



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - 2013/2014



ANÁLISE RADIOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DE PATAS DE RATOS
LEWIS COM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE E TRATADOS COM
EXTRATO DE *Pouteria nuda*.

Bolsista: Jaime Ribas Galvão Júnior, CNPq

MANAUS – AM
2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - 2013/2014



RELATÓRIO FINAL
PIB-S-0003/2013

ANÁLISE RADIOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DE PATAS 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 – AM
2014

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. Suas repercussões são potencialmente graves, não só pela morbidade associada à dor, à limitação funcional e à repercussão na qualidade de vida dos pacientes, mas por mortalidade maior em relação à população em geral. A Floresta Amazônica é a maior floresta tropical do mundo, centro de diversidade biológica, e possui um grande reservatório de novas moléculas bioativas e agentes fitoterapêuticos. Algumas espécies de plantas desta região vêm demonstrando ação antiinflamatória, antibacteriana e antifúngica. Este projeto analisou a ação do extrato de *P. nuda* no modelo de Artrite Induzida por Adjuvante Completo de Freund em Ratos Lewis. O extrato metanólico de *P. nuda* foi administrado por via oral aos ratos com Artrite Induzida por Adjuvante completo de Freund na dose de 150mg/kg/semana durante 04 semanas consecutivas. A incidência e severidade da doença foram avaliadas por achados radiológicos e histológicos. Os resultados demonstraram grau de severidade da doença semelhante entre o grupo controle positivo e o grupo tratado com extrato de *P. nuda* comparado com o grupo tratado com a droga de referência. A histologia da articulação metatarsofalângica das patas dos animais dos grupos inoculados com ACF apresentaram manifestações artríticas na membrana sinovial quando comparados ao grupo controle negativo. O escore radiológico foi superior no grupo tratado com extrato de *P. nuda*. Estes achados sugerem que o extrato metanólico de *P. nuda* por via oral na dose de 150mg/kg/semana não apresentou ação imunomoduladora na Artrite Induzida por Adjuvante nas condições locais. Este projeto é 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 FONOSE EM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE EM RATOS LEWIS** (Mestrado), ambos já concluídos.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	5
2.	REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1	Artrite Reumatoide	6
2.1.1	Diagnóstico	6
2.1.2	Epidemiologia	7
2.1.3	Manifestações Clínicas	7
2.1.4	Tratamento Medicamentoso	7
2.1.5	Fitoterapia	8
2.1.5.1	Indícios etnofarmacológicos da <i>Pouteria nuda</i>	8
2.1.5.2	Modelos experimentais (<i>in vivo</i>)	9
2.1.6	Artrite induzida por adjuvante (AIA)	9
2.1.7	Imagenologia das patas de ratos com artrite induzida por adjuvante	10
2.1.8	Histopatologia das patas de ratos com artrite induzida por adjuvante	10
3.	OBJETIVOS	12
3.1.	Objetivo Geral	12
3.2.	Objetivos Específicos	12
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1.	Fases do experimento	13
4.2.	Estudo radiológico	13
4.3.	Análise radiológica	13
4.4.	Análise Histopatológica	13
4.5.	Extrato	14
4.6.	Animais	14
4.7.	Modelo de indução de artrite (<i>M. tuberculosis</i>)	14
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5.1.	Imagenologia	15
5.2.	Histopatologia	20
6.	CONCLUSÃO	25
7.	CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	26
	REFERÊNCIAS (SEGUNDO VANCOUVER)	27
	ANEXOS	30

1. Introdução

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica crônica, de etiologia desconhecida, que acomete primariamente o tecido sinovial. A AR diminui a sobrevida e afeta significativamente a qualidade de vida na maioria dos pacientes por acometer o tecido sinovial, proliferando de forma descontrolada e resultando em produção excessiva de líquido, destruição da cartilagem, erosão óssea adjacente e dano aos tendões e ligamentos ⁽¹⁾. Suas repercussões são potencialmente graves, não só pela morbidade associada à dor, à limitação funcional e à repercussão na qualidade de vida dos pacientes, mas por mortalidade maior em relação à população em geral ⁽²⁾.

Para aprimorar os conhecimentos acerca desta doença utiliza-se um modelo experimental, conhecido como artrite induzida por adjuvante (AIA), que foi inicialmente estabelecida 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 ^{(3); (4)}.

Os trabalhos sobre estudos terapêuticos experimentais contra a AR, segundo Okamoto *et al.* (2010) ⁽⁵⁾ e Durai *et al.* (2009) ⁽⁶⁾, 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 ⁽⁵⁾.

Substâncias químicas derivadas de animais, plantas e microrganismos, como bactérias e fungos, têm sido utilizadas para tratar doenças humanas desde o início da medicina ⁽⁷⁾. Extratos vegetais (bioprospecção) de produtos da Amazônia têm sido estudados com boas estimativas para aplicação na saúde humana. Algumas espécies de plantas desta região vêm demonstrando ação antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica e hemolítica ^{(8); (9); (10); (11)}. Dentro deste contexto, o extrato de *Pouteria nuda* Sapotaceae foi utilizado para testar *in vivo* a ação fitoterápica desta planta. Esta espécie não tem uso medicinal conhecido, porém estudos recentes indicaram atividade antimicrobiana ⁽⁹⁾ e hemolítica ⁽¹¹⁾.

O estudo radiológico de ratos com artrite induzida por adjuvante (AIA) constitui um método diagnóstico com respaldo na literatura. O envolvimento articular das patas dos ratos na AIA pode ser avaliado por imagens radiológicas, utilizando-se uma película de radiografia odontológica. Segundo Cai e colaboradores ⁽¹²⁾, leva-se em consideração a reabsorção da matriz óssea, a formação de novo periósteo, a erosão articular e a erosão óssea.

Considerando o estudo da ação *in vivo* do extrato de *Pouteria nuda* no tratamento da artrite reumatoide induzida por adjuvante, foi proposto o estudo radiológico e histopatológico das patas dos animais em questão, como um meio de análise dos resultados obtidos a partir do uso do fitoterápico. Avaliando-se assim as seguintes alterações: reabsorção da matriz óssea, formação de novo periósteo, erosão articular e erosão óssea.

2. Revisão de literatura

2.1 Artrite Reumatoide

Historicamente Artrite Reumatoide é entendida como uma condição clínica potencialmente grave, pela morbidade associada à dor, à limitação funcional e à repercussão na qualidade de vida dos pacientes ⁽²⁾. Ao longo dos anos a AR vem sendo estudada a fim de elucidar seus mecanismos imunopatológicos e ambientais.

A partir de pesquisas sobre AR, da Silva Júnior e Rocha (2006) ⁽¹³⁾ definem-na como uma 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; e segundo a Sociedade Brasileira de Reumatologia a AR é uma doença autoimune de etiologia desconhecida, caracterizando-se por poliartrite periférica simétrica que leva à deformidade e destruição das articulações por erosão do osso e cartilagem.

2.1.1 Diagnóstico

A importância do diagnóstico precoce baseia-se no fato de ser uma doença bastante limitante e por acometer inúmeras articulações levando a diminuição de funcionalidade ao longo da sua evolução. O diagnóstico deve ser baseado na associação de uma série de sintomas e sinais clínicos, bem como marcadores sorológicos, fator reumatoide e o Anti-CCP (peptídeo cíclico citrulinado) ⁽¹⁴⁾; ⁽¹⁵⁾. Entre os antígenos citrulinados reconhecidos por auto-anticorpos estão a profilagrina, a filagrina e a vimentina servindo como base de diagnóstico ⁽¹⁶⁾.

De acordo com o Colégio Americano de Reumatologia e a Liga Européia de Combate ao Reumatismo (EULAR), publicado em setembro de 2010 os novos critérios de Classificação da AR são:

CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DA ARTRITE REUMATOIDE ⁽¹⁷⁾:

Domínios	Pontos*
Envolvimento articular	
1 articulação média grande	1
2 -10 articulações médias – grandes	2
4 -10 articulações pequenas	3
> 10 articulações pequenas	5
Sorologia	
Fator Reumatoide e Anti-CCP negativos	0
Fator Reumatoide e/ou Anti-CCP baixos títulos	2
Fator Reumatoide e/ou Anti-CCP altos títulos	3
Duração da Sinovite	
< 6 semanas	0
> 6 semanas	1
Provas Inflamatórias	
VHS** e PCR*** normais	0
VHS e/ou PCR elevados	1

* Para o diagnóstico são necessários 6 pontos (AR estabelecida);

** VHS – Velocidade de hemossedimentação;

*** PCR – Proteína C reativa.

Os níveis de Proteína C reativa e Velocidade de Hemossedimentação são parâmetros frequentemente utilizados para demonstrar atividade inflamatória, e também são critérios para acompanhamento da atividade clínica da AR, estando mais elevados na maioria dos pacientes com AR ativa (18). O FR está quase sempre presente em pacientes com AR (cerca de 70%-90%), e seus níveis podem ser diretamente correlacionados à gravidade da doença (18). Porém, o FR não é específico, estando presente também em uma série de outras condições clínicas. Um exame bastante específico desenvolvido nos fins da década de 1970 é a dosagem dos anticorpos anti-CCP (18). Apesar de estarem presentes em apenas 67% dos pacientes com AR, segundo metanálise realizada em 2005 por Visser (19), o resultado positivo de sua dosagem possui alta especificidade (> 96%) para o diagnóstico de AR. Atualmente é considerado por muitos investigadores o marcador mais específico para o diagnóstico de AR, como demonstrado recentemente pelo estudo de Zhao *et. al* (20).

2.1.2 Epidemiologia

A prevalência da AR é estimada em 1% da população adulta e a maior incidência ocorre entre os 35-65 anos. Está associada aos genes HLA-DR4 e HLA-DR1 (presente em 60% dos pacientes) (18) e apesar de não haver risco de vida, é uma doença que causa diminuição da qualidade de vida do paciente e leva a graves danos econômicos para a sociedade (21). No Brasil, um estudo multicêntrico verificou prevalência de AR do adulto variando de 0,2% a 1% (22).

Segundo Abbas (23), a AR acomete mais mulheres do que homens, na proporção de 3:1 e sua incidência aumenta com a idade, tendendo a aparecer na quarta década de vida, com um pico de incidência na quinta década (21, 24).

2.1.3 Manifestações Clínicas

A AR instala-se de maneira insidiosa e progressiva, levando de semanas a meses até se estabelecer completamente. Os sintomas mais frequentes podem ser: astenia, fadiga, mal estar, febre baixa, dores musculoesqueléticas vagas, rigidez e edema. As articulações mais frequentemente envolvidas são: punhos, metacarpofalangeanas (MCFs), interfalangeanas proximais das mãos (IFPs), metatarsofalangeanas (MTFs), ombros, e joelhos. Com a evolução do quadro, outras articulações podem ser afetadas entre elas: tornozelos, coxofemorais, cotovelos, interfalangeanas distais das mãos (IFDs), IFPs e IFDs dos pés, a coluna cervical, esternoclaviculares, cricoaritenoides e as sinoviais entre os ossículos dos ouvidos (1).

Entre as manifestações extra-articulares mais comuns, portadores de AR podem apresentar nódulos subcutâneos, ceratoconjuntivite seca, acometimento pleural e pericárdico, além de vasculites (18).

2.1.4 Tratamento Medicamentoso

O início do tratamento precoce é fundamental para o controle e para prevenir incapacidade funcional e lesão articular, tendo como principal objetivo prevenir a perda de função bem como a diminuição da dor, maximizando a qualidade de vida desses pacientes (15).

A sociedade Brasileira de Reumatologia em seu Projeto Diretriz para diagnóstico e tratamento da artrite reumatoide de 2002, demonstra que a cloroquina/hidroxicloroquina, sulfazalina e metotrexato são as drogas que detêm a melhor relação risco-benefício, sendo assim preferidas no início do tratamento.

Drogas não esteroidais como o Infliximab potencializam o efeito do metotrexato na artrite reumatoide. A chamada terapia biológica têm ainda, efeito supressivo (não-curativo), com possível toxicidade, alto custo e inconveniência por tratar-se de proteínas necessariamente parenterais⁽²⁵⁾.

2.1.5 Fitoterapia

Drogas anti-inflamatórias convencionais (alopáticas) são a base do tratamento para uma variedade de distúrbios imunológicos, inclusive a artrite reumatoide^(26, 27), assim como os anti-inflamatórios não esteroidais e também as drogas de terapia biológica (como o anticorpo anti-TNF- α). No entanto, o uso destas drogas está associado a efeitos adversos graves, incluindo hemorragias gastrointestinais e cardiovasculares⁽²⁸⁾. Devido aos efeitos colaterais e ao alto custo dos medicamentos anti-inflamatórios usados convencionalmente, os pacientes com artrite estão cada vez mais usando a medicina complementar e alternativa com base em plantas medicinais^(29, 30). No entanto, apesar do crescente uso e popularidade dos produtos à base de plantas medicinais no mundo ocidental^(30, 31), uma das principais limitações do seu uso é a informação escassa sobre seus mecanismos de ação e objetividade na avaliação da eficácia⁽³²⁾. Isso também é umas das principais razões para o ceticismo em relação à medicina alternativa e complementar tanto por parte de leigos quanto por parte de profissionais⁽²⁸⁾.

Diferentes espécies de plantas têm ação antimicrobiana⁽⁹⁾, efeito leishmanicida, efeito analgésico, anti-inflamatório e antifúngico. Estudos com plantas como *Harpagophytum procumbens* (Garra do Diabo), *Salix* spp (Salgueiro), *Copaifera* L. (Copaíba) dentre outras, demonstraram ação antiinflamatória^{(8); (33)} assim como a espécie do gênero *Pouteria*, *Pouteria campechiana*, mostrou atividade antiinflamatória⁽³⁴⁾.

2.1.5.1 Índícios etnofarmacológicos da *Pouteria nuda*

O gênero *Pouteria* possui aproximadamente 80 espécies. Quanto ao uso popular pode-se citar o uso como desinfetante, purgativo, vermífugo, afrodisíaco, na hemorragia e na disenteria⁽³⁵⁾.

Carneiro, *et al.* (2008)⁽⁹⁾ estudou a atividade antimicrobiana *in vitro* e hemolítica de 12 espécies de plantas da biodiversidade Amazônica, entre elas, a *Pouteria nuda* (*Elaeoluma nuda*). Os compostos químicos dessas espécies apresentaram substâncias bioativas de alto interesse biofarmacológico como os terpenoides, flavonoides e saponinas.

Os únicos trabalhos realizados com a espécie *Pouteria nuda*, também conhecida como *E. nuda* foram realizados em Manaus-AM. A coleta foi feita na Reserva Duke no ano de 2006 e sua exsicata está depositada no Herbário do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia).

O extrato obtido das folhas, galhos e cascas da planta tiveram um teor extrativo variando entre 7 e 15%, onde o extrato das folhas apresentou o maior rendimento (15,86%)⁽⁹⁾.

Para estabelecer a concentração inibitória mínima (MIC) foram testadas diferentes diluições de extratos de *Pouteria nuda* em sangue humano e estes, apresentaram atividade inibitória de agregação plaquetária de 97% em relação ao controle de aspirina⁽⁹⁾.

2.1.5.2 Modelos experimentais (*in vivo*)

Modelos experimentais são ferramentas que estimulam aspectos básicos da doença articular contribuindo para a compreensão da fisiopatologia e também para ensaios pré-clínicos de novas terapias medicamentosas⁽³⁶⁾.

Nenhum modelo animal representa verdadeiramente a doença humana, mas mimetizam vários aspectos da patologia podendo ser usados como ferramentas para compreender e elucidar seus mecanismos⁽³⁷⁾.

O processo de erosão da cartilagem na AR permanece difícil de avaliar em pacientes. A biópsia sinovial é realizada na artrite precoce, mas amostras de lesão óssea e da cartilagem ficam disponíveis apenas no final da doença, após a substituição da articulação. Modelos, portanto, fornecem ferramentas valiosas.

2.1.6 Artrite induzida por adjuvante (AIA)

Um dos modelos experimentais mais convenientes para induzir artrite em ratos, camundongos e coelhos é o de inoculação de agentes imunogênicos como o *Mycoplasma arthritidis*, *Mycobacterium butyricum* e o *Mycobacterium tuberculosis*. O microorganismo migra para as articulações e estabelece uma infecção local possivelmente devido a um sítio específico de adesão molecular⁽³⁸⁾.

O Modelo de Artrite Induzida por Adjuvante (AIA) foi desenvolvido por Pearson em 1956, em ratos Lewis, sendo este o modelo mais amplamente aplicado e reconhecido na literatura. No ano de 2006 o modelo completou 50 anos e o número de citações da publicação original de Pearson atingiu a marca de 700 na literatura científica^{(4), (39)}.

Desde então vários modelos animais para o estudo de artrite tem sido desenvolvidos, sendo um dos mais aplicados o Modelo de Artrite Induzida pelo Colágeno (*Collagen-Induced Arthritis-CIA*), que mimetiza diversos aspectos da doença humana, mantendo ainda o uso do adjuvante Completo de Freund em seu protocolo de indução^{(36); (37)}.

Além disso, conforme observou Bevaart e colaboradores⁽⁴⁰⁾, quando a eficácia de vários compostos é testada frente a modelos AIA e/ou CIA, o valor preditivo de eficácia clínica em humanos com Artrite Reumatoide é maior do que qualquer outro modelo isoladamente.

A AIA é um modelo que promove o desenvolvimento de poliartrite simétrica, destruição articular, infiltrado inflamatório com envolvimento de células T, hiperplasia sinovial. O dano cartilaginoso é menos severo que na AR, apresenta mais destruição óssea, não há produção de fator reumatóide como na doença humana e, eventualmente, a pele e o tubo digestivo são afetados⁽⁴⁰⁾.

A artrite induzida por adjuvante é iniciada pela inoculação de Adjuvante completo de Freund (ACF) na base da cauda dos animais. O ACF é uma mistura viscosa e sem cor, constituída de 85% de óleo mineral, 15% de emulsificante, além do componente antigênico *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) mortos

pelo calor e liofilizados^{(41), (42)}. A cepa H37Ra do *M. tuberculosis* é amplamente utilizada no preparo do ACF, embora outras cepas tenham sido utilizadas com sucesso⁽⁴³⁾.

2.1.7 Imagenologia das patas de ratos com artrite induzida por adjuvante

Em estudo realizado por Talwar e colaboradores⁽⁴⁴⁾, foi possível observar à radiografia que ratos tratados com adjuvante desenvolveram estreitamento definitivo do espaço articular das articulações intertarsais, edema de tecidos moles, espessamento periosteal evidente, alargamento cístico do osso e extensivas erosões que produziram estreitamento ou pseudo-ampliação de todos os espaços articulares.

Segundo Esser e colaboradores⁽⁴⁵⁾, em seu estudo por imagem da análise quantitativa de alterações em ratos com artrite induzida por adjuvante, foram evidenciadas alterações significativas como diminuição da densidade justa-articular óssea, seguida por aumentos progressivos da variação do valor de cinza devido a perda e formação ósseas. Enfim, a formação óssea em ratos com artrite resultou em um aumento da variação do valor de cinza maior do que aquele observado em ratos sem artrite.

Outros exames de imagem como a ressonância magnética demonstraram alterações como inflamação periarticular com sinovite evidenciada e distensão da cápsula articular no tecido ao redor. Também foi evidenciada periostite com osteólise, e a formação de novo osso periosteal progredindo para um estado de anquilose completa⁽⁴⁶⁾. Assim demonstrando uma possibilidade não invasiva de acesso/monitoramento ao dano articular e ou diminuição deste em animais ou pacientes em processo artrítico.

2.1.8 Histopatologia das patas de ratos com artrite induzida por adjuvante

O estudo histopatológico das patas de ratos com artrite induzida por adjuvante em geral revelam presença de infiltrado celular predominante, angiogênese, hiperplasia sinovial intensa e formação (em grande ou pequena quantidade) de *pannus*^(47, 48). Há acentuada diminuição do espaço articular e erosão grave tanto cartilaginosa quanto óssea, presenciadas nas articulações sinoviais dos ratos com artrite^(47, 48).

Outras observações histológicas das articulações e tecidos periarticulares das patas dos ratos com artrite induzida incluem periartrite com infiltrado de polimorfonucleares, poucos leucócitos e muitas células mononucleares; peritendinite, proliferação de osteoblastos com formação de osteoide nos ossos adjacentes às articulações. Posteriormente, características encontradas em animais examinados a partir do 20º dia após o início da artrite em que a doença ou é inicialmente grave ou então persistente e progressiva, incluíram aderências fibrosas entre algumas superfícies articulares e espessamento fibroso denso das estruturas capsulares. Anquilose óssea em superfícies articulares ocorriam como um evento tardio⁽⁴⁹⁾.

Existe uma graduação dos níveis de gravidade histopatológica para ratos com artrite induzida por adjuvante (Tabela 1).

