

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA  
COMITÊ CIENTÍFICO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PERFIL HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DO SANGUE DE RATOS LEWIS COM  
ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE E TRATADOS COM EXTRATO DE  
*Pouteria nuda*.

Bolsista: Jaime Ribas Galvão Júnior, CNPq

MANAUS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA  
COMITÊ CIENTÍFICO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RELATÓRIO FINAL

PIB-B / 0031 / 2014

PERFIL HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DO SANGUE DE RATOS LEWIS COM  
ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE E TRATADOS COM EXTRATO DE  
*Pouteria nuda*.

Bolsista: Jaime Ribas Galvão Júnior, CNPq

Orientador: José Fernando Marques Barcellos

MANAUS

2015

## SUMÁRIO

<b>1. RESUMO</b>	<b>4</b>
<b>2. INTRODUÇÃO</b>	<b>5</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>7</b>
3.1. Fases do experimento	7
3.2. Extrato	7
3.3. Animais	7
3.4. Modelo de indução de artrite ( <i>M. tuberculosis</i> ).	7
3.5. Estudo Hematológico e Bioquímico	8
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>9</b>
<b>5. REFERÊNCIAS (SEGUNDO VANCOUVER)</b>	<b>13</b>
<b>6. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES</b>	<b>15</b>

## 1. Resumo

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica crônica, de etiologia desconhecida que diminui a sobrevida e afeta significativamente a qualidade de vida na maioria dos pacientes por acometer o tecido sinovial resultando em produção excessiva de líquido, destruição da cartilagem, erosão óssea adjacente e dano aos tendões e ligamentos. Supõe-se que a causa desta doença seja devida à desequilíbrios nas vias imunomoduladoras pró e anti-inflamatórias que promovem respostas autoimunes. A necessidade de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da AR associada ao potencial anti-inflamatório de plantas da família Sapotaceae e atividade antitumoral da espécie *Pouteria nuda* comprovada *in vitro* constituem o eixo deste estudo. O objetivo deste estudo objetivou a análise hematológica dos animais tratados com extrato de *p. nuda* e também daqueles tratados com a droga de referência. O material analisado foi coletado de ratos com artrite induzida por adjuvante (AIA), inicialmente estabelecida por Pearson (1956), extensamente utilizado como um modelo experimental para o estudo de processos imuno-inflamatórios. É possível observar neste modelo as manifestações clínicas, hematológicas, histológicas, radiológicas e imuno-inflamatórias que cursam com a artrite reumatoide. O extrato de *Pouteria nuda*, da família Sapotaceae foi usado para testar *in vivo* a ação fitoterápica desta planta. Esta espécie não tem uso medicinal conhecido, porém estudos recentes indicaram atividade antimicrobiana e antiinflamatória. As alterações hematológicas e bioquímicas traduzem o processo inflamatório e possibilitam reconhecer a influência do extrato vegetal sobre o estado da doença. Foram analisados fatores como contagem de células brancas, taxa de sedimentação eritrocitária, além dos elementos figurados do sangue e parâmetros bioquímicos. Este projeto foi uma vertente dos Projetos CNPq universal: **AÇÃO DO EXTRATO DE *Pouteria nuda* INDUZIDA POR ADJUVANTE EM RATOS LEWIS** (Doutorado) e FAPEAM universal **AÇÃO DO GEL DE *Pouteria nuda* APLICADO PELA FONORESE EM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE EM RATOS LEWIS** (Mestrado).

**Palavras-chave:** Artrite; Ratos Lewis; Extrato Vegetal, índices hematimétricos.

## 2. Introdução

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica crônica, de etiologia incerta, que acomete primariamente o tecido sinovial. O pensamento atual é que a artropatia imunológica primária pode incluir a ativação das células de vigilância do sistema imunológico <sup>(1)</sup> resultando em superprodução relativa persistente de citocinas <sup>(2, 3)</sup> e reconhecimento anormal de auto antígenos como “não próprio” devido à sua semelhança com uma proteína estranha <sup>(1)</sup>. A natureza do distúrbio imunológico difere entre os indivíduos, fato indicado pela resposta divergente de pacientes com AR aos medicamentos específicos <sup>(4)</sup>.

Para aprimorar os conhecimentos acerca desta doença utiliza-se um modelo experimental conhecido como artrite induzida por adjuvante (AIA), que foi inicialmente estabelecido por Pearson (1956) utilizando-se uma emulsão água-em-óleo para inocular diferentes linhagens de ratos. Desde então, a AIA tem sido extensamente utilizada como um modelo experimental para o estudo de processos imuno-inflamatórios de doenças inflamatórias articulares em humanos, em particular a artrite reumatóide, assim como o rastreio e teste de novos agentes anti-artrite <sup>(5); (6)</sup>.

Para o seu sistema de defesa as plantas produzem substâncias como flavonoides terpenoides e que, se utilizadas na fitoterapia, podem proporcionar uma alternativa à quimioterapia convencional em situações como doenças autoimunes. Dentre as diversas plantas, a espécie *Pouteria nuda* da família Sapotaceae apresentou resultados promissores para ação anti-inflamatória e antitumoral *in vitro* <sup>(7; 8)</sup>.

O potencial biológico de *Pouteria nuda* em pesquisas *in vitro* substancia este estudo que tem como objetivo verificar a ação do extrato de *Pouteria nuda* sobre Artrite Induzida por Adjuvante e, também, vem propor bioprospecção de uma planta da Biodiversidade Amazônica a fim de verificar possíveis propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras *in vivo*.

A maioria das doenças reumáticas inflamatórias crônicas são complicadas por anormalidades hematológicas, incluindo anemia, desordens leucocitárias, plaquetárias e do sistema de coagulação <sup>(9)</sup>. Uma das anormalidades hematológicas mais comuns de doenças reumatológicas são a anemia de doença crônica (anemia leve) e a anemia ferropriva <sup>(10; 11)</sup>. Níveis baixos de eritropoetina e uma diminuição na resposta à eritropoetina contribuem para a anemia na AR <sup>(11; 12)</sup>. Na anemia de doença crônica geralmente os níveis de MCV (volume corpuscular médio) e MCHC (concentração hemoglobínica corpuscular média) tendem a ser normais (anemia normocítica e normocrômica) <sup>(12)</sup>. A anemia hemolítica não é uma característica típica da AR, embora mediada por anticorpo, anemia hemolítica Coombs-positiva já foi descrita em humanos <sup>(12)</sup>. Outra anormalidade hematológica encontrada na AR é a leucocitose, que se apresenta com uma proliferação de leucócitos polimorfonucleares e uma predominância de formas primitivas (por exemplo, um desvio à esquerda) pode ocorrer <sup>(12)</sup>. Uma eosinofilia significativa pode ocorrer na AR e geralmente correlaciona-se com a presença de vasculite, pleuro-pericardite e fibrose pulmonar <sup>(13)</sup>. Em relação às plaquetas, a trombocitose é comum na AR, sendo a correlação positiva entre contagem de plaquetas e atividade da doença <sup>(12)</sup>. Embora o mecanismo da trombocitose seja incerto, a coagulação intravascular aumentada com um aumento compensatório na produção de plaquetas tem sido sugerida como uma possível causa <sup>(14)</sup>.

Os exames hematológicos e bioquímicos oferecem informações que podem ser utilizadas como ferramenta para, em associação com outros sinais, sintomas e exames, fazer triagem para avaliar a saúde

do animal, buscar o diagnóstico ou prognóstico do animal, e ainda verificar a habilidade corporal às infecções e para monitoramento do progresso da doença e tratamentos <sup>(15)</sup>. As alterações hematológicas e bioquímicas traduzem o processo inflamatório e possibilitam reconhecer a influência do extrato vegetal sobre o estado da doença. Foram analisados fatores como contagem de células brancas, taxa de sedimentação eritrocitária, além dos elementos figurados do sangue e parâmetros bioquímicos <sup>(15-17)</sup>.

Em estudos envolvendo ratos com AIA é esperado o aumento de plaquetas durante a fase precoce da doença embora na fase tardia o comportamento das plaquetas possa voltar ao normal <sup>(18)</sup>. No leucograma espera-se neutrofilia e monocitose além de linfopenia <sup>(19)</sup>. Neste projeto especificamente é preciso verificar se possíveis variações hematológicas estariam relacionadas ao modelo AIA ou a fatores relacionados ao extrato de *Pouteria nuda*.

Vale ressaltar que o presente trabalho faz parte de um projeto maior do CNPq Universal (PROCESSO 482.672/2010-2 COSAU/CGSAU/DABS) com aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal (Ofício 003/2012 – CEEA/UFAM). Sendo assim, o material sanguíneo utilizado foi dos animais já eutanasiados, devidamente armazenado no laboratório da Fundação de Hemoterapia e Hematologia do Amazonas (FHEMOAM) para a realização dos exames a posteriori.

Apesar dos trabalhos com modelo experimental em artrite reumatoide envolvendo ratos serem abundantes na literatura acadêmica, assim como os experimentos com fármacos, a associação destes dois tipos de estudo são menos usuais. O presente projeto permite o uso de uma planta da região amazônica sem uso conhecido e com potencial biológico comprovado em estudos *in vitro* <sup>(8)</sup>. Além disso, pesquisas com extratos brutos são capazes de fornecer um rastreamento de bioativos que atuando em conjunto podem fornecer atividade terapêutica <sup>(20, 21)</sup>.

Muitas espécies nativas nunca foram submetidas a estudos e este modelo experimental proposto permite estimar quanto ao seu possível potencial farmacológico <sup>(22); (23); (24)</sup>.

Este projeto corrobora com resultados obtidos nos Projetos: CNPq Universal - **AÇÃO DO EXTRATO DE *Pouteria nuda* INDUZIDA POR ADJUVANTE EM RATOS LEWIS** (Doutorado) e FAPEAM Universal - **AÇÃO DO GEL DE *Pouteria nuda* APLICADO PELA FONOSE EM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE EM RATOS LEWIS** (Mestrado).

Os resultados já alcançados pelo grupo de pesquisa foram publicados na revista *Scientia Amazonia*, intitulado **CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE: UMA REVISÃO DA AÇÃO IMUNOMODULADORA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS** <sup>(25)</sup>, e também na revista *Cytokine* com o título **ATTENUATION OF ADJUVANT-INDUCED ARTHRITIS IN RATS BY PHONOPHORESIS WITH AN AQUEOUS GEL OF THE AMAZONIAN PLANT *Elaeoluma nuda* (*Sapotaceae*)** <sup>(26)</sup>.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Fases do experimento**

Este trabalho foi realizado em duas fases distintas. A primeira fase foi integrante a trabalho de doutorado em bases gerais da cirurgia (UNESP - UFAM), e a segunda etapa consistiu neste trabalho de iniciação científica.

Na primeira parte os animais experimentais foram submetidos ao tratamento conforme descrito no texto e posteriormente sacrificados. A segunda etapa foi realizada com o estudo das alterações encontradas no sangue destes animais.

#### **3.2. Extrato**

Foi utilizado o extrato aquoso de folhas de *Pouteria nuda*. A planta, que pertence à família Sapotaceae, foi coletada na reserva Adolpho Ducke, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e processado no INPA (Instituto de Pesquisa da Amazônia) (27). O extrato bruto foi administrado por via intragástrica (gavagem), em 4 tratamentos (uma vez por semana), durante 30 dias.

#### **3.3. Animais**

Foram utilizados 15 ratos albinos machos adultos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis com peso médio de 220-252g. Os animais foram obtidos e mantidos no Biotério da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em condições controladas de iluminação (ciclo 12 horas claro/escuro) e temperatura de 22°C e alimentados com ração e água *ad libitum*.

Os animais foram separados da seguinte forma:

- Grupo 1, controle negativo (SHAM): sem indução de artrite e sem tratamento, n=03
- Grupo 2, controle positivo (CFA): com indução de artrite e sem tratamento, n=04
- Grupo 3, teste com MTX: com indução de artrite e tratado com injeção intra-peritoneal de metotrexate, n=04
- Grupo 4, teste com extrato de *P. nuda*: com indução de artrite e tratado com injeção intra-peritoneal do extrato de *P. nuda*, n=04

Vale ressaltar que este trabalho fez parte e ocorreu em paralelo a um projeto maior do CNPq Universal (PROCESSO 482.672/2010-2 COSAU/CGSAU/DABS) com aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal (Ofício 003/2012 – CEEA/UFAM). Sendo assim, o material hematológico utilizado foi dos animais já eutanasiados.

#### **3.4. Modelo de indução de artrite (*M. tuberculosis*).**

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

reumatoide <sup>(28)</sup>. 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 <sup>(29)</sup>; <sup>(30)</sup>; <sup>(31)</sup>. 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.

Após a sedação dos animais com halotano a 3% (inalação por 2-3 min) <sup>(32)</sup>, a área foi tricotomizada e uma solução de álcool iodado (1%) foi aplicada nessa superfície. A indução da artrite foi feita mediante injeção subcutânea de 200µL (0,2 ml) da solução de CFA (5mg/ml de Mbt) na base da cauda <sup>(32)</sup>, com uma seringa de 1 mL e agulha 13 x 4,5 mm. Esse dia foi considerado o dia 0 (zero). O desenvolvimento da artrite induzida por CFA iniciou-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 reumatoide e no estudo pré-clínico de novas terapias <sup>(33)</sup>. No exemplo deste trabalho, a nova terapia testada foi o extrato aquoso de folhas de *Pouteria nuda*.

### **3.5. Estudo Hematológico e Bioquímico**

A coleta de sangue dos animais submetidos aos experimentos foi feita por punção cardíaca ventricular após laparotomia mediana <sup>(32)</sup>, com os animais anestesiados com Isoflurano <sup>(34)</sup> seguindo o código de ética em experimentação animal.

Foram coletados 4mL de sangue e dispensados em tubos coletores do tipo microtainer. No tubo contendo EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético), para o hemograma, foram dispensados 3,5mL e no tubo contendo gel separador, para bioquímica e citometria de fluxo, 0,5mL. O material foi devidamente armazenado sob refrigeração e encaminhado para armazenamento ao Laboratório da Fundação de Hemoterapia e Hematologia do Amazonas (FHMOAM) para a posterior realização dos exames.

As amostras de sangue foram analisadas, e então determinados os diversos parâmetros das linhagens celulares de leucócitos, eritrócitos e a determinação da contagem global de plaquetas.

As dosagens bioquímicas foram realizadas por meio de automação em aparelho multiparamétrico do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da FHMOAM.

Para a avaliação da função hepática, foram determinadas a fosfatase alcalina (FAL), a alanina aminotransferase (ALT), a aspartato aminotransferase (AST), a albumina sérica, dosagem de Gama-GT, níveis de colesterol total e frações e dosagem da enzima desidrogenase láctica, enquanto para a avaliação da função renal, uréia e creatinina foram mensuradas. Para a análise hematológica, foi feita a contagem de células brancas, a contagem de células vermelhas, dosagem de hematócrito, dosagem de hemoglobina e contagem de reticulócitos <sup>(35, 36)</sup>. Estes parâmetros foram comparados dentre os quatro grupos estudados, evidenciando desta forma a eficácia ou não do extrato vegetal utilizado.



#### 4. Resultados e Discussão

Os exames hematológicos e bioquímicos oferecem informações que podem ser utilizadas como ferramenta para, em associação com outros sinais, sintomas e exames, fazer triagem para avaliar a saúde do animal, buscar o diagnóstico ou prognóstico do animal, e ainda verificar a habilidade corporal às infecções e para monitoramento do progresso da doença e tratamentos.

Nas observações do hemograma destaca-se plaquetose no grupo tratado com extrato de *P. nuda*, resultado semelhante encontrado no grupo controle positivo (Tabela 1). Porém, este achado parece revelar alteração relacionada ao modelo de AIA e não ao extrato de *P. nuda*.

Görög e colaboradores<sup>(18)</sup> em estudo com ratos Spargue-Dawley com AIA também encontrou aumento de plaquetas durante a fase precoce da doença embora na fase tardia o comportamento das plaquetas tenha voltado ao normal. O contraste com este estudo, em que a plaquetose foi observada no estágio final da doença pode ser explicado pela diferença na estirpe dos ratos que pode mudar a gravidade da doença.

Dos índices hematimétricos, o MCV do grupo de animais tratados com extrato de *P. nuda* se manteve em valores semelhantes ao controle negativo, contrastando, com os valores encontrados nos grupos controle positivos e MTX que mostraram índices mais baixos (Tabela 1).

Os resultados encontrados no leucograma confirmaram neutrofilia e monocitose em todos os grupos induzidos com ACF, sendo que o aumento dos monócitos no grupo tratado com extrato de *P. nuda* foi menor do que o grupo controle positivo e MTX (Tabela 2). Glenn e colaboradores<sup>(19)</sup> relataram a predominância de linfócitos no sangue de ratos normais e saudáveis e os achados deste trabalho demonstraram linfopenia em todos os animais induzidos com ACF, destacando que os animais tratados com extrato de *P. nuda* obtiveram valores mais elevados do que aqueles tratados com MTX e ambos foram superior ao grupo controle positivo. Estes achados sugerem que o extrato de *P. nuda* parece reprimir linfopenia em ratos com AIA.

Na determinação dos parâmetros bioquímicos não foram observadas alterações significativas das transaminases (AST e ALT) assim como dos marcadores de função renal (ureia e creatinina) no grupo teste demonstrando, novamente, ausência de toxicidade do extrato de *P. Nuda* (Tabela 3).

**Tabela 1** - Distribuição da média dos parâmetros hematológicos (série vermelha) dos ratos analisados no experimento em relação aos grupos.

<b>Hemograma</b>	<b>Hemograma Série Vermelha (Média ± DP)</b>				<b>p*</b>
	<i>Controle negativo</i>	<i>Controle positivo</i>	<i>MTX</i>	<i>Pouteria</i>	
<b>RBC (10<sup>6</sup>/μL)</b>	8,5 ± 0,1	8,7 ± 1,2	9,8 ± 1,4	8,9 ± 2,1	0,616
<b>HGB (g/dL)</b>	14,1 ± 0,3	13,5 ± 1,3	15,4 ± 2,0	13,9 ± 3,1	0,588
<b>HCT (%)</b>	47,4 ± 0,8	47,2 ± 7,0	54,0 ± 8,3	49,2 ± 11,5	0,656
<b>MCV (fL)</b>	55,9 ± 0,2	54,4 ± 1,0	54,8 ± 0,9	55,4 ± 0,3	0,078
<b>MCH (pg)</b>	16,7 ± 0,1	15,6 ± 0,8	15,7 ± 0,3	15,7 ± 0,4	0,068
<b>MCHC (g</b>	29,8 ± 0,2	28,8 ± 1,4	28,7 ± 0,8	28,3 ± 1,0	0,305
<b>CHCM (g</b>	28,1 ± 0,2	27,2 ± 1,2	27,3 ± 0,7	26,9 ± 0,6	0,304
<b>RDW (%)</b>	11,7a ± 0,6	13,1b ± 0,6	12,8b ± 0,2	12,7b ± 0,3	0,016
<b>HDW (g/dL)</b>	2,2a ± 0,1	2,5b ± 0,2	2,6b ± 0,1	2,5b ± 0,1	0,030
<b>PLT (10<sup>3</sup></b>	848 ± 19	1064 ± 240	984 ± 196	1010 ± 323	0,684
<b>MPV (fL)</b>	7,1a ± 0,1	7,8b ± 0,1	7,7b ± 0,1	7,8b ± 0,3	0,003

Obs.: Dados expressos em Média e DP\* ANOVA; DP = desvio-padrão < 0,05 N = 4 por grupo. Letras distintas indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância. RBC – Contagem de células vermelhas, HGB – Hemoglobina, HCT – Hematócrito, MCV – Volume corpuscular médio, MCH – Hemoglobina corpuscular média, MCHC – concentração hemoglobínica corpuscular média, CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média. RDW – Amplitude de distribuição das hemácias, PLT – Plaquetas – MPV – Volume plaquetário médio

**Tabela 2** - Distribuição das médias dos parâmetros hematológicos (série branca) dos ratos analisados no experimento em relação aos grupos.

<i>Hemograma Série Branca (Média ± DP)</i>					
	<i>Controle negativo</i>	<i>Control positivo</i>	<i>MTX</i>	<i>Pouteria</i>	<i>p*</i>
<b>WBC (10<sup>3</sup> /μL)</b>	4,4 ± 3,0	8,8 ± 2,6	9,8 ± 3,2	9,6 ± 5,7	0,317
<b>NEUT (%)</b>	7,0 ± 5,1	11,6 ± 1,6	10,4 ± 3,4	13,0 ± 4,3	0,247
<b>LYMPH (%)</b>	63,3a ± 12,3	37,7b ± 5,1	41,0b ± 9,1	44,2b ± 6,7	0,011
<b>MONO (%)</b>	20,8a ± 5,6	42,7b ± 6,3	40,9b ± 7,2	35,4b ± 4,0	0,002
<b>EOS (%)</b>	3,7 ± 1,9	1,2 ± 0,7	1,3 ± 1,1	1,1 ± 1,0	0,060
<b>BASO (%)</b>	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,788
<b>LUC (%)</b>	5,2 ± 1,3	6,8 ± 1,1	6,1 ± 1,3	6,2 ± 2,4	0,675
<b>NEUT (10<sup>3</sup> /μL)</b>	0,2a ± 0,1	1,0b ± 0,2	1,0b ± 0,4	1,1b ± 0,6	0,040
<b>LYMPH (10<sup>3</sup> /μL)</b>	3,0 ± 2,4	3,2 ± 0,9	4,1 ± 1,7	4,4 ± 2,9	0,781
<b>MONO (10<sup>3</sup> /μL)</b>	0,8a ± 0,3	3,8b ± 1,6	3,9b ± 1,0	3,3b ± 1,8	0,049
<b>EOS (10<sup>3</sup> /μL)</b>	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,535
<b>BASO (10<sup>3</sup> /μL)</b>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,211
<b>LUC (10<sup>3</sup> /μL)</b>	0,2 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,3	0,7 ± 0,7	0,541

Obs.: Dados expressos em Média e DP\* ANOVA; DP = desvio-padrão < 0,05 N = 4 por grupo Letras distintas indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância. WBC – Contagem de células brancas, NEUT (%) - Porcentagem de neutrófilos, LYMPH (%) – Porcentagem de linfócitos, MONO (%) – Porcentagem de monócitos, EOS (%) porcentagem de eosinófilos, BASO (%) – Porcentagem de basófilos, LUC (%) – Células grandes não coradas, NEUT (10<sup>3</sup>/μL) – porcentagem de neutrófilos, LYMPH (10<sup>3</sup>//μL) – Porcentagem de linfócitos, MONO (10<sup>3</sup>//μL) – Porcentagem de monócitos, EOS (10<sup>3</sup>//μL) – Porcentagem de eosinófilos, BASO (10<sup>3</sup>//μL) – Porcentagem de basófilos, LUC (10<sup>3</sup>//μL) – Porcentagem de células grandes não coradas.

**Tabela 3** - Distribuição das médias dos parâmetros bioquímicos dos ratos analisados no experimento em relação aos grupos.

	<i>Bioquímica (Média ± DP)</i>				<i>p*</i>
	<i>Controle Negativo</i>	<i>Controle positivo</i>	<i>MTX</i>	<i>Pouteria</i>	
<b>AST</b>	<i>156,0 ± 99,6</i>	<i>129,8 ± 54,4</i>	<i>146,8 ± 27,6</i>	<i>182,5 ± 26,4</i>	<i>0,602</i>
<b>ALT</b>	<i>54,7 ± 3,2</i>	<i>58,2 ± 3,8</i>	<i>57,8 ± 4,6</i>	<i>65,2 ± 10,7</i>	<i>0,219</i>
<b>UREIA</b>	<i>43,3 ± 1,2</i>	<i>39,5 ± 4,4</i>	<i>42,8 ± 6,4</i>	<i>44,0 ± 3,2</i>	<i>0,518</i>
<b>FOSF.</b>	<i>242,3 ± 25,7</i>	<i>239,0 ± 70,8</i>	<i>247,0 ± 25,7</i>	<i>276,8 ± 70,2</i>	<i>0,764</i>
<b>AMIL</b>	<i>1214 ± 190</i>	<i>1063 ± 143</i>	<i>1174 ± 123</i>	<i>1002 ± 178</i>	<i>0,295</i>
<b>CREA</b>	<i>0,6 ± 0,0</i>	<i>0,5 ± 0,1</i>	<i>0,6 ± 0,0</i>	<i>0,6 ± 0,1</i>	<i>0,213</i>

Obs.: Dados expressos em Média e DP\* ANOVA; DP = desvio-padrão < 0,05 N = 4 por grupo.

## 5. Referências (segundo Vancouver)

1. Bläss S, Engel JM, Burmester GR. The immunologic homunculus in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 1999;42(12):2499-506.
2. Köller MD. Targeted therapy in rheumatoid arthritis. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2006;156(1-2):53-60.
3. Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Cytokines in rheumatoid arthritis. *Current rheumatology reports*. 2002;4(3):208-17.
4. Kulmatycki KM, Jamali F. Drug disease interactions: role of inflammatory mediators in disease and variability in drug response. *J Pharm Pharm Sci*. 2005;8(3):602-25.
5. Billingham M. Models of arthritis and the search for anti-arthritic drugs. *Pharmacology & therapeutics*. 1983;21(3):389-428.
6. Pearson CM. Experimental joint disease:: Observations on adjuvant-induced arthritis. *Journal of chronic diseases*. 1963;16(8):863-4, IN5-IN8, 5-74.
7. Carneiro ALB, Teixeira MFS, Oliveira VMAd, Fernandes OCC, Cauper GSdB, Pohlit AM. Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008;103(1):31-8.
8. Oliveira VMAd, Carneiro ALB, Cauper GSdB, Pohlit AM. In vitro screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. *Acta Amazonica*. 2009;39(4):973-80.
9. Hamilton P. The haematology laboratory and the rheumatologist. *Clinics in rheumatic diseases*. 1983;9(1):69.
10. Vreugdenhil G, Wognum A, Van Eijk H, Swaak A. Anaemia in rheumatoid arthritis: the role of iron, vitamin B12, and folic acid deficiency, and erythropoietin responsiveness. *Annals of the rheumatic diseases*. 1990;49(2):93-8.
11. Baer AN, Dessypris EN, Krantz SB, editors. *The pathogenesis of anemia in rheumatoid arthritis: a clinical and laboratory analysis*. Seminars in arthritis and rheumatism; 1990: Elsevier.
12. Ehrenfeld M, Shoenfeld Y. Hematologic manifestations of rheumatoid arthritis. *UpToDate* 2013; Disponível em: [http://www.uptodate.com/contents/hematologic-manifestations-of-rheumatoid-arthritis?source=search\\_result&search=artrite+reumatoide&selectedTitle=14~150#H17176236](http://www.uptodate.com/contents/hematologic-manifestations-of-rheumatoid-arthritis?source=search_result&search=artrite+reumatoide&selectedTitle=14~150#H17176236). Acesso em: 06/04/2014
13. PANUSH RS, FRANCO AE, SCHUR PH. Rheumatoid arthritis associated with eosinophilia. *Annals of internal medicine*. 1971;75(2):199-203.
14. Farr M, Scott D, Constable T, Hawker R, Hawkins C, Stuart J. Thrombocytosis of active rheumatoid disease. *Annals of the rheumatic diseases*. 1983;42(5):545-9.
15. Cai X, Wong Y, Zhou H, Liu Z, Xie Y, Jiang Z, et al. Manipulation of the induction of adjuvant arthritis in Sprague-Dawley rats. *Inflammation Research*. 2006;55(9):368-77.
16. Simoes S, Delgado T, Lopes R, Jesus S, Ferreira A, Morais J, et al. Developments in the rat adjuvant arthritis model and its use in therapeutic evaluation of novel non-invasive treatment by SOD in Transfersomes. *Journal of controlled release*. 2005;103(2):419-34.
17. Cai X, Wong Y, Zhou H, Xie Y, Liu Z, Jiang Z, et al. The comparative study of Sprague-Dawley and Lewis rats in adjuvant-induced arthritis. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2006;373(2):140-7.
18. Görög P, Kovács B. Thrombus formation, hemostasis, adhesiveness of leukocytes and morphological abnormalities in the microcirculation of adjuvant arthritic rats. *Agents and actions*. 1976;6(5):607-12.
19. Glenn EM, Bowman B, Rohloff N, Seely R. A major contributory cause of arthritis in adjuvant-inoculated rats: granulocytes. *Agents and actions*. 1977;7(2):265-82.
20. Martins JEC. *Plantas medicinais de uso na Amazônia: Cultural CEJUP*; 1989.
21. Rodrigues RM. *A flora da Amazônia*. 1 ed. Belém: CEJUP; 1989. 316 p.
22. Martins J. *Plantas medicinais de uso na Amazônia*. Amazônia Belém: CEJUP. 1989.
23. Rodrigues RM. *A flora da Amazônia*. Belem: CEJUP 463p- Por (En) Geog. 1989;4.
24. Duke JA, Vasquez R. *Amazonian ethnobotanical dictionary*: CRC; 1994.
25. Merini LR, Furtado SC, Guimarães MR, Junior JRG, Barcellos JFM. Citocinas Pró-inflamatórias em Artrite Induzida por Adjuvante: Uma Revisão da Ação Imunomoduladora de Substâncias Bioativas. *Scientia Amazonia*. 2012;1(3):27-39.
26. Merini LR, Furtado SdC, Oliveira MMBd, Carneiro ALB, Boechat AL, Barcellos JFM. Attenuation of adjuvant-induced arthritis in rats by phonophoresis with an aqueous gel of the Amazonian plant *Elaeoluma nuda* (Sapotaceae). *Cytokine*. 2014;65(2):231-5.
27. Carneiro ALB, Teixeira MFS, Oliveira VMA, Fernandes OCC, Cauper GSB, Pohlit AM. Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008;103(1):31-8.
28. Joe B, Wilder RL. Animal models of rheumatoid arthritis. *Molecular medicine today*. 1999;5(8):367.
29. Knight B, Katz D, Isenberg D, Ibrahim M, PAGE S, Hutchings P, et al. Induction of adjuvant arthritis in mice. *Clinical & Experimental Immunology*. 1992;90(3):459-65.

30. Mia MY, Kim EY, Satpute SR, Moudgil KD. The dynamics of articular leukocyte trafficking and the immune response to self heat-shock protein 65 influence arthritis susceptibility. *Journal of clinical immunology*. 2008;28(5):420-31.
31. RK B, M K, K M. Reexamination of the difference in susceptibility to adjuvant-induced arthritis among LEW/Crj, Slc/Wistar/ST and Slc/SD rats. *Experimental animals*. 2002;51(2):197-201.
32. Waynforth HB, Flecknell PA. *Experimental and surgical technique in the rat*: Academic Press London; 1980.
33. Inglis JJ, Nissim A, Lees DM, Hunt SP, Chernajovsky Y, Kidd BL. The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(4):R807-16.
34. Colman D, de Melo MCBF, Brioschi ML, Silveira F, Júnior MC. Análise da Redistribuição de Calor com Agentes Inalatórios, em Ratos Submetidos a Laparotomia e Pneumoperitônio, através da Termografia Infravermelha. *Rev Bras Anesthesiol*. 2002;52(3):307-15.
35. Konan NA, Bacchi EM, Lincopan N, Varela SD, Varanda EA. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (< i> *Anacardium occidentale*</i> L.). *Journal of ethnopharmacology*. 2007;110(1):30-8.
36. Carvalho ALN, Annoni R, Silva PRP, Borelli P, Fock RA, Trevisan MTS, et al. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (< i> *Anacardium occidentale*</i> Linn.) in mice. *Journal of ethnopharmacology*. 2011;135(3):730-6.

## 6. Cronograma de Atividades

Nº	Descrição	Ago 2014	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2015	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Revisão de Literatura	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
2	Rodagem do Hemograma			R	R								
3	Rodagem Funções Renais e Hepáticas (Bioquímica)												
4	Elaboração do Relatório Parcial					R	R						
5	Preparação trabalho revisão parâmetros hematológicos em Roedores		R	R	R	R	R	R	R	R	R		
6	Encaminhamento artigo												R
7	- Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória)										R	R	
8	- Preparação da Apresentação Final para o Congresso (atividade obrigatória)											R	R

**R = Realizado**

**X = A realizar**