos ativos pelo sistema enzimático deste órgão (Waynforth e Flecknell, 1992; Rang *et al.*, 2008). Essa perspectiva aponta para possibilidade de resultados no mínimo diferentes, ou até mais promissores, na ocasião de ser executado novo experimento em que os testes terapêuticos sejam realizados com administração por via intragástrica, tal como em trabalhos semelhantes publicados por McPhee *et al.*, (2010) e Zhang *et al.*, (2009).

4.1.3 PERFIL DE CITOCINAS

A análise de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL1- α com frequência é tomada como parâmetro para avaliação do efeito de intervenções terapêuticas em modelos animais de artrite (McPhee *et al.*, 2010; Okamoto *et al.*, 2010; Durai *et al.*, 2009). A interpretação dos resultados dessa análise baseia-se na classificação dos animais em altos produtores de citocinas, se concentrações séricas estiverem acima da média, ou baixos produtores, se concentrações estiverem abaixo da média (Zarife *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2012).

A figura (ass individual) mostra a assinatura individual das citocinas TNF- α e IL1- α . Nas tabelas, representando 4 animais de cada grupo, cada célula foi pintada de branco (se o animal for baixo produtor) ou de preto (se alto produtor). Ao assumir que os dados são não-paramétricos, foi realizada análise de variância pelo método Kruskal-

Wallis e pós-teste com Dunnet para a análise estatística, considerando $p < 0,05$ para valores significantes. Observou-se importante produção de citocinas inflamatórias no grupo controle positivo (não tratado), com 75% de animais altos produtores e no grupo tratado com o extrato aquoso de *P. nuda*. O grupo tratado com MTX apresentou mais de 75% de animais classificados como baixos produtores, assemelhando-se, quanto ao padrão de citocinas, ao grupo saudável ao fim do experimento ($p < 0,05$).

Assinatura Individual de Altos Produtores das Citocinas IL-1 α e TNF- α entres os grupos

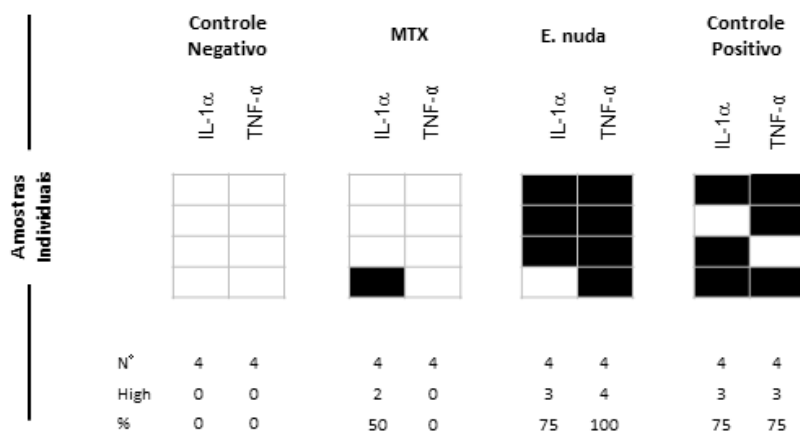


Gráfico 7. Padrões de altos e baixos produtores de citocinas entre os grupos

Com base no perfil de citocinas, portanto, não foi possível observar efeito anti-inflamatório significativo no grupo tratado com o extrato aquoso da *P. nuda*, considerando que este grupo apresentou quantidade de animais altos produtores de TNF- α e IL1- α muito maior em relação ao grupo tratado com MTX, e que não teve diferença estatística entre o grupo tratado com o extrato e o grupo controle positivo ($p > 0,05$).

Este resultado, associado à observação de maior nível de toxicidade hepática e renal evidenciado no grupo tratado com o extrato aquoso da *P. nuda*, corrobora a hipótese de influência da via de administração utilizada (intra-peritoneal) não apenas sobre a maior toxicidade do extrato mas também, agora, sobre o maior grau de

inflamação nos animais deste grupo. A possível peritonite decorrente do contato das substâncias do extrato bruto (estéril) com o peritônio pode ter sido fator preponderante para comportamento de perfil de citocinas como o observado.

5. CONCLUSÃO

A toxicidade hepática e renal da dose de 300mg/Kg IP do extrato de *P. nuda* e os altos índices de citocinas no grupo com este tratamento apontam para o questionamento sobre que resultados seriam obtidos na ocasião de um experimento que avalie o mesmo objetivo do presente trabalho, porém com administração das terapias por via oral, uma importante diferença metodológica, com possíveis desfechos adversos dos evidenciados através deste experimento.

Sobre o objetivo de avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato, não foi observada eficácia nos animais do grupo tratado através da metodologia adotada no presente trabalho. Excluindo discussões sobre a possibilidade de efeito positivo demonstrado através de outras metodologias, é aceitável concluir que, no mínimo, resultados diferentes possam ser obtidos não apenas quanto aos efeitos negativos da administração IP do extrato evidenciados neste projeto, mas também quanto a uma melhor observação do efeito do extrato sobre o edema de patas e sobre o perfil de citocinas. Este possível novo comportamento dos dados poderia ser observado com mudança da administração das terapias de via intra-peritoneal para intra-gástrica (absorção intestinal), maior frequência e introdução precoce da intervenção terapêutica, além da inclusão de um grupo teste com uso profilático do extrato e droga controle.

6. CRONOGRAMA

Nº	Descrição	Ago 2011	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2012	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
	Revisão de Literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
	Aclimação dos animais					X							
	Experimento terapeutico						X	X					
	Coleta de dados							X	X				
	Avaliação e tabulação dos resultados								X	X	X	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



Ensino, Pesquisa, Extensão e Inovação Tecnológica

DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA UM MODELO DE ARTRITE MURINA INDUZIDA POR ADJUVANTE

BOCHATE, A.L.1; VERNIL, R.1; OLIVEIRA, M.B.2; AMORIM, A.L.2; PINES, T.2; ARANTES, R.2; FUNDADO, S.C.1.
1. Docentes Pesquisadores da UFAM; 2. Docentes da Iniciação Científica.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
 INSTITUTO SCIENTIA VITAE
UFAM

INTRODUÇÃO:

O modelo de artrite induzida por adjuvante de Freund é amplamente utilizado para estudo da fisiopatologia da artrite reumatoide, bem como do desenvolvimento de novas drogas ou tratamentos para esta condição autoimune. Embora existam protocolos bem estabelecidos para indução de artrite em ratos, quando se considera modelos laboratoriais, novas e agudas as variações de condições experimentais, torna-se necessária uma padronização de condições locais de experimento com fim de validar um protocolo.

OBJETIVOS:

1. Padronizar um modelo de artrite experimental induzida por Adjuvante Completo de Freund (ACF) em Ratos Leis.
2. Propor adequações e alterações à aplicação local do modelo AIA.



Figura 1. Procedimento de contêiner e adaptação animal para experimentação.



Figura 2. A seta indica a pele do inoculador após 14 dias de inoculação, indicando que o procedimento foi realizado corretamente. Adicionalmente é possível visualizar o espaço viscido das patas traseiras com adere ao joelho, sem anquilose, caracterizando artrite grau 3 (14o dia).



Figura 3. Fotodocumentação para demonstração do Escoro de Antrite. À esquerda a seta identifica anquilose de joelho com marcado adere (seta). À direita, seta caracteriza o espaço viscido das patas distantes (paw britica).



Figura 4. Medida de Diâmetro de Pata Dianteira com adere direito. O ponteiro é posicionado junto ao metacarpo/falange proximal e não deve encostar para não sofrer com deformação e anquilose.

ITENS	PADRÕES UTILIZADOS	PADRÕES ADOPTADOS
Número de Animais	35	Grupo Mínimo – 8 animais à Critério do Pesquisador
Sexo	Fêmeas	200 – 220g
Peso	175 – 220g	Alternativa: M. Jovis (Suvínd)
Adjuvante Completo de Freund	Óleo – M. tuberculosis cepa H37Ra	17 e 35 dias (Curva Padrão)
Incidência de Artrite	98 – 100%	-
Pico de Artrite (dias)	29 dias	-
Diâmetro Dianteiro Máximo (Média/Mediana)	36,27 / 36,47 no 29º dia	-
Diâmetro Traseiro Máximo (Média/Mediana)	45,65 / 45,16 no 29º dia	-
Escore Mú e mot animal	11,62	122 no 27 e 35 dias
Escore Total Máximo	198 no 29º dia	45 dias
Recuperação Total	45 dias	0 - 10 dias
Período Ideal para Experimentação de Fármacos	0 e 7 dias	-
Dias Ideais para Avaliação de Severidade	0, 7, 14, 29-35, 40, 45 dias	-
Local Ideal para Medida de Diâmetro	Metatarsofalangeas	Joelho Posterior
Dias de Sacrício para Análise Histopatológica	14, 25, 35 e 40 dias	-

Figura 5. Principais resultados observados e Sugestão de Padrões para o Modelo AIA.

CONCLUSÃO

O Modelo AIA pode ser reproduzido de modo eficiente. A partir de dados experimentais com o a Curva Padrão para Clínica de Artrite e avaliando-se os padrões utilizados e resultados obtidos, foi possível estabelecer os padrões a serem adotados em futuras experimentos para teste de novos preparações farmacológicas.

Realização



Participantes



VI REUNIÃO REGIONAL 2011



26 a 28 de Maio de 2011 · Manaus, AM · Centro de Convenções Studio 5

CERTIFICADO

Certificamos que o resumo 11.003 - PADRONIZAÇÃO DA DOSE DE METOTREXATO EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE EM RATOS LEWIS, de autoria de BOECHAT, A. L. ; FURTADO, S. C. ; AMORIM DE LIMA, A.; OLIVEIRA, M. M. B. ; BARCELLOS, J. F. M.; MERINI, L. R.; CARNEIRO, A. L. B. ; PELIZZON, C. H.; OLIVEIRA, V. M. A., foi apresentado na VI Reunião Regional da Federação de Sociedade de Biologia Experimental - FeSBE, realizada no Centro de Convenções Studio 5 em Manaus, AM de 26 a 28 de maio de 2011.

Comissão Organizadora

Para verificar a autenticidade deste certificado, acesse www.fesbe.org.br/certificados

apoiadores



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. BOECHAT *et al.* Determinação das condições experimentais para um modelo de artrite murina induzida por adjuvante. ANAIS - I amostra interinstitucional de ensino, pesquisa e extensão. 09 de dezembro, 2010. Manaus, Brasil.
8. BOECHAT *et al.* Padronização da dose de metotrexato em modelo experimental de artrite induzida por adjuvante em ratos Lewis. ANAIS – VI Reunião regional FESB. 27 de maio, 2011. Manaus, AM, Brasil.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.

15. 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.
16. 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.
17. DORAN, M.F. *et al.* Predictors of infection in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 46, n. 9, p. 2294-300. 2002.
18. 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.
19. DURAI, MALARVIZHI *et al.*, Self heat-shock protein 65-mediated regulation of autoimmune arthritis, **Journal autoimmunity**, v. 33, p. 208-213, set. 2009.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. FERREIRA *et al.* Distinct profiles of circulating mononuclear cells stimulated with Staphylococcus aureus enterotoxin A in vitro during early and late episodes of chronic osteomyelitis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 3, p. 348-355. 2012
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. GUIDELINES for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update. **Arthritis Rheum**, v. 46, n. 2, p. 328-346. 2002.
28. 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.
29. JOE, B. and WILDER, R.L.. Animal models of rheumatoid arthritis. **Mol Med Today**, v. 5, n. 8, p.367-369. 1999.

30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. LACERDA, CARLOS A.M. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cienc**, v.75, n.4, 2003.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Melo M, Doria G, Serafini M, Araujo A. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**. 2012;8(4).
38. 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.
39. 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.
40. MANOSROI, A. *et al.* In vitro immunomodulatory effect of *Pouteria cambodiana* (Pierre ex Dubard) Baehni extract. **J Ethnopharmacol** v. 101, p. 90-94, 2005.
41. MIA M. Y. *et al.* The Dynamics of Articular Leukocyte Trafficking and the Immune Response to Self Heat-Shock Protein 65 Influence Arthritis Susceptibility. **J Clin Immunol**, v. 28, p. 420-431, Mai. 2008.
42. 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.
43. MURCH, S. J.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P. K. Phytofarmaceuticals: Problems, Limitations, and Solutions. **Alt Med** , v. 4, n. 2, p. 33-37, 2000.
 44. 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.
 45. O'DELL, J. R. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 350, p.2167-2179, maio. 2004.
 46. 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.
 47. 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.
 48. OLSEN, N.J. and C.M. STEIN. New drugs for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, v. 350, n. 21, p. 2167-79. 2004.
 49. PAIVA *et al.* Curso de manipulação de animais de laboratório FIOCRUZ. Disponível em : < http://www.bahia.fiocruz.br/arquivos/bioterio/bioterio_apostilha.pdf > Acesso em : 12 de janeiro de 2011.
 50. 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.
 51. 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.
 52. 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.
 53. 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.
 54. 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.
 55. RONG, X. *et al.* A 35-day gavage safety assessment of ginger in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 54, p. 118-123, 2009.
 56. 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.
 57. SAUZEM, P. D. *et al.* Effect of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles on chronic inflammatory pin model in rats. **European Journal of Pharmacology**. v. 616, p. 91-100, 2009.

58. SHARP, PATRICK E.; LA REGINA, MARIE C. **The Laboratory Rat**. New York: CRC Press, 1998.
59. 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.
60. SOEKEN, K. L. *et al.* Herbal medicines for the treatment of rheumatoid arthritis : a systematic review. **Rheumatology**, v. 42, p. 652-659, 2003.
61. 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.
62. SWENSON, U.; ANDERBERG, A. A. Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales). **Cladistics**, v. 21, p. 101-130, 2005.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. VAN EDEN, W.; WAGENAAR-HILBERS, J. P.; WAUBEN, M. H. Adjuvant Arthritis in the Rat. **John Wiley & Sons**, Inc., 2001. ISBN 9780471142737.
67. 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.
68. WAKSMAN, B.H. Auto-immunization and the lesions of autoimmunity. **Medicine (Baltimore)**, v. 41, p.93-141, 1962.
69. WAYNFORTH. H. B.; FLECKNELL, P. A. **Experimental and Surgical Technique in the rat**. 2. ed. San Diego, CA: Academic Press, 1992.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. ZARIFE *et al.* IL-8 is Associated with Non-Viremic State and IFN- γ with biochemical activity in HCV-Seropositive Blood Donors. **Intervirolgy**, n. 54., p. 87-96. 2011
74. 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.

75. 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.
76. 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.