Tabela 1 - Gradação Histopatológica para a artrite adjuvante⁽⁵⁰⁾

Inflamação	Remodelamento Ósseo	Erosão Óssea
0 – Normal	0 – Normal	0 – Normal
1 – Poucas Células Inflamatórias	1 – Inflamação Medular	1 – Perda mínima de osso cortical ou trabecular em poucos locais
2 – Inflamação Leve	Mínima, e/ou enfraquecimento de cartilagem (≤ 2 focos)	2 – Perda leve de osso cortical ou trabecular em um número moderado de locais (geralmente tarso)
3 – Inflamação Moderada (frequentemente mas nem sempre difusa)	2 – Proliferação Periosteal Leve (geralmente tarsais), e/ou inflamação medular, e/ou enfraquecimento de cartilagem (≥ 3 focos)	3 – Perda moderada em muitos locais (geralmente o osso trabecular dos tarsos, mas às vezes o osso cortical da tíbia distal)
4 – Inflamação estabelecida (difusa e densa com abscessos sinoviais)	3 – Proliferação Periosteal Moderada com erosão mínima de osso cortical (metáfise tibial e/ou tarsal)	4 – Perda óssea estabelecida em muitos locais (geralmente como uma destruição extensa de osso trabecular nos tarsos, mas às vezes com perda parcial de osso cortical na tíbia distal)
	4 – Proliferação periosteal estabelecida com erosão extensa de osso cortical dos dois tarsos OU (menos frequentemente) da tíbia.	5 – Perda óssea estabelecida em muitos locais (com fragmentação do osso trabecular tarsal E penetração de toda a espessura do osso cortical na tíbia distal)
	5 – Proliferação periosteal estabelecida com erosão completa da espessura do osso cortical dos tarsos E tíbia.	

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

- Analisar imagens radiológicas de patas de ratos Lewis com artrite induzida por adjuvante e tratados com extrato de *Pouteria nuda*.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar alterações da matriz óssea das patas traseiras dos ratos com AIA
- Identificar a formação de novo perióstio nas patas traseiras dos ratos com AIA
- Caracterizar as erosões articular e óssea das patas comprometidas dos ratos com AIA

4. Materiais e Métodos

4.1. Fases do experimento

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

Na primeira parte os animais experimentais foram submetidos ao tratamento conforme descrito no texto e nesta segunda etapa, os animais foram sacrificados (abril e maio de 2013) e suas patas foram retiradas e processadas para análise. O acadêmico foi parte integrante de ambas as etapas.

4.2. Estudo radiológico

As radiografias foram obtidas de ambas as patas traseiras após o sacrifício dos animais, utilizando-se um aparelho de imagens mamográficas. Essas imagens foram obtidas utilizando-se um Mamógrafo GE Hungary zrt®, modelo MGF-101, que operava a 27kV e 63 mAs.

Foram utilizados cassetes radiográficos Fujifilm Type CH, de medida 24x30 cm (subespecificação HR-V), e tempo de revelação de 59 segundos. Para a revelação e digitalização das imagens, foi utilizado um sistema de mamografia digital Fujifilm FCR Capsula XL II, modelo CR-IR 359.

4.3. Análise radiológica

As imagens das patas traseiras dos ratos foram avaliadas para as alterações radiográficas por um profissional que desconhecia o tipo de tratamento em cada grupo. O responsável por essa avaliação foi o ortopedista do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), Dr. Eduardo Branco, sendo este um estudo duplo-cego, como citado anteriormente.

Cada radiografia foi avaliada quanto aos seguintes critérios: deformidade, cistos subcondrais, esclerose subcondral e irregularidade na superfície, usando-se o método de Clark ⁽⁵⁴⁾. Cada critério teve um escore de 0 a 3 ⁽⁴⁷⁾ sendo:

- 0 = Normal
- 1 = Alterações leves
- 2 = Alterações Moderadas
- 3 = Alterações Graves

4.4. Análise Histopatológica

Após a avaliação radiográfica, ambas as patas traseiras foram submetidas à preparação Histológica. Os ossos foram inicialmente descalcificados com ácido fórmico a 5% por 24 horas e então imersos em resina histológica para corte e coloração com azul de toluidina.

Dez seções da articulação metatarsofalangicas do 5º dedo de cada animal utilizado no experimento foram avaliadas para proliferação de células sinoviais, erosão de cartilagem, erosão do osso subcondral, proliferação de pannus e infiltrado mononuclear⁽⁵⁵⁾.

O baço dos animais utilizados foi removido no 30º dia de experimento, pesados e fixados com formol a 10% tamponado. Os cortes histológicos foram processados e corados com Hematoxilina e Eosina (HE).

4.5. Extrato

Foi utilizado o extrato aquoso de folhas de *Pouteria nuda* (Sapotaceae) coletada na reserva Adolpho Ducke-AM e processado no INPA (Instituto de Pesquisa da Amazônia) (9). O extrato bruto foi administrado por via oral nos animais (gavagem), na dose de 150mg/kg/semana.

4.6. Animais

Foram utilizados 16 ratos albinos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis, sendo que foram removidas as patas traseiras e fixadas em formol a 10%, totalizando 32 patas analisadas.

Os animais foram separados da seguinte forma:

- Grupo 1, controle negativo: sem indução de artrite e sem tratamento, n=04
- Grupo 2, controle positivo: 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 metotrexato, 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 o presente trabalho faz 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, as patas utilizadas foram dos animais já eutanasiados, fixados e acondicionados em potes de vidro com formalina tamponada 10%.

4.7. 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⁽⁵⁶⁾. 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^{(41); (57); (58)}. 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⁽⁵⁹⁾.

A primeira etapa do trabalho consistiu na evolução dos animais experimentais como descrito a seguir: após a sedação dos animais com halotano a 3% (inalação por 2-3 min)⁽⁶⁰⁾, 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⁽⁶⁰⁾, 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 aproximadamente 7 dias após a inoculação.

5. Resultados e Discussão

5.1. Imagenologia

No filme obtido através do aparelho mamográfico tem-se a possibilidade de visualizar e analisar várias patas de uma só vez, além de eliminar o viés de distância, presente na tomada das radiografias com o aparelho odontológico.

Erosões e destruição da cartilagem são características quase universais em articulações periféricas que foram cronicamente afetadas pela artrite reumatóide. Estas anomalias foram descritas por Scutellari e Orzincolo ⁽⁶²⁾ que citam áreas de descontinuidade ou lacunas na placa do osso subcondral a qual inferimos como cistos subcondrais.

Dos itens avaliados nos escore radiológico, a deformidade das superfícies articulares não foi detectada em nenhum grupo avaliado enquanto cistos subcondrais e esclerose subcondral foram encontrados tanto no grupo controle positivo quanto no grupo tratado com extrato de *P. nuda* (Figura 10), fazendo com que o escore radiológico fosse superior neste grupo.



Figura 1 - Patas Fixadas e acondicionadas em recipiente plástico de forma organizada, separadas em 4 grupos



Figura 2 – Tomada das radiografias com o mamógrafo: (A): ajuste para a tomada da radiografia; (B): tomada da radiografia

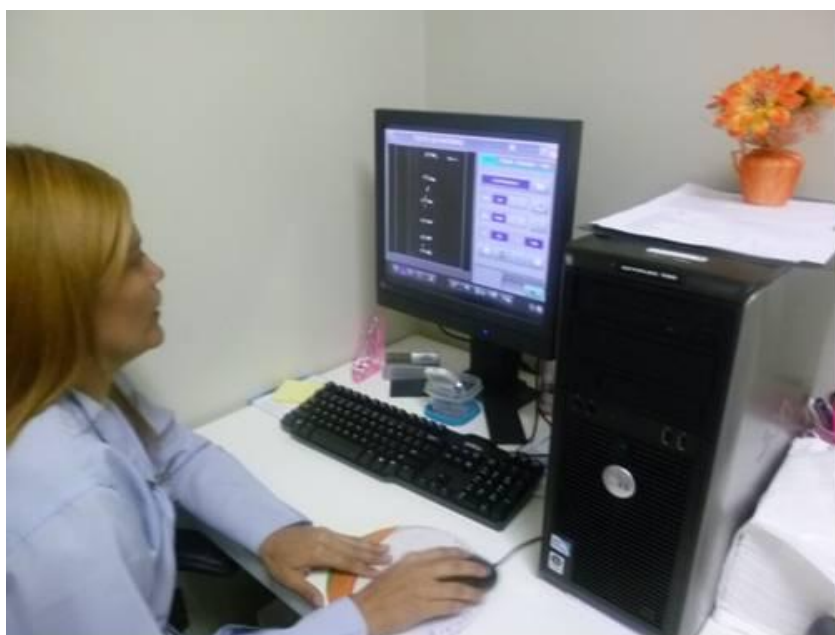


Figura 3 – Ajuste para a revelação do filme radiográfico obtido com o mamógrafo

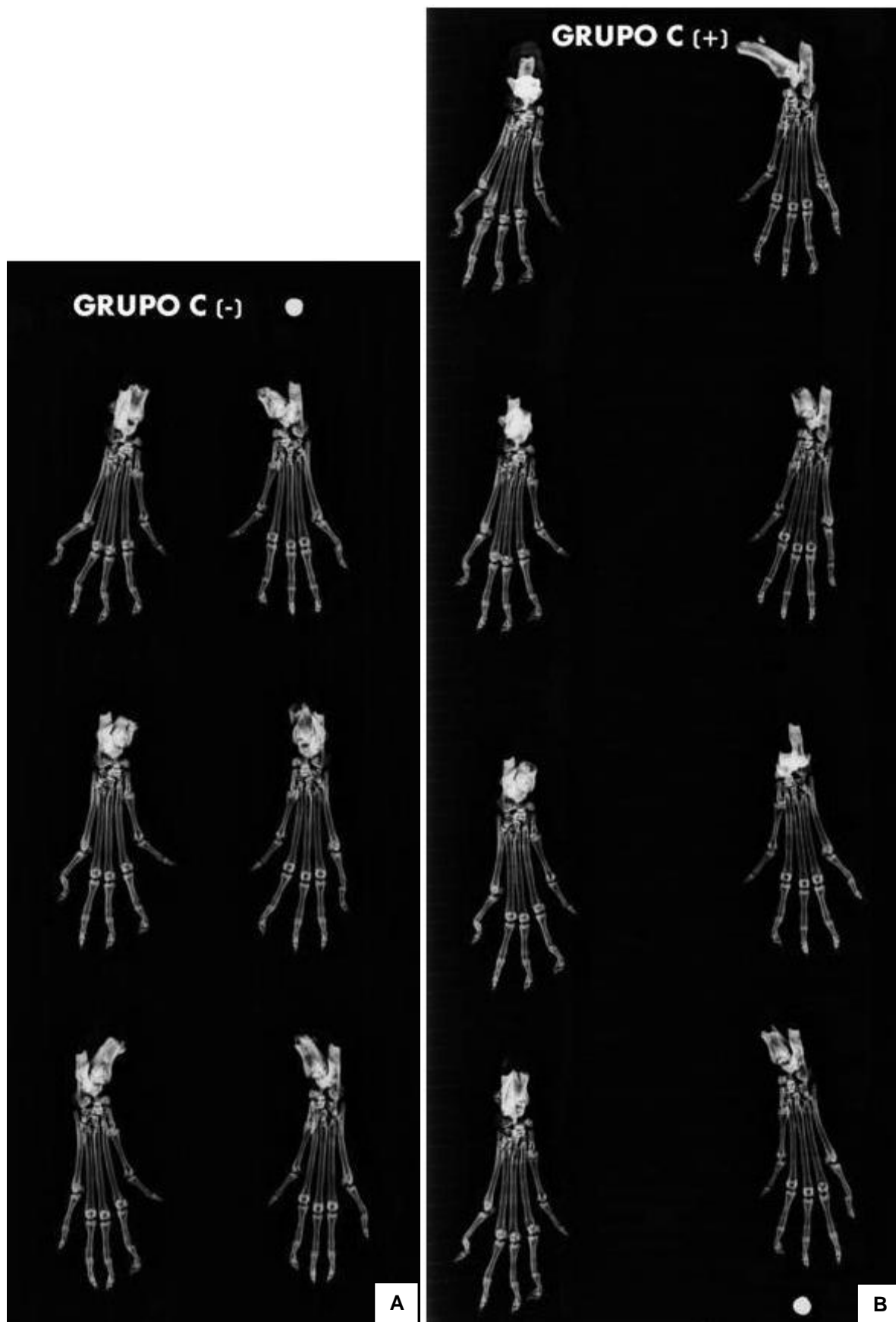


Figura 4 – Filme mamografico com as patas traseiras dos animais não tratados. Em (A): ratos Lewis sem indução da artrite e sem tratamento (Grupo controle Negativo). Em (B): ratos Lewis com artrite induzida por adjuvante e sem tratamento (Grupo controle positivo). O lado esquerdo é identificado pela microesfera metálica.

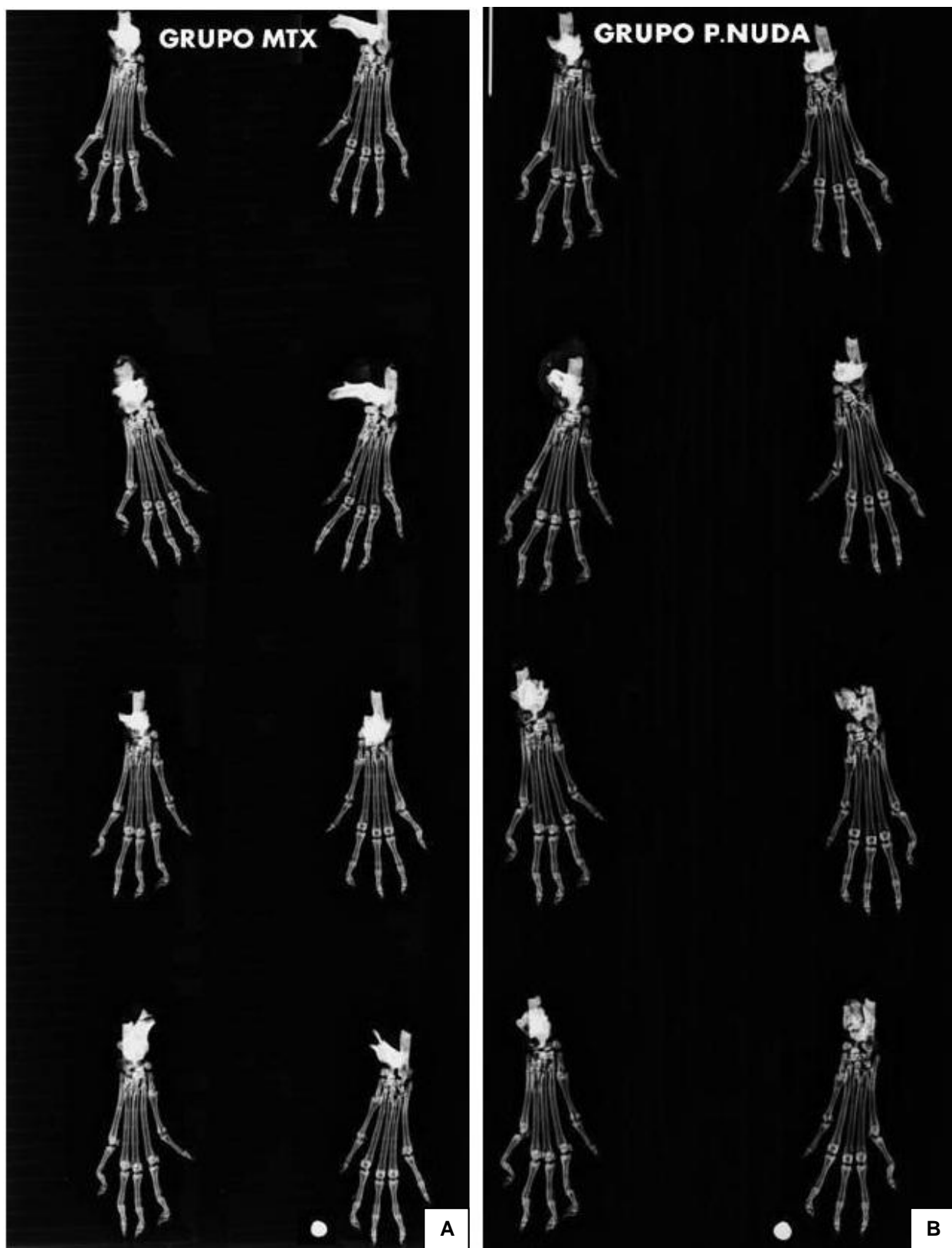


Figura 5 – Filme mamografico com as patas traseiras dos animais tratados. Em (A): ratos Lewis com artrite induzida por adjuvante e tratados com Metotrexato (Grupo MTX). Em (B): ratos Lewis com artrite induzida por adjuvante e tratado com extrato de *Pouteria nuda* (Grupo *P. nuda*). O lado esquerdo é identificado pela microesfera metálica.

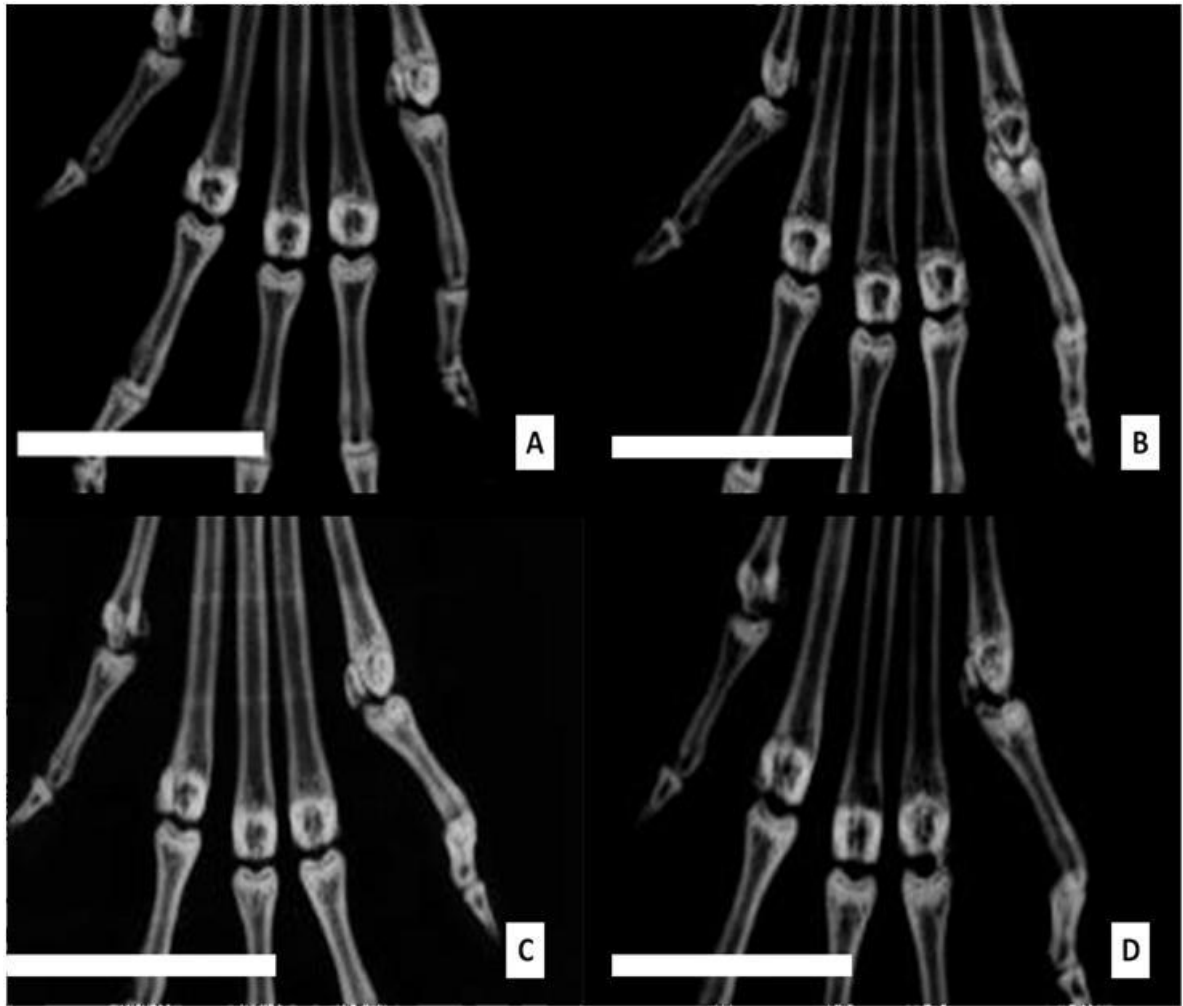


Figura 6 - Imagem radiológica das articulações metatarsofalangicas da pata esquerda dos grupos experimentais. Em A, animal do grupo controle negativo. Em B, animal do grupo controle positivo. Em C, animal do grupo tratado com metotrexato. Em D, animal do grupo tratado com extrato de *P. nuda*

Após a análise dos dados obtidos com as imagens, os resultados foram os seguintes para cada grupo e critérios analisados (Tabela 2):

- O grupo controle negativo não apresentou alteração em relação aos critérios avaliados, ou seja, todos foram considerados normais quanto a presença de deformidades, cistos subcondrais, esclerose subcondral e irregularidades na superfície;
- No grupo controle positivo, apenas 02 (dois) animais apresentaram alterações leves quando avaliados em relação a presença de esclerose subcondral. Quanto aos demais critérios, todos os animais apresentaram-se normais;
- No grupo tratado com metotrexato, nenhum animal apresentou alterações quanto a presença de deformidades, cistos subcondrais e irregularidades na superfície. Apenas 01 (um) animal apresentou alterações leves quando avaliado em relação a presença de esclerose subcondral;
- No grupo tratado com extrato de *P. nuda*, nenhum animal apresentou alterações quanto a presença de deformidades e irregularidades na superfície. Porém, 02 (dois) animais

apresentaram alterações leves quanto a presença de cistos subcondrais em suas patas traseiras. Ainda nesse grupo, 03 (três) animais apresentaram alterações leves quando avaliados em relação a esclerose subcondral.

Tabela 2 - Alterações radiográficas encontradas

		Grupo MTX	Grupo C(-)	Grupo C(+)	Grupo P. nuda
Deformidade	0 – Normal	08 patas	06 patas	08 patas	08 patas
	1 – Leve	0	0	0	0
	2 – Moderada	0	0	0	0
	3 – Grave	0	0	0	0
Cistos Subcondrais	0 – Normal	08 patas	06 patas	08 patas	04 patas
	1 – Leve	0	0	0	04 patas
	2 – Moderada	0	0	0	0
	3 – Grave	0	0	0	0
Esclerose Subcondral	0 – Normal	06 patas	06 patas	04 patas	02 patas
	1 – Leve	02 patas	0	04 patas	06 patas
	2 – Moderada	0	0	0	0
	3 – Grave	0	0	0	0
Irregularidades na Superfície	0 – Normal	08 patas	06 patas	08 patas	08 patas
	1 – Leve	0	0	0	0
	2 – Moderada	0	0	0	0
	3 – Grave	0	0	0	0

Os achados radiográficos demonstraram grau de comprometimento da doença semelhante entre o grupo controle positivo e o grupo tratado com extrato de *P. nuda* comparado com o grupo tratado com a droga de referência (metotrexato). O tempo curto de experimentação pode ser uma explicação para esses resultados assim como também o número de animais utilizados no experimento. Também deve ser lembrado que existem fases diversas da doença (aguda, pós-aguda, crônica e de remissão) e algumas dessas alterações não seguem a mesma sequência de desenvolvimento vista em humanos, sendo algumas delas observadas somente em estágios mais desenvolvidos (estágios finais) ⁽⁴⁸⁾.

Estes resultados, embora não estatisticamente significativos, não nos permitem descartar a ação anti-inflamatória do extrato da *P. nuda*, havendo a possibilidade de se realizar futuramente estudos complementares envolvendo outras vias de administração, novas doses e/ou novos períodos para observação dos resultados.

5.2. Histopatologia

As alterações histológicas da articulação metatarsfalângica do 5º dedo foram analisadas comparando-se os grupos inoculados com ACF com o grupo controle negativo (Figura 7 a 10). A cartilagem articular dos animais tratados, inclusive do grupo controle, é corado de forma consistente ao longo da sua profundidade o que indica que não houve perda de proteoglicano. A arquitetura da articulação quanto a

integridade do osso e da cartilagem foi semelhante entre os grupos inoculados com ACF (Figuras 8 a 10) e o grupo controle negativo (Figura 7).

Entretanto, a membrana sinovial das articulações dos animais inoculados com ACF mostrou hiperplasia quando comparados ao grupo controle negativo (Figura 7), indicando uma provável sinovite, mais intensa no grupo controle positivo (Figura 8). O aumento da membrana sinovial de ratos com artrite induzida por adjuvante são coerente com os dados anteriormente relatados para doentes com artrite reumatoide.

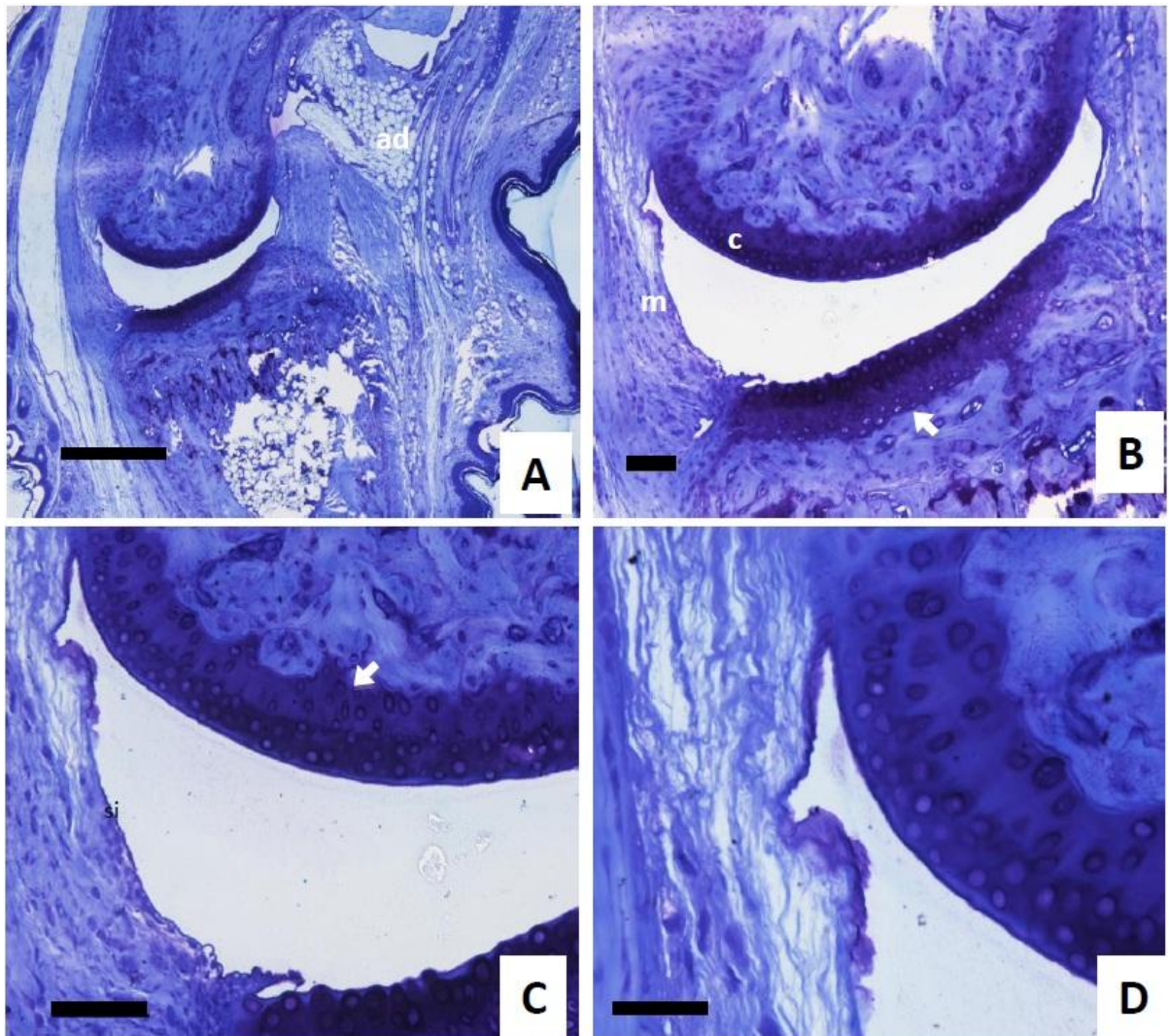


Figura 7 - Articulação metatarsofalângica com a porção distal do 5º metatarso e falange proximal da pata traseira de um animal do grupo controle negativo. (A) Aspecto panorâmico da articulação com arquitetura preservada e infiltração adiposa característica (ad). (B) Maior aumento mostrando a relação da articulação com a membrana sinovial (ms) e a uniformidade da cartilagem hialina (ch) em toda a espessura que apresenta uma boa delimitação no limite inferior, na junção com o osso sub-condral (seta). (C) Detalhe da cartilagem hialina, da junção osteo-condral (seta) e da membrana sinovial com sinoviócitos achatados dispostos em monocamada. (D) A matriz intercelular tem aspecto fibrilar e não apresenta infiltração por células inflamatórias. (A) 4X, barra = 500µm; (B) 10X, barra = 100µm; (C) 20X, barra = 100 µm; (D) 40X, barra = 50 µm. Coloração pelo azul de Toluidina modificado para inclusão em resina.

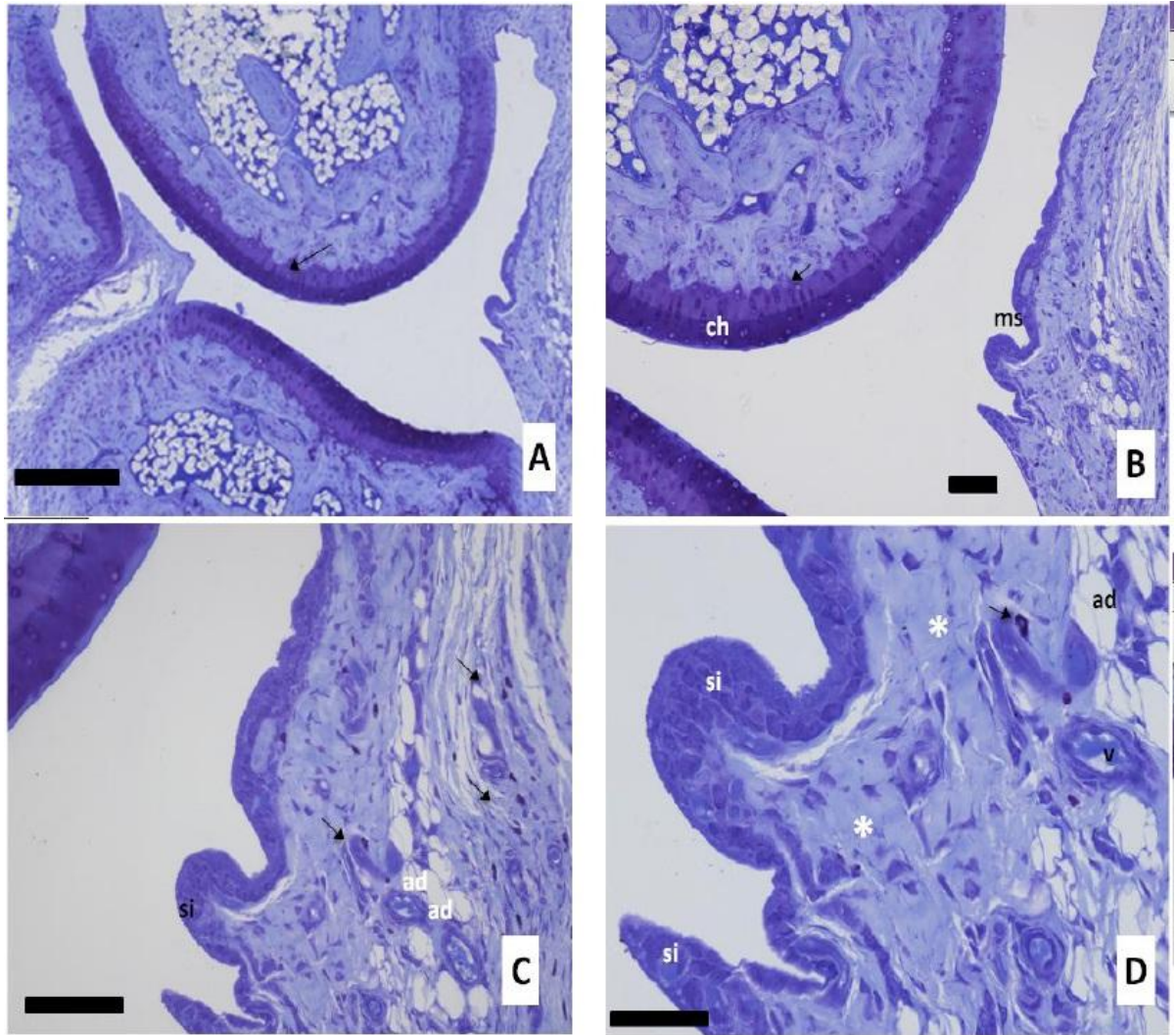


Figura 8 - Articulação metatarsofalângica com a porção distal do 5º metatarso e falange proximal da pata traseira de um animal do grupo controle positivo. (A) Aspecto panorâmico da articulação com preservação da arquitetura. A cartilagem hialina é uniforme em toda a espessura e apresenta boa afinidade tintorial, o que sugere a preservação do estoque tecidual local de proteoglicanos. O limite inferior da cartilagem, na junção com o osso sub-condral (seta) é contínuo e preciso. (B) Maior aumento da junção osteocondral e da cartilagem hialina (ch) da articulação e sua relação com a membrana sinovial. Observar área de hiperplasia da membrana sinovial (ms). (C) Membrana sinovial com sinoviócitos (si) com aspecto morfológico normal, porém mostrando um grau moderado de hiperplasia. A matriz intercelular da camada íntima tem aspecto denso, contendo vasos com parede levemente espessada e discreta infiltração adiposa (ad). Notam-se ainda células inflamatórias mononucleares (setas) distribuídas aleatoriamente na matriz intercelular e na proximidade de vasos sanguíneos. (D) Maior aumento da membrana sinovial, dos sinoviócitos (si), da matriz intercelular (*) e das células inflamatórias mononucleares presentes na matriz (seta). (A) 4X, barra = 500µm; (B) 10X, barra = 100µm; (C) 20X, barra = 100µm; (D) 40X, barra = 50µm. Coloração pelo Azul de toluidina modificado para inclusão em resina.

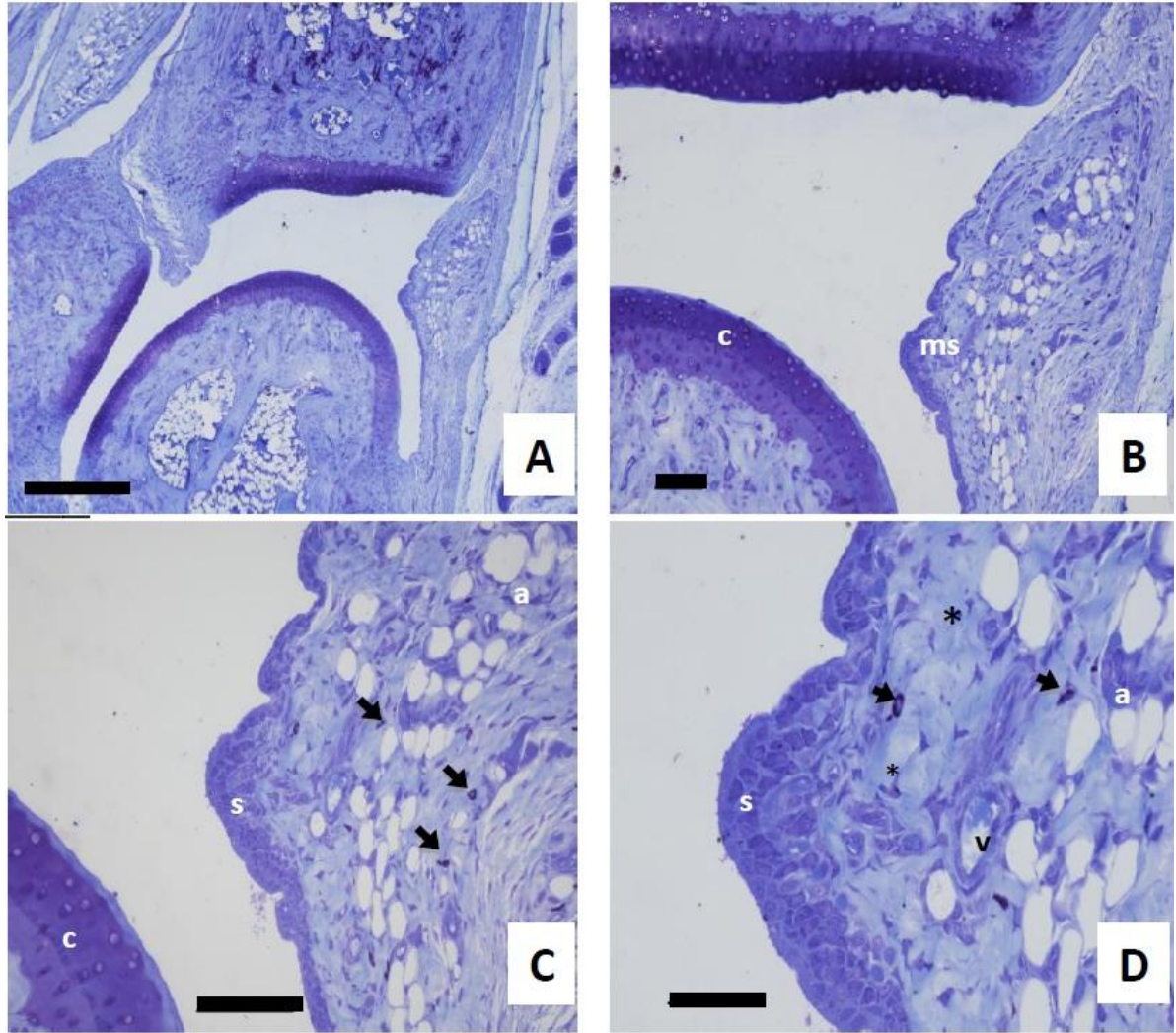


Figura 9 - Articulação metatarsofalângica com a porção distal do 5º metatarso e falange proximal da pata traseira de um animal do grupo tratado com MTX. (A) Aspecto panorâmico da articulação com arquitetura preservada exibindo revestimento da superfície articular por cartilagem hialina com aspecto morfológico preservado. (B) Maior aumento da junção osteocondral e da cartilagem hialina (ch) da articulação metatarsofalângica e sua relação com a membrana sinovial. Observar área de hiperplasia da membrana sinovial (ms). (C) Maior detalhe da área de hiperplasia identificada em (B) mostrando que a membrana sinovial é constituída por múltiplas camadas de sinoviócitos (si) e que são identificadas células inflamatórias mononucleares (setas) na matriz intercelular. Notar presença de adipócitos (ad) e cartilagem articular (ch) de aspecto habituais. (D) Sinoviócitos (si) na região de hiperplasia da membrana sinovial associada a células inflamatórias mononucleares (seta) dispersas na matriz intercelular contendo adipócitos (ad) e vasos sanguíneos (v). (A) 4X, barra = 500µm; (B) 10X , barra = 100µm; (C) 20X, barra = 100µm; (D) 40X, barra = 50µm. Coloração pelo Azul de toluidina modificado para inclusão em resina.

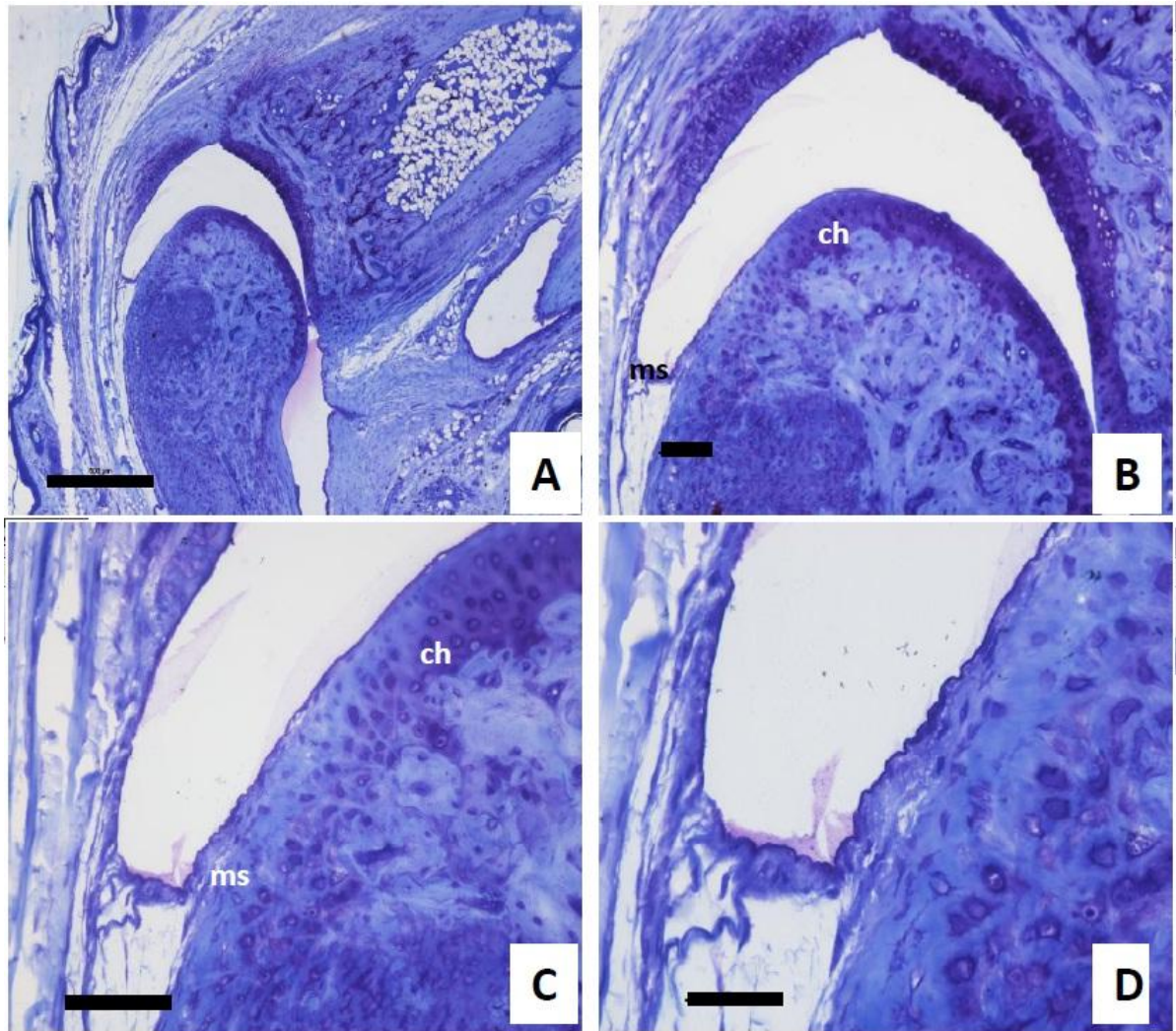


Figura 10 - Articulação metatarsofalângica com a porção distal do 5º metatarso e falange proximal da pata traseira de um animal do grupo tratado com extrato de *P. nuda*. (A) Aspecto panorâmico da articulação com arquitetura preservada exibindo revestimento da superfície articular por cartilagem hialina com aspecto morfológico preservado. (B) Maior aumento da junção osteocondral e da cartilagem hialina (ch) da articulação metatarsofalângica e sua relação com a membrana sinovial. Observar área de hiperplasia da membrana sinovial (ms). (C) Maior detalhe da área de hiperplasia identificada em (B) mostrando o que a membrana sinovial é constituída por múltiplas camadas de sinoviócitos (si) e que são identificadas células inflamatórias mononucleares (setas) na matriz intercelular. Notar presença de adipócitos (ad) e cartilagem articular (ch) de aspecto habituais. (D) Sinoviócitos (si) na região de hiperplasia da membrana sinovial associada a células inflamatórias mononucleares (seta) dispersas na matriz intercelular contendo adipócitos (ad) e vasos sanguíneos (v). (A) 4X, barra =500µm; (B) 10X , barra = 100µm; (C) 20X, barra = 100µm; (D) 40X, barra = 50µm. Coloração pelo Azul de toluidina modificado para inclusão em resina.

6. Conclusão

A diversidade vegetal brasileira tem enorme potencial para gerar produtos inovadores e proporcionar benefícios sociais e o modelo de AIA constitui um importante método para teste *in vivo* de espécies vegetais para minimizar ou reparar danos articulares causados pela artrite reumatoide.

Nos animais do grupo tratado por via oral com extrato de *Pouteria nuda* a evolução clínica foi semelhante ao grupo controle positivo. Mediante análise anatomopatológica efetuada por estudo descritivo e quantitativo, foi observada presença de sinais característicos de artrite induzida por adjuvante igualmente nos dois grupos.

Nossos resultados sugerem que o extrato metanólico de *Pouteria nuda* por via oral na dose de 150mg/kg/semana não apresentou ação imunomoduladora na Artrite Induzida por Adjuvante nas condições locais.

7. Cronograma de Atividades

Nº	Descrição	Ago 2013	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2014	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Revisão de Literatura	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
2	Treinamento da Técnica radiológica	R	R										
3	Preparação do material fixado		R	R	R								
4	Elaboração do Relatório Parcial					R	R						
5	Execução das tomadas radiográficas (réplica)					R	R	R					
6	Análise Histopatológica dos Dados						R	R	R	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

Referências (segundo Vancouver)

1. Wood AJJ, O'Dell JR. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(25):2591-602.
2. da Costa Pinto MR, Miguel RCC, Rezende GG. Tratamento da artrite reumatóide. *Rev Bras Reumatol*. 2006;46(3):219-23.
3. Billingham M. Models of arthritis and the search for anti-arthritic drugs. *Pharmacology & therapeutics*. 1983;21(3):389-428.
4. Pearson CM. Experimental joint disease:: Observations on adjuvant-induced arthritis. *Journal of chronic diseases*. 1963;16(8):863-4, IN5-IN8, 5-74.
5. Okamoto H, Yoshio T, Kaneko H, Yamanaka H. Inhibition of NF- κ B signaling by fasudil as a potential therapeutic strategy for rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2010;62(1):82-92.
6. Durai M, Huang MN, Moudgil KD. Self heat-shock protein 65-mediated regulation of autoimmune arthritis. *Journal of autoimmunity*. 2009;33(3):208-13.
7. Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005;4(3):206-20.
8. da Rosa C, Machado CA. Plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças reumáticas: revisão. *Rev Bras Farm*. 2007;88(1):26-32.
9. 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.
10. Craveiro ACS, Carvalho DMM, Nunes R, Fakhouri R, Rodrigues A, Teixeira-Silva F. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. *Rev Bras Farmacogn*. 2008;18(^ sSupl).
11. Oliveira VMA, Carneiro ALB, Cauper GSB, 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.
12. 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.
13. da Silva F, da Rocha F. Zymosan induced arthritis in rats--mechanisms involved in hypernociception and cartilage lyses]. *Acta reumatológica portuguesa*. 2006;31(2):143.
14. Rodrigues CRF, Bó S, Teixeira RM. Diagnóstico precoce da artrite reumatóide. *RBAC*. 2005;37(4):201-4.
15. Bértolo MB, Brenol CV, Schainberg CG, Neubarth F, Lima F, Laurindo IM, et al. Atualização do consenso brasileiro no diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide. *Rev Bras Reumatol*. 2007;47(3):151-9.
16. Alarcon RT, Andrade LEC. Auto-antibodies to citrullinated proteins and rheumatoid arthritis. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2007;47(3):180-7.
17. Funovits J, Aletaha D, Bykerk V, Combe B, Dougados M, Emery P, et al. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: methodological report phase I. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(9):1589-95.
18. Azevedo VF, Buiar PG. Concurrent rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis in one patient: the importance of new classification criteria. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2013;53(1):115-9.
19. Visser H. Early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2005;19(1):55-72.
20. Zhao J, Liu X, Wang Z, Liu R, Li Z. Is it necessary to combine detection of anticitrullinated protein antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis? *The Journal of rheumatology*. 2010;37(12):2462-5.
21. David JM, Mattei RA, Mauad JL, Almeida LGd, Nogueira MA, Menolli PVdS, et al. Clinical and laboratory features of patients with rheumatoid arthritis diagnosed at rheumatology services in the Brazilian municipality of Cascavel, PR, Brazil. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2013;53(1):61-5.
22. Louzada-Junior P, Souza BDB, Toledo RA, Ciconelli RM. Análise descritiva das características demográficas e clínicas de pacientes com artrite reumatoide no estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Reumatol*. 2007;47(2):84-90.
23. Abbas AK, Vinay Kumar MD, N F. ROBBINS & COTRAN-PATOLOGIA: BASES PATOLOGICAS DAS DOENÇAS: ELSEVIER (MEDICINA); 2005.
24. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews*. 2005;4(3):130-6.
25. Wood AJJ, Olsen NJ, Stein CM. New drugs for rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(21):2167-79.
26. Kremers HM, Nicola P, Crowson CS, O'Fallon WM, Gabriel SE. Therapeutic strategies in rheumatoid arthritis over a 40-year period. *The Journal of rheumatology*. 2004;31(12):2366-73.
27. Wood AJ, Olsen NJ, Stein CM. New drugs for rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(21):2167-79.

28. Venkatesha SH, Rajaiiah R, Berman BM, Moudgil KD. Immunomodulation of autoimmune arthritis by herbal CAM. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2010;2011.
29. Lipsky PE, Tao X-L, editors. A potential new treatment for rheumatoid arthritis: thunder god vine. Seminars in arthritis and rheumatism; 1997: Elsevier.
30. Exley E, Mielenz T, Brady T, Xiao C, Currey S. Use of Complementary and Alternative Medicine Among Patients With Arthritis. 2012.
31. Crawford NW, Cincotta DR, Lim A, Powell CV. A cross-sectional survey of complementary and alternative medicine use by children and adolescents attending the University Hospital of Wales. BMC complementary and alternative medicine. 2006;6(1):16.
32. Cooper EL. The immune system and complementary and alternative medicine. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM. 2007;4(Suppl 1):5.
33. Maciel MAM, Pinto AC, Veiga V, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Química Nova. 2002;25(3):429-38.
34. Hernandez C, Villaseñor I, Joseph E, Tolliday N, Buerano CC, Lago CB, et al. Isolation and evaluation of antimutagenic activity of phenolic compounds from *Pouteria campechiana* Baehni. Philip J Sci. 2008;137.
35. Montenegro LHM OP, Conserva LM, Rocham EMM, Brito AC, Araújo RM, Trevisan MTS, Lemos RPL. Triterpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinérgico de *Pouteria venosa* L (Sapotaceae). Rev Bras Farmacogn. 2006;611-7.
36. Hegen M, Keith Jr JC, Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. Annals of the rheumatic diseases. 2008;67(11):1505-15.
37. Van den Berg WB. Lessons from animal models of arthritis over the past decade. Arthritis Res Ther. 2009;11(5):250.
38. Pearson CM, editor. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. 1956: Royal Society of Medicine.
39. Whitehouse M. Adjuvant arthritis 50 years on: The impact of the 1956 article by CM Pearson, 'Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants'. Inflammation Research. 2007;56(4):133-8.
40. Bevaart L, Vervoordeltonk MJ, Tak PP. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? Arthritis & Rheumatism. 2010;62(8):2192-205.
41. 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.
42. Nunes MV, Câmara C, Crespo AMC, Carvalhaes M, Oliveira CR, Silveira LA. COMPARAÇÃO DO PERFIL DE ANTICORPOS ANTI-IMUNOGLOBULINA G EM MURINOS IMUNIZADOS COM IgG HUMANA ASSOCIADA A DIFERENTES ADJUVANTES. Revista Eletrônica de Farmácia. 2009;6(1).
43. Van Eden W, Wagenaar-Hilbers JPA, Wauben MHM. Adjuvant Arthritis in the Rat. Current Protocols in Immunology: John Wiley & Sons, Inc.; 2001.
44. Talwar S, Nandakumar K, Nayak PG, Bansal P, Mudgal J, Mor V, et al. Anti-inflammatory activity of *Terminalia paniculata* bark extract against acute and chronic inflammation in rats. Journal of Ethnopharmacology. 2011;134(2):323-8.
45. Esser RE, Hildebrand AR, Angelo RA, Watts LM, Murphey MD, Baugh LE. Measurement of radiographic changes in adjuvant-induced arthritis in rats by quantitative image analysis. Arthritis & Rheumatism. 1995;38(1):129-38.
46. Jacobson PB, Morgan SJ, Wilcox DM, Nguyen P, Ratajczak CA, Carlson RP, et al. A new spin on an old model: in vivo evaluation of disease progression by magnetic resonance imaging with respect to standard inflammatory parameters and histopathology in the adjuvant arthritic rat. Arthritis & Rheumatism. 1999;42(10):2060-73.
47. 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.
48. Ekambaram S, Perumal SS, Subramanian V. Evaluation of antiarthritic activity of *Strychnos potatorum* Linn seeds in Freund's adjuvant induced arthritic rat model. BMC complementary and alternative medicine. 2010;10(1):56.
49. Pearson CM, editor. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY); 1956: Royal Society of Medicine.
50. Feige U, Hu Y-L, Gasser J, Campagnuolo G, Munyai L, Bolon B. Anti-interleukin-1 and anti-tumor necrosis factor- α synergistically inhibit adjuvant arthritis in Lewis rats. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. 2000;57(10):1457-70.
51. A; DF, JE; R, I FeS. Radiologia odontológica. 6ª ed: Artes Médicas; 2004.
52. LC; A, Tavano O. Curso de radiologia em odontologia. 4ª ed: Livraria Santo Editora; 2002.
53. Nascimento VF. Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) e por reflexão total (TXRF). Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 1999.
54. Morgan SL, Baggott JE, Bernreuter WK, Gay RE, Arani R, Alarcón GS. MTX affects inflammation and tissue destruction differently in the rat AA model. The Journal of rheumatology. 2001;28(7):1476-81.

55. Zhu L, Wei W, Zheng YQ, XY J. Effects and mechanisms of total glucosides of paeony on joint damage in rat collagen-induced arthritis. *Inflammation Research*. 2005;54(5):211-20.
56. Joe B, Wilder RL. Animal models of rheumatoid arthritis. *Molecular medicine today*. 1999;5(8):367.
57. 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.
58. 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.
59. Oliveira PG. Efeito da administração do antagonista do receptor da bombesina/peptídeo liberador da gastrina RC-3095 na artrite induzida por CFA em ratos wistar. 2008.
60. Waynforth HB, Flecknell PA. *Experimental and surgical technique in the rat*: Academic Press London; 1980.
61. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003;423(6937):356-61.
62. Scutellari PN, Orzincolo C. Rheumatoid arthritis: sequences. *European journal of radiology*. 1998;27:S31-S8.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado de aprovação no comitê de ética em experimentação animal (CEEA/UFAM)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM)



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 001/2010-CEEA, sobre “Efeito do Extrato de *Pouteria nuda* sobre artrite reumatóide” sob responsabilidade de **SILVANA DA CONCEIÇÃO FURTADO** e **CLÁUDIA HELENA PELIZZON**, está de acordo com a legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM) em reunião de **07/05/2010**.

Manaus, 12 de maio de 2010

Prof. Dr. Fábio Tonissi Moroni
Presidente do CEEA-UFAM



**CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS
EM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE: UMA REVISÃO DA AÇÃO
IMUNOMODULADORA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS¹**

Merini, L. R.²; Furtado, S. C.²; Guimarães, M. R.³; Galvão, J. R.⁴; Barcellos, J. F. M.⁵

Resumo

As citocinas dividem-se em três famílias: as Interleucinas (IL), os Interferons (INF) e Fatores de Necrose Tumoral (TNF). As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α estão presentes em níveis elevados nas articulações artríticas tanto em humanos como em animais e desempenham papel fundamental nos processos inflamatórios. O efeito antiartrítico de substâncias bioativas, de origem vegetal ou sintética, tem sido testado em modelos animais de artrite induzida e a expressão de mediadores pró-inflamatórios constitui o método mais utilizado para demonstrar o valor terapêutico dessas substâncias sobre Artrite Induzida por Adjuvante (AIA). Esta revisão de literatura tem como objetivo relacionar essas substâncias testadas, analisar e discutir o método utilizado para confirmação da atividade antiartrítica pelos níveis de citocinas pró-inflamatórias. As citocinas IL-1 β e TNF α desempenham papéis dominantes na mediação da progressão de muitas doenças inflamatórias articulares e são primordiais para o aparecimento dos sinais secundários da artrite em modelos de AIA. Estudos comprovam que citocinas anti-inflamatórias inibem a resposta pró-inflamatória e apresentam resultados positivos no tratamento da Artrite Reumatoide. Demonstrar supressão de citocinas pró-inflamatórias em AIA, por substâncias bioativas, é uma preocupação da comunidade científica a fim de desenvolver novos fármacos com máximo de eficiência e baixa toxicidade.

Palavras-Chave: Citocinas, bioativos, Artrite Reumatoide.

Abstract

Cytokines are divided into three families: the Interleukin (IL), the interferons (INF) and Tumor Necrosis Factor (TNF). The proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α are present at high levels in arthritic joints in humans and in animals, and play a fundamental role in inflammatory processes. The anti-arthritic effect of bioactive substances, vegetable or from synthetic origin, has been tested in models of adjuvant-induced arthritis and the expression of pro-inflammatory mediators is the preferred method to demonstrate the therapeutic value of adjuvant-induced arthritis (AIA). This review aims to relate these tested substances, analyze and discuss the method used to confirm the anti-arthritic activity through rates of proinflammatory cytokines. The IL-1 β and TNF play dominant roles in mediating the progression of many inflammatory joint diseases and are essential for the appearance of secondary signs of arthritic models in AIA. Studies show that anti-inflammatory cytokines inhibit the proinflammatory response and show positive results in the treatment of rheumatoid arthritis. In AIA an intraperitoneal and oral administration are preferred for testing with bioactive substances. The tested substances had concentrations ranging from 1 to 1000 mg / kg for oral administration, and 0.5 to 10 mg/kg intraperitoneally, and doses greater than 500mg/kg were also identified. Values for intramuscular and subcutaneous doses were found ranging between 0.04 and 0.9 mg / kg. To demonstrate suppression of proinflammatory cytokines in AIA is a concern of the scientific community to develop new drugs with maximum efficiency and low toxicity.

Key-words: Cytokines, bioactives substances, rheumatoid arthritis.

¹ Parte da dissertação de Mestrado da primeira autora, no Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

² Docente UFAM, Instituto de Saúde e Biotecnologia do Médio Solimões, Coari, Amazonas

³ Docente UFAM, Laboratório Anatomia, Manaus, Amazonas, Doutoranda Bases Gerais da Cirurgia – UNESP – Botucatu -SP

⁴ Mestranda Pós Graduação Imunologia Básica e Aplicada, Manaus, Amazonas

⁵ Graduando em Medicina, UFAM, Manaus, Amazonas

⁵ Docente UFAM, Laboratório de Histologia. Orientador no Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – UFAM. Av. Gal. Rodrigo Otávio 3000, Coroado II, Manaus, Amazonas.



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.journals.elsevier.com/cytokine



Attenuation of adjuvant-induced arthritis in rats by phonophoresis with an aqueous gel of the Amazonian plant *Elaeoluma nuda* (Sapotaceae)



Lilian Regiani Merini^{a,e,f}, Silvânia da Conceição Furtado^{b,e}, Marcelo Miguel Brito de Oliveira^c, Ana Lúcia Basílio Carneiro^d, Antonio Luiz Boechat^{a,e,*}, José Fernando Marques Barcellos^{a,b}

^a Postgraduate Program in Basic and Applied Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Amazonas, Brazil

^b Morphology Department, Institute of Biological Sciences, Federal University of Amazonas, Brazil

^c Undergraduate Science Project, Morphology Department, Institute of Biological Sciences, Federal University of Amazonas, Brazil

^d Morphology Department, Center for Health Sciences, Federal University of Pará, Brazil

^e Amazonian Group for the Study of Inflammation and Autoimmunity (GAIA), Brazil

^f Médio Solimões Institute of Health and Biotechnology, Coari Campus, Federal University of Amazonas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 February 2013

Received in revised form 21 October 2013

Accepted 28 October 2013

Available online 23 November 2013

Keywords:

Elaeoluma nuda

Phonophoresis

Adjuvant-induced arthritis

ABSTRACT

Background: Various species of the genus *Pouteria* (*Elaeoluma*) are used by the native population of Brazil because of, among other factors, their anti-inflammatory properties. The anti-inflammatory properties of the extract of the Amazonian plant *Elaeoluma nuda* were recently identified in prospective pharmacological studies.

Objectives: The objective of this study was to assess the anti-inflammatory effect of phonophoresis with aqueous gel extract of *E. nuda* in rat adjuvant-induced arthritis.

Methodology: Arthritis was induced in Lewis rats with an adjuvant. Phonophoresis with *E. nuda* gel was then administered daily and the results compared with those obtained with phonophoresis of didofenac diethylammonium gel and ultrasound therapy without phonophoresis. Arthritis in the different groups was evaluated by plethysmometry. Proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 α were quantified by cytometric bead array (CBA).

Results: The effect of phonophoresis of aqueous gel with *E. nuda* extract on arthritis in rats' paws (a 33% reduction compared with the controls) was the same as that produced by phonophoresis with didofenac diethylammonium. Ultrasound therapy without phonophoresis produced no significant effect on the 21st day of therapy. There was a significant reduction in TNF- α and IL-1 α levels in the group treated with phonophoresis with *E. nuda* gel ($p = 0.0042$; $p = 0.0003$, respectively).

Conclusion: Our results demonstrate the anti-inflammatory effect of phonophoresis with *E. nuda* gel on cytokines TNF- α , IL-1 α and adjuvant-induced arthritis.

ANEXO D – Trabalhos apresentados pela equipe envolvida

VI REUNIÃO REGIONAL 2011  FeSBE

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

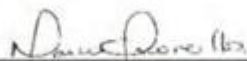
Para verificar a autenticidade deste certificado, acesse www.fesbe.org.br/certificados

agraciadas



IV Workshop Sobre o Desenvolvimento Tecnológico de Medicamentos Fitoterápicos

Certifico que o trabalho 'AÇÃO DO EXTRATO DE *Pouteria nuda* SOBRE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE EM RATOS LEWIS', autoria de S. Furtado, L.R. Merini, M.M.B. Oliveira, A.A. de Lima, J.F.M. Barcellos, A.L.B. Carneiro, C.H. Pellizzon foi apresentado no IV Workshop Sobre o Desenvolvimento Tecnológico de Medicamentos Fitoterápicos realizado de 21 a 23 de novembro de 2012 no Blue Tree Premium Hotel.



Profª. Drª. Marne Carvalho de Vasconcellos
Presidenta da Comissão Científica



Profª. Drª. Tatiane Pereira de Souza
Presidenta da Comissão Organizadora

Realização



Patrocínio



ANEXO E – Participação em congresso



Prezado (a) Dr. (a), Barcellos, JFM

Informamos que os posters poderão estar expostos todos os dias do Congresso (21 a 23 de novembro), porém, pelo menos um dos autores do trabalho: **ATENUAÇÃO DA ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE EM RATOS PELA FONOFRESE COM GEL AQUOSO DE Pouteria nuda** deve estar no dia 21 de novembro de 2013, durante a Sessão Poster, das 12h00 às 12h30.

As placas estarão identificadas com os números de cada pôster, conforme abaixo:

Título: ATENUAÇÃO DA ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE EM RATOS PELA FONOFRESE COM GEL AQUOSO DE Pouteria nuda

Número/código do pôster: P-11