



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



**AÇÃO DO GEL DE *Elaeoluma nuda* APLICADO PELA
FONOFORESE EM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE EM
RATOS LEWIS**

LILIAN REGIANI MERINI MACHADO

Orientador: Professor Doutor José Fernando Marques Barcellos
Co-Orientador: Professor Doutor Antonio Luiz Ribeiro Boechat Lopes.

Manaus-AM

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



LILIAN REGIANI MERINI MACHADO

**AÇÃO DO GEL DE *Elaeoluma nuda* APLICADO PELA
FONOFORESE EM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE EM
RATOS LEWIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção de título de Mestre.

Orientador: Professor Doutor José Fernando Marques Barcellos

Co-Orientador: Professor Doutor Antonio Luiz Ribeiro Boechat Lopes

Manaus-AM

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

LILIAN REGIANI MERINI MACHADO

**AÇÃO DO GEL DE *Elaeoluma nuda* APLICADO PELA
FONOFORESE EM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE EM
RATOS LEWIS**

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa de Mestrado em sessão pública realizada em...../...../.....

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Professor Doutor José Fernando Marques Barcellos

Instituição: Universidade Federal do Amazonas

Assinatura:

Examinador 2: Doutora. Maria Eugenia Leite Duarte

Assinatura:

Examinadora 3: Doutor Oscar Tadeu Ferreira da Costa

Assinatura:

Dedico aos meus pais Antonio Merini e Idalina
Maçaneiro Merini, exemplos de dedicação
e amor incondicional. Aos meus filhos
Victor, Enzo e Maria Clara razão de minha
existência e ao Amor da minha vida
Machado meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela sua infinita misericórdia e bondade sem fim, a *ELE* toda Honra e Glória;

Aos meus pais Antonio Merini e Idalina Maçaneiro Merini, pelo seu amor incondicional e que não mediram esforços em estar comigo nessa conquista;

Aos meus filhos: Victor, Enzo e Maria Clara, vocês tornaram-me uma pessoa melhor e fizeram-me renascer a cada dia. Amo vocês meus tesouros;

Ao meu AMOR Machado que pacientemente soube me entender e me apoiar em todas as decisões;

A minha querida Irmã Nara (Zá) que na hora certa me trouxe para essa terra e esteve sempre comigo;

A minha querida amiga Sylvania que foi fundamental na conquista desse Título, e pra você cito essa frase; Há pessoas que nos falam e nem as escutamos, há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam, mas há pessoas que simplesmente aparecem em nossas vidas e nos marcam para sempre (*Cecilia Meireles*);

Ao meu Orientador Professor Doutor Jose Fernando Marques Barcellos pelos seus ensinamentos e puxões de orelha que me foram de grande valia, embora muito dolorido, mas importante para meu crescimento profissional;

Ao meu Co-orientador Professor Doutor Antonio Luis Boechat pelo estímulo nas horas de desespero e ensinamentos valiosos que servirão de guia para minha nova caminhada;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas que sabiamente mostraram um novo caminho para minha vida profissional, e em especial agradeço à Professora Doutora Maria Cristina Santos;

AO HEMOAM na pessoa da Doutora Adriana Malheiro pelo processamento do material hematológico desta pesquisa.

A Professora Doutora Ana Lucia Basílio Carneiro por ter cedido o extrato de *E.nuda* e contribuído com valiosas orientações na redação do artigo;

A Professora Sylvania da Conceição Furtado que não mediu esforços para me ajudar, sempre com paciência e muita dedicação;

A equipe, do Projeto carinhosamente chamado de PPN, Andrei Amorim, Marcelo Miguel Brito, Andressa Amorim, e Raika Guimarães;

A Professora Doutora Ana Cristina do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonas (INPA) pelo apoio na confecção do gel *Elaeoluma nuda* ;

Aos Fisioterapeutas Professor Elder Nascimento (Universidade Federal do Amazonas - UFAM) Professor Willian Rafael Malezan (Universidade do Estado do Amazonas - UEA), pelo apoio Técnico.

Aos funcionários da UFAM, em especial as técnicas do Laboratório de Histologia Rose Campo e Maiza da Conceição;

Aos mestrandos do Programa de Imunologia Básica e Aplicada e em especial a turma 2009/02 e aos mestrandos Alysson Guimarães e Andréia Tarragô e ao MSc. João Paulo Pimentel pela ajuda nos procedimentos de citometria;

Ao CNPq pelo apoio financeiro para a realização do estudo;

Ao Biotério da UFAM, na pessoa do Diretor Doutor Fábio Moroni pelo auxílio prestado.

Ao Instituto de Saúde e Biotecnologia do Médio Solimões da Universidade Federal do Amazonas - UFAM;

E a todos que direta e indiretamente trabalharam para que este trabalho deixasse de ser um sonho e se tornasse uma realidade.

**Deus é mais forte que a
minha fraqueza.
Deus é mais amor do
que minhas mágoas.**

**Deus é mais Coragem
que meus medos.
Se vacila o meu passo,
Ele é mais que meu
cansaço.**

Nelsinho Correia
(Canção Nova).

RESUMO

A Fisioterapia usa a fonoforese para tratar inúmeras doenças que afetam o organismo objetivando aliviar sintomas álgicos e melhorar capacidade funcional. Muitas espécies nativas da Amazônia são estudadas para aplicação tópica na saúde humana. Algumas espécies demonstram ação antireumática, antibacteriana e antifúngica. Considerando o potencial biológico da *Elaeoluma nuda* em pesquisas *in vitro*, este estudo objetivou avaliar a ação do gel preparado à base de extrato de *Elaeoluma nuda* pela fonoforese sobre Artrite Induzida por Adjuvante em ratos Lewis. Foram utilizados animais, divididos em: Grupo I: controle negativo – sem indução e sem tratamento (n=6), Grupo II: controle positivo – com indução e sem tratamento (n=6). Grupo III: com indução e expostos ao tratamento com UST com gel condutor (n=6), Grupo IV: com indução e exposto ao tratamento pela fonoforese com gel de *Elaeoluma nuda* (n=6) Grupo V: com indução e expostos ao tratamento pela fonoforese com gel de diclofenaco (n=6). O efeito antiedematogênico e anti-inflamatório nos grupos foram analisados por pletismometria e citometria de fluxo. O efeito da fonoforese com gel aquoso de *E. nuda* sobre a artrite da pata de ratos, foi equivalente à fonoforese com gel de diclofenaco dietilomônio quando comparados ao controle positivo ($p=0.002$), com redução da artrite em 33%. O ultrassom terapêutico sem fonoforese não mostrou efeito significativo até o 21º. dia de experimento com atenuação de artrite de apenas 2%. Houve redução significativa dos níveis de TNF- α e IL1- β com $p=0.0398$ e $p=0.0278$, respectivamente, para grupo tratado com fonoforese e gel de *E. nuda*. O perfil da assinatura de altos produtores de citocinas tratados com gel de *E. nuda* foi semelhante ao controle negativo enquanto o grupo tratado apenas com UST apresentou perfil semelhante ao controle positivo. Os resultados demonstram o efeito anti-inflamatório da fonoforese com gel de *E. nuda* sobre a artrite induzida por adjuvante.

Palavras-chave: fonoforese, ultrassom terapêutico, *Elaeoluma nuda*, antiedematogênico, anti-inflamatório.

ABSTRACT

Physiotherapy uses phonophoresis to treat many diseases that affect the body and aims to relieve pain symptoms and improve functional capacity. Many native species from the Amazon are studied for topical application to human health. Some species show antirheumatic, antibacterial and antifungal actions. Considering the biological potential of *Elaeoluma nuda* in in vitro studies, this study evaluated the effect of the gel prepared with the extract of *Elaeoluma nuda* by phonophoresis on Adjuvant-Induced Arthritis in Lewis rats. The animals used herein were divided into: Group I: negative control - no induction and no treatment (n = 6), group II: positive control - with induction and without treatment (n = 6). Group III: induction and exposed to the therapeutic ultrasound treatment with conductive gel (n = 6) Group IV: induction and exposed to treatment by phonophoresis and gel of *Elaeoluma nuda* (n = 6) Group V: induction and exposed to the treatment by phonophoresis gel of diclofenac (n = 6). The antiedematogenic and anti-inflammatory effect were analyzed by pletismometria and flow cytometry. The effect of the aqueous gel of *Elaeoluma nuda* by phonophoresis on arthritis of the hind paw of rats was equivalent to diclofenac gel phonophoresis dietilomônio compared to positive control (p = 0.002), with reduction of arthritis in 33%. The therapeutic ultrasound without phonophoresis showed no significant effect until the 21st day of the experiment with only 2% attenuation of the arthritis. There were significant decreased levels of TNF- α and IL1- β (p = 0.0398 and p = 0.0278, respectively) for the group treated by phonophoresis with gel of *E. nuda*. The profile of the signature of high cytokines producers treated by gel of *E. nuda* was similar to as the negative control group while the group treated with therapeutic ultrasound showed a similar profile to the positive control. The results demonstrate the anti-inflammatory effects of the gel of *E. nuda* by phonophoresis on arthritis adjuvant-induced.

Keywords: phonophoresis, therapeutic ultrasound, *Elaeoluma nuda*, antiedematogenic, anti-inflammatory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Formação da cavitação: bolhas gasosas que se comprimem e expandem no interior dos tecidos em razão da pressão induzida pelo UST sendo gerado pelo efeito atérmico	17
Figura 2 - Exsicata e ficha de <i>Elaeoluma nuda</i> (E.nuda), Registro n° 179316 do Herbário do INPA	22
Figura 3 - Amostra de Gel de E. nuda a 2%	29
Figura 4 - Patas traseiras (sem indução e sem tratamento)	29
Figura 5 - Aplicação do Adjuvante Completo de Freund (ACF) na base da cauda dos animais com auxílio de um contensor para ratos	30
Figura 6 - Patas traseiras (com indução sem tratamento)	30
Figura 7 - (A) Aparelho UST Bioset® modelo Sonocel Expert 1,0MHz; (B), detalhe do cabeçote reduzido (ERA 0,8 cm ²)	31
Figura 8 - Tratamento por Fonoforese com gel de <i>Elaeoluma nuda</i> na região plantar com cabeçote reduzido (ERA 0,8 cm ²)	31
Figura 9 - Pletismômetro Insight® modelo EFF-304. Equipamento utilizado para obtenção do volume das patas traseiras dos ratos.....	32
Gráfico 1 - Cinética de Artrite para os diferentes Grupos de Experimento. Os resultados são expressos como volume médio das patas (mL) e erro padrão (SEM).....	34
Gráfico 2 - Pletismometria para os diferentes Grupos no 21º dia de experimento. Os resultados são expressos como volume médio das patas (mL) e erro padrão (SEM).....	35
Gráfico 3 - Percentual de inibição de edema em relação ao controle positivo no 21º dia de experimento.....	35
Gráfico 4 - Quantificação de Citocinas TNF- α e IL1 α	36
Gráfico 5 - Assinatura Individual de Citocinas para Altos Produtores.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros do Ultrassom Terapêutico	18
Tabela 2 - Pletismometria das patas no 21º dia de experimento em ratos Lewis com artrite induzida	34
Tabela 3 - Quantificação das citocinas TNF α e IL-1 α no 21º dia de experimento	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACF - Adjuvante Completo de Freund
AIA - Artrite Induzida por Adjuvante
AIC - Artrite Induzida por Colágeno
AR - Artrite Reumatoide
CCP - Peptídeo Cíclico Citrulinado
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
EBV - Vírus Epstein Barr
ERA - Área de Radiação Efetiva
EULAR - Liga Européia de Combate ao Reumatismo
FR - Fator Reumatoide
GAIA - Grupo Amazônico para Investigação de Autoimunidade
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
HEMOAM - Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HLA - Complexo Principal de Histocompatibilidade
IL – Interleucina
INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
MHz - Megahertz
OMS - Organização Mundial de Saúde
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)
PNMNPC - Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares
SUS - Sistema Único de Saúde
TNF - Fator de Necrose Tumoral
UFAM - Universidade Federal do Amazonas
US – Ultrassom
UST - Ultrassom Terapêutico
VHS - Velocidade de Hemossedimentação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. ULTRASSOM TERAPÊUTICO (UST)	15
2.1.1. EFEITOS FÍSICOS	16
2.1.2. MODO DE PROPAGAÇÃO	17
2.1.3. PARÂMETRO DE TRATAMENTO	17
2.2. FONOFORESE	19
2.2. FITOTERAPIA	20
2.2.1. INDÍCIOS ETNOFARMACOLÓGICOS DA <i>ELAEOLUMA NUDA</i>	21
2.3. MODELOS EXPERIMENTAIS DE ARTRITE (<i>IN VIVO</i>)	23
2.4. ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE (AIA)	23
2.5. ARTRITE REUMATOIDE (AR)	24
3. OBJETIVOS	27
3.1. OBJETIVO GERAL	27
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. METODOLOGIA	28
4.1. ANIMAIS	28
4.2. EXTRATO	28
4.3. INDUÇÃO DA ARTRITE	29
4.4. TRATAMENTO COM UST	30
4.5. AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA	32
4.6. AVALIAÇÃO DO PERFIL DAS CITOCINAS	32
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5. RESULTADOS	34
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÕES	40
8. REFERÊNCIAS	41
9. ANEXOS	46

1. INTRODUÇÃO

O crescente interesse comercial de produtos transdérmicos, e o estudo sobre as características de permeabilidade da pele têm estimulado uma grande quantidade de pesquisas visando melhorar a ação local de medicamentos. Os métodos para aumentar a penetração podem ser divididos em duas categorias principais: física e química. Entre os métodos físicos, a fonoforese atraiu nos últimos anos a atenção de diversos investigadores. A fisioterapia tem utilizado o UST associado à fonoforese para tratamento de inúmeras doenças inflamatórias (KITCHEN; RIBEIRO, 2003).

Considerando o potencial biológico da *Elaeoluma nuda* (*E. nuda*) em pesquisas *in vitro* e a ausência de experimentos *in vivo* desta espécie de planta, este estudo foi realizado com objetivo de avaliar um possível anti-inflamatório do gel preparado à base de extratos de *E.nuda* sobre Artrite Induzida por Adjuvante (AIA). Para tal, utilizamos um modelo experimental de Artrite Reumatoide (AR) através da indução de uma reação inflamatória crônica na articulação de ratos por injeção intradérmica de uma suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* em parafina líquida (Adjuvante Completo de Freund - ACF) (DURAI; HUANG; MOUDGIL, 2009). Uma vez comprovada sua eficácia, poderemos propor uma nova terapêutica usando um gel produzido a partir de uma planta da biodiversidade Amazônica.

Muitas espécies vegetais da América do Sul, sobretudo da Amazônia são estudadas com boas perspectivas para aplicação na saúde humana. Algumas espécies têm ação anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica (CARNEIRO et al., 2008) e hemolítica (OLIVEIRA et al., 2009).

O grupo de pesquisa em Morfologia e Patologia Celular da UFAM aprovou no Comitê de ética em Experimentação Animal projetos utilizando o modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund sob os protocolos 01/2010, 015/2010 e 014/2010 CEEA - UFAM e no Programa de Iniciação Científica PIB-B/004/2010, PIB-S/0083/2010, PIB-B/033/2011, PIB-S/064/2011 e PIB-S/0149/2012 (Anexos) para verificação da ação anti-inflamatória do extrato aquoso de *E.nuda* em ratos Lewis. O GAIA (Grupo Amazônico para Investigação de Autoimunidade) vinculado ao diretório de pesquisas do CNPq, também vem trabalhando no sentido de determinar as condições locais de experimentação de vários modelos de artrite, enquanto o grupo

de pesquisa em Bioprospecção de Produtos Naturais da Amazônia vem propiciando o estudo prospectivo e investigativo de espécies vegetais do Bioma Amazônico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ultrassom Terapêutico (UST)

Na prática clínica de fisioterapia, observa-se o crescente uso de recursos eletrotermofototerápicos como o UST, sendo uma ferramenta importante na reabilitação de inúmeras doenças (BIANCHETTI et al., 2009). Este tratamento reduz os sinais inflamatórios como dor e edema, além de atuar na regeneração tecidual e normalização do tônus muscular (CIENA et al., 2009) (GUIRRO; GUIRRO, 2002).

As vibrações mecânicas que são essencialmente as mesmas das ondas sonoras, porém, com frequência mais alta. Recomendam-se, o uso de frequências de pouco Megahertz (MHz), entre 0,5 e 5 MHz (LOW; REED, 2001).

O UST apresenta inúmeros efeitos biológicos no organismo resultantes de uma resposta fisiológica às ações mecânicas e térmicas. Entre esses efeitos estão a micromassagem, aumento do fluxo sanguíneo, relaxamento muscular, aumento da permeabilidade das membranas celulares, aumento da capacidade regenerativa dos tecidos e efeito sobre os nervos periféricos (LOW; REED, 2001), (BARNES, 2009).

Desde sua descoberta por Langevin em 1917, o Ultrassom (US) foi inicialmente produzido através de um cristal de quartzo vibrante. Atualmente, são utilizados cristais cerâmicos sintéticos com propriedades piezoelétricas. As vibrações são produzidas a partir da contração do cristal sob a influência de uma corrente elétrica em uma determinada direção e de sua expansão quando a corrente elétrica é invertida. O cristal retorna a sua forma original, assim que a corrente é desligada (BIANCHETTI et al., 2009; GUIRRO; GUIRRO, 2002).

O ultrassom é frequentemente usado por especialistas em reabilitação como uma terapia adjuvante no tratamento sintomático da AR. Sua energia mecânica tem ação anti-inflamatória, bem como propriedades analgésicas (CASIMIRO et al., 2002).

Ao longo do tempo o interesse em estudar esse recurso aumentou em humanos e também em modelos experimentais em diversas condições clínicas tais como artrite reumatoide, regeneração muscular, enxertos de pele e cialgia (CIENA et al., 2009).

O UST possui a capacidade de alterar as células envolvidas na inflamação, na produção de fatores de crescimento por macrófagos, estimular a angiogênese,

favorecer a proliferação de células T e proteínas associadas à inflamação (IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8) usando uma frequência de 1 ou 3 MHz e intensidades variando de 01 a 1.5W/cm²(JOHNS, 2002).

Chung; Barua; Choi (2012) ao realizarem estudo com ratos utilizando ACF observou-se efeito anti-inflamatório potente do UST, com redução das células inflamatórias na membrana sinovial, podendo ser usado como tratamento alternativo. No entanto, o efeito condroprotetor não foi determinado pela regeneração ativa da cartilagem, mas pela estimulação imune e vascular que ocorre na modulação do processo inflamatório.

2.1.1. Efeitos Físicos

O UST pode induzir respostas clínicas significativas em células, tecidos e órgãos por meio de efeitos térmicos e atérmicos (LOW; REED, 2001).

Quando se aplica um feixe de ultrassom em pulso há o predomínio dos efeitos não térmicos (mecânicos), aumento da permeabilidade da membrana celular, aumento do fluxo sanguíneo, redução do edema e estimulação da fagocitose (STARKEY; FRAGOSO, 2001).

A cavitação definida pela formação de bolhas de gás que comprimem e expandem no interior dos tecidos, é um fenômeno gerado pelo efeito atérmico secundário às mudanças de pressão induzidas pelo UST (STARKEY; FRAGOSO, 2001). As bolhas crescem durante cada ciclo acústico, podendo, ao atingir um determinado tamanho, entrar em ressonância o que resultará em microvibrações. Sendo, portanto a cavitação responsável pelo aumento da permeabilidade da pele, facilitando a fonoforese (MITRAGOTRI; KOST, 2004). Observemos a figura 1:

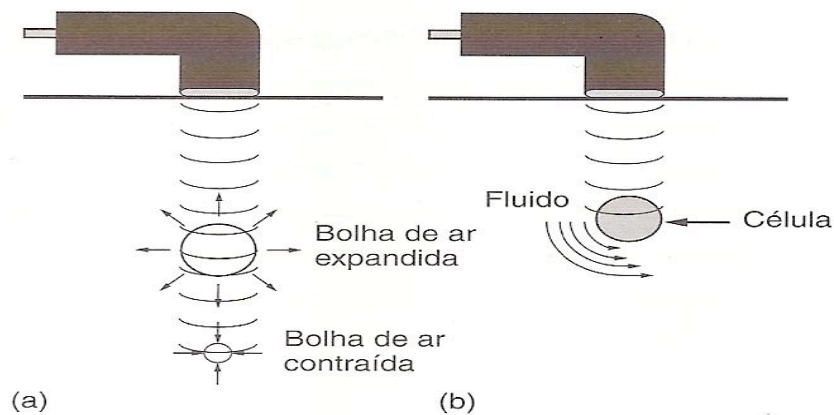


Figura 1 – Formação da cavitação: bolhas gasosas que se comprimem e expandem no interior dos tecidos em razão da pressão induzida pelo UST sendo gerado pelo efeito atérmico (STARKEY; FRAGOSO, 2001).

O UST pode se propagar de modo contínuo ou pulsado sendo que a diferença entre os dois está na interrupção da energia. No modo pulsado o circuito do aparelho faz chaveamento (liga/desliga) da corrente elétrica, onde a energia é liberada em pacotes (pulsos), prevalecendo o efeito atérmico ou mecânico (LOW; REED, 2001).

Estudos com ratos utilizando ultrassom terapêutico no modo pulsado através de fonoforese com hidrocortisona a 10% constatou-se eficácia superior comparado ao uso tópico (KOEKE et al., 2005).

2.1.3. Parâmetro de tratamento

Segundo (STARKEY; FRAGOSO, 2001) para a realização do tratamento com UST deve ser levar em conta vários parâmetros, como: a técnica de tratamento, a frequência, a intensidade e o tempo de aplicação do US. A descrição desses parâmetros está resumida na tabela 1.

Tabela 1
Parâmetros do Ultrassom Terapêutico

Parâmetros	Descrição
Ciclo de funcionamento	Um ciclo de funcionamento de 100% indica uma saída constante de ultrassom e provoca efeitos térmicos. Um ciclo baixo produz efeitos não-térmicos.
Área de radiação efetiva (ERA)	Área de uma fonte sonora que produz ondas ultrassônicas. Expressa em cm ²
Frequência	Determina a profundidade efetiva de penetração: a 1MHz atinge tecidos até 5cm de profundidade e saída de 3MHz penetra até 2 cm de profundidade.
Intensidade	Descreve o grau de potência gerado por unidade.
IMT (Intensidade Média no Tempo)	Descreve a quantidade média de energia liberada por segundo.
Duração no Tratamento	Determinado pela intensidade de saída e pelas metas específicas.

(STARKEY; FRAGOSO, 2001).

A transferência de energia do US pode ocorrer através da técnica do contato direto, onde o transdutor é aplicado diretamente sobre a pele sendo necessário um agente acoplador como, por exemplo, o gel condutor aquoso específico para US (LOW; REED, 2001). Os géis apresentam condutividades elevadas em relação a pomadas e cremes que apresentaram condutividades baixas ou nulas. (FERREIRA; STATTMILER; BELO, 2006).

Muitos estudos utilizam produtos farmacológicos como diclofenaco, e também géis a base de plantas medicinais como meio acoplador (HSIEH, 2006; ALFREDO et al., 2009). Tais como *Aloe barbadensis* (MAIA FILHO et al.); *Calendula officinalis* (RICOLDY et al., 2010); *Arnica Montana* (ALFREDO et al., 2009).

A dose recomendada do UST para a maioria dos tratamentos clínicos varia de 0,5 a 1,0W/cm² da superfície do transdutor. O tempo de duração do tratamento varia de 1 a 8 minutos, dependendo da condição a ser tratada e local anatômico. A frequência deve ser de 1,0 MHz (CAMARGO, 2006).

2.2. Fonoforese

A fonoforese é a aplicação tópica de princípios ativos através da camada externa da pele visando alcançar os tecidos subjacentes com auxílio UST (CAGNIE et al., 2003), ou seja, permite a migração de moléculas de fármacos através da pele sob a influência do UST (KITCHEN; RIBEIRO, 2003).

A fonoforese associada ao UST é uma técnica que há muito tempo é estudada, considerada um método vantajoso sobre outras técnicas, porque o fármaco não é introduzido no organismo. A forma de aplicação tópica, permite a penetração nos tecidos sem passar pela via sistêmica, reduzindo a necessidade de eliminação metabólica das substâncias. Apresenta vantagens quando comparada a outras terapias que utilizam as vias intramuscular, endovenosa e oral, por eliminar completamente a fobia e a dor e irritações gastrointestinais (STARKEY; FRAGOSO, 2001).

Muitos medicamentos anti-inflamatórios não hormonais são frequentemente indicados para o tratamento de dores e diminuição do processo inflamatório. A administração oral desses fármacos com frequência se associa com alterações gastrointestinais. Esses efeitos levaram os pesquisadores a estudar outras maneiras de aplicação desses medicamentos. Estudos comparando a ação do uso tópico de anti-inflamatórios não hormonais em forma de pomada, creme e gel (KOEKE et al., 2005) mostraram que a condutibilidade dos géis é maior do que as pomadas e cremes (FERREIRA et al., 2006).

Vários estudos com animais e humanos demonstram que o uso do UST associado à fonoforese apresenta indícios positivos quanto à sua confiabilidade. A indústria farmacológica comercializa inúmeras substâncias que a transmissão transdérmica facilitada pela fonoforese (ALFREDO et al., 2009; HSIEH, 2006; ROSIM et al., 2005).

Segundo Parizotto et al. (2003), Fellingner Schmid foi o primeiro a usar o UST associado a fonoforese em tratamento de poliartrites dos dedos da mão utilizando como agente acoplador um gel contendo hidrocortisona. Terahara et al (2002) conclui que o mecanismo que envolve a deposição do princípio ativo é o fenômeno da cavitação, sendo corroborado em estudos prévios, otimizando a fonoforese.

Em experimentos realizados com ratos utilizando-se o modo pulsátil com frequência de 1 MHz e intensidade de $0,5\text{w/cm}^2$, com tempo de 5 minutos e área de

redução efetiva (ERA) de $0,75\text{cm}^2$ foi demonstrado melhora significativa do comportamento dos animais artríticos após o tratamento com fonoforese (HSIEH, 2006).

(ROSIM et al., 2005) realizaram um estudo quantitativo da fonoforese com diclofenaco sódico (em particular com Voltaren Emulgel Â®, Novartis). Para essa pesquisa foram selecionados voluntários saudáveis submetidos à irradiação ultrassônica com a medicação. Após esse procedimento foi medida a massa de diclofenaco no plasma por cromatografia líquida de altodesempenho. O mesmo procedimento foi repetido 1 mês depois com os mesmos voluntários, porém com o equipamento desligado. Os autores concluíram que houve aumento significativo da penetração transdérmica do diclofenaco de sódio no grupo com o equipamento ligado (fonoforese).

(CAGNIE et al., 2003) também no seu estudo sobre fonoforese e aplicação tópica de cetoprofeno conclui que a transmissão transdérmica da medicação foi mais eficaz com a utilização do UST comparada à aplicação tópica.

A concentração do gel no procedimento da fonoforese pode ser maior (10%) ou até menor (2%). Ricoldy et al. (2010) fizeram uso do gel de calêndula para tratar inflamação pela fonoforese na concentração de 10%, já (MAIA FILHO et al., 2011) em experimento com ratos Wistar para testar gel de *Aloe vera* em inflamação utilizou uma concentração de 2% de extrato bruto em quantidade de 0,5ml.

2.2. Fitoterapia

A Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares (PNMNPC, 2008) do Ministério da Saúde define fitoterapia como sendo uma terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais e suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) expressa sua posição a respeito da fitoterapia reforçando a necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário (PNMNPC, 2008).

A fitoterapia evoluiu ao longo dos tempos, e o uso de plantas medicinais na arte de curar é uma forma de tratamento com raízes muito antigas (DA ROSA; MACHADO, 2007; MACIEL et al., 2002); e o interesse popular e institucional vem crescendo no sentido de fortalecer a fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS)

(DA ROSA; MACHADO, 2007; MACIEL et al., 2002) como sendo uma opção terapêutica eficaz e de baixo custo. (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008); (PNMNPC, 2008).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico em muitas comunidades e grupos étnicos. Em regiões mais pobres e até mesmo em grandes cidades brasileiras, as plantas medicinais são comercializadas em feiras livres e mercados populares (MACIEL et al., 2002).

A utilização de plantas medicinais em pacientes acometidos por doenças reumáticas é uma realidade e já despertou o interesse da comunidade científica (DA ROSA; MACHADO, 2007).

Já foi documentada possível ação anti-inflamatória da *Harpagophytum procumbens* (Garra do Diabo), *Oenotherabiennis* L. (Groselha Negra), *Salix* spp (Salgueiro), *Tripterygium wilfordii* Hook F., *Uncaria tomentosa* (Unha de Gato), *Urtica dioica* (Urtiga), *Tanacetum parthenium* (Tanaceto), *Zingiber officinale* Roscoe (Gengibre), *Ocimum* spp (Manjeriço) *Copaifera* L. (Copaíba) (DA ROSA; MACHADO, 2007; MACIEL et al., 2002) e *Pouteria campechiana*, (HERNANDEZ et al., 2008).

2.2.1. Indícios etnofarmacológicos da *Elaeoluma nuda*

O gênero *Pouteria*, que pertence à família Sapotaceae, possui aproximadamente 80 espécies. Quanto ao uso popular pode-se citar a sua indicação como purgativo, vermífugo, afrodisíaco e no tratamento de hemorragia e disenteria. Extratos brutos de *Pouteria venosa* obtidos em etanol tem potencial antirradicalar e antimalárico (MONTENEGRO et al., 2006). A *Pouteria viridis* na forma de extratos apresentou ação promissora contra a infecção pelo HIV (BEDOYA et al., 2008).

A atividade antimicrobiana *in vitro* de 12 espécies de plantas da biodiversidade Amazônica, entre elas, a *E. nuda* já foram investigadas (CARNEIRO et al., 2008). Os compostos químicos dessas espécies apresentam substâncias bioativas de alto interesse biofarmacológico como os terpenoides, flavonoides e saponinas. Esta espécie não tem uso medicinal conhecido e estudos recentes indicaram atividade antimicrobiana (CARNEIRO et al., 2008) e hemolítica em humanos (OLIVEIRA et al., 2009).

Os trabalhos pioneiros realizados com a espécie *E. nuda*, também conhecida como *Pouteria 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 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).



Figura 2 - Exsicata e ficha de *Elaeoluma nuda* (E.nuda), Registro n° 179316 do Herbário do INPA.

Elaeoluma nuda é uma espécie do gênero *Pouteria* da família Sapotaceae e ainda não possui, nome popular. Foi coletada e processada juntamente com outras onze espécies sem estudos químicos ou farmacológicos conhecidos para obtenção do extrato aquoso por infusão. Para sua obtenção as folhas foram coletadas, pesadas e desidratadas a -50°C . O material vegetal seco foi extraído por infusão através de evaporação sob pressão reduzida e o extrato seco foi selado em recipiente de vidro e armazenado a -20°C . O extrato obtido das folhas, galhos e cascas tiveram um teor extrativo entre 7 e 15%, com o maior rendimento (15,86%) a partir do extrato das folhas (CARNEIRO et al., 2008).

Estudos apontam ação citotóxica em células tumorais de sistema nervoso e mama (CARNEIRO et al., 2008). A citotoxicidade dos extratos foi avaliada pelo método da sulforodamina B (CRAVEIRO; CARVALHO; NUNES, 2008). Nesse estudo, utilizaram-se linhagens cedidas pelo Mercy Children's Hospital tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5 % de CO_2 . As linhagens foram: MDA-MB435 (mama humano), HCT-8 (cólon humano), SF295 (sistema nervoso humano) e HL60 (leucemia humana).

2.3. Modelos experimentais de artrite (*in vivo*)

Modelos experimentais de artrite são ferramentas que simulam os aspectos básicos da doença articular, contribuindo para a compreensão da fisiopatologia e também servem de base para ensaios pré-clínicos de novas terapias medicamentosas (HEGEN; KEITH; COLLINS, 2008).

Apesar de nenhum modelo animal representar verdadeiramente a doença humana, eles mimetizam vários aspectos da patologia e podem ser usados como ferramentas para compreender e elucidar seus mecanismos (VAN DEN BERG, 2009).

A concepção dos modelos experimentais de artrite mudou ao longo dos anos e os modelos por imunocomplexos passaram a ter um grande valor e são cada vez mais utilizados (VAN DEN BERG, 2009).

De acordo com (HEGEN; KEITH; COLLINS, 2008) os três modelos animais mais utilizados para AR são o AIA em ratos e Artrite Induzida por Colágeno (AIC) em ratos e AIC em camundongos e ressalta que outrora a existência de outros modelos experimentais estes não apresentam dados suficientes de eficácia clínica comprovada para AR.

2.4. 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 presença de um sítio específico de adesão molecular (PEARSON, 1956).

O AIA foi desenvolvido em ratos Lewis, e é 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 (WHITEHOUSE, 2007).

Desde então vários modelos animais para o estudo de artrite foram desenvolvidos, sendo um dos mais aplicados o modelo de artrite induzida pelo colágeno (Collagen-Induced Arthritis - CIA). Este modelo mimetiza diversos aspectos

da doença humana e mantém o uso do ACF no protocolo de indução (HEGEN; KEITH; COLLINS, 2008; VAN DEN BERG, 2009).

Além disso, conforme observou (BEVAART; VERVOORDELDONK; TAK, 2010) quando a eficácia de vários compostos é testada frente a modelos AIA e/ou CIA, o valor preditivo de eficácia clínica em humanos com AR é maior do que qualquer outro modelo isoladamente. Por esta razão escolhemos este modelo pensando em um desdobramento futuro deste trabalho.

O AIA é um modelo de artrite que promove o desenvolvimento de poliartrite simétrica, destruição articular, afluxo de células inflamatórias com envolvimento de células T e hiperplasia sinovial. A lesão cartilaginosa está associada com maior destruição óssea, como na doença humana e, eventualmente, a pele e o tubo digestivo são afetados (BEVAART; VERVOORDELDONK; TAK, 2010).

A artrite induzida por adjuvante é iniciada pela inoculação de ACF na base da cauda dos animais. O ACF é uma mistura viscosa e sem cor, constituída de 85% de óleo mineral, 15% do componente antigênico *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) inativos pelo calor e liofilizados (KNIGHT et al., 1992). A cepa H37Ra do *M. tuberculosis* é amplamente utilizada no preparo do ACF, embora outras cepas tenham sido utilizadas com sucesso (NUNES et al., 2009) (VAN EDEN; WAGENAAR-HILBERS; WAUBEN, 2001).

2.5. Artrite Reumatoide (AR)

Historicamente a AR é entendida como uma condição clínica potencialmente grave, não só pela morbidade associada à dor, mas também pela limitação funcional e repercussão na qualidade de vida dos pacientes (PINTO; MIGUEL; REZENDE, 2006). Ao longo dos anos a AR é estudada a fim de elucidar seus mecanismos imunopatológicos e ambientais.

A AR é uma artropatia crônica inflamatória de maior prevalência entre as doenças autoimunes como também a que mais causa invalidez (temporária ou permanente), a qual possui muitos de seus mecanismos fisiopatológicos ainda por serem elucidados. Segundo a Sociedade Brasileira de Reumatologia a AR é uma doença autoimune de etiologia desconhecida, caracterizando por poliartrites periférica simétrica que leva à deformidade e destruição das articulações por erosão da cartilagem e do osso.

Sendo a AR uma doença bastante limitante e acomete várias articulações e leva a diminuição da função ao longo da sua evolução. O diagnóstico deve ser baseado na associação de uma série de sintomas e sinais clínicos, bem como pela presença marcadores sorológicos, fator reumatoide e Anti-CCP (RODRIGUES et al., 2005; BÉRTOLO et al., 2007).

Traçando um perfil epidemiológico a AR acomete duas a três vezes mais as mulheres do que os homens (ROBBINS; KUMAR; ABBAS, 2010) e tende a aparecer na quarta década de vida, com pico de incidência na quinta década (ALAMANOS; DROSOS, 2005). Cerca de 50% dos pacientes são considerados incapacitados para o trabalho neste período de evolução (YOUNG et al., 2007), e a expectativa de vida está reduzida em 3 a 10 anos (TOBÓN; YOUINOU; SARAUX, 2010).

Apesar dos avanços no entendimento da fisiopatologia da AR sua etiologia ainda permanece obscura. É uma doença de patogênese complexa e multifatorial, com a participação de fatores genéticos, hormonais, ambientais e agentes infecciosos (ISAACS, 2010).

Estudos genéticos já documentaram a ocorrência de AR com características familiares, com aproximadamente 20 *loci* de risco identificados para a AR. O HLA (Complexo Principal de Histocompatibilidade) contribui para uma importante parcela de risco genético e o gene HLADRB1 é o mais forte na associação genética (RAYCHAUDHURI, 2010).

Além desses fatores há também agentes infecciosos envolvidos na gênese da AR. O processo pode ser iniciada por um antígeno “artritogênico”, que pode ser exógeno, endógeno pela combinação de ambos. As bactérias e vírus são fortes candidatas entre eles o vírus Epstein Barr (EBV), que já foi isolado do tecido sinovial de pacientes com AR.

A reação do organismo as estes antígenos promove uma resposta autoimune com lesão tecidual por hipersensibilidade tardia mediada por linfócitos TCD4, subgrupo Th1eTh17. Estes linfócitos ativados estimulam os monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais a produzirem citocinas tais como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral pela (TNF-alfa) fundamentais no processo de inflamação da AR (HOCHBERG, 2009). A citocina IL-1 α é importante para a progressão da AR (CHUNG et al., 2012).

Essas citocinas em conjunto com metaloproteinase ativam outras citocinas e células, criando uma rede de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias que são

as duas classes encontradas no líquido sinovial de portadores de AR. O efeito das citocinas pró-inflamatórias é predominante e persistente (TAYLOR; MEHTA; TULL, 2010).

Além dos linfócitos T os linfócitos B também estão presentes no infiltrado inflamatório sinovial e nos centros germinativos dos folículos linfóides que se formaram no local. Os linfócitos B estimulados pelos linfócitos TCD4⁺ produzem imunoglobulinas e fator reumatóide (FR). Este, por sua vez, promove a ativação do complemento por meio da formação de imunocomplexos estimulando a inflamação e a sinovite crônica (CARVALHO; LANNA; BÉRTOLO, 2008).

O início do tratamento precoce é fundamental para o controle e prevenção da incapacidade funcional e lesão articular, melhorando a qualidade de vida dos pacientes (BÉRTOLO et al., 2007).

A sociedade Brasileira de Reumatologia em seu Projeto Diretriz de 2002 para diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide, 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 potencializa o efeito do metotrexato na artrite reumatóide (BÉRTOLO et al., 2007). A chamada terapia biológica por bloqueio de citocinas, receptores e outros mediadores pró-inflamatórios como TNF e IL-1 ou por anticorpos monoclonais, têm, ainda, efeito supressivo (não-curativo), com possível toxicidade, alto custo e inconveniência por tratar-se de proteínas necessariamente parenterais (WOOD; OLSEN; STEIN, 2004).

Além do tratamento medicamentoso da AR a fisioterapia contribui para que o paciente possa continuar a exercer suas atividades de vida diária considerando o potencial incapacitante da AR (BÉRTOLO et al., 2007).

A fisioterapia usa de muitos recursos eletrotermofototerápicos para tratar e reabilitar inúmeras doenças do tecido conjuntivo, entre elas encontra-se a AR (BIANCHETTI et al., 2009) Dentre esses recursos, destaca-se o Ultrassom terapêutico (UST) associado à fonoforese, que tem como objetivo a diminuição do edema, dor e melhora da qualidade de vida (KITCHEN; RIBEIRO, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a ação anti-inflamatória e antiedematogênica do gel de *Elaeoluma nuda* aplicado pela fonoforese em artrite induzida por adjuvante completo de Freund em ratos Lewis.

3.2. Objetivos específicos

A) Avaliar o perfil sérico das citocinas IL-1 α e TNF- α , antes e depois da aplicação da fonoforese em ratos com artrite induzida;

B) Analisar a ação antiedematogênica do gel de *Elaeoluma nuda* em ratos com artrite induzida.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Foram utilizados 30 ratos albinos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis com idade entre 8 a 12 semanas e peso médio (250 a 350g). O projeto foi submetido ao CEEA da UFAM e aprovado através do protocolo n° 001/2010. Os animais foram 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 em cinco grupos (dois animais por gaiola) seguindo a distribuição abaixo:

- Grupo I: controle negativo – sem indução e sem tratamento (n=6).
- Grupo II: controle positivo – com indução e sem tratamento (n=6).
- Grupo III: com indução e tratamento UST com gel aquoso (n=6).
- Grupo IV: com indução e tratamento pela fonoforese com gel de diclofenaco (n=6).
- Grupo V: com indução e tratamento pela fonoforese com gel de *E. nuda* 2% (n=6).

4.2. Extrato

O extrato aquoso utilizado neste estudo foi obtido a partir da planta *E. nuda* (Baehni) Aubrévcoletada na reserva Adolpho Ducke (Amazonas, Brasil), com excicata depositada no INPA (Figura 1). As folhas foram coletadas, secadas e moídas e o extrato foi obtido por infusão. Esse extrato foi cedido pelos Doutores Adrian Martin Pohlit e Ana Lucia Basílio Carneiro.

Para este experimento foram confeccionados 100 ml de gel a 2% de extrato aquoso de *E. nuda*. Para tal foram misturada água desmineralizada, nipagim, propilenoglicol, até alcançar dispersão completa. Em seguida foi adicionado lentamente carbopol 1,20%, pulverizando-o e deixando-o hidratar por 30 minutos. Seguiu-se com a mistura das substâncias sob aquecimento abaixo de 60°. C.

Adicionou-se, trietanolamina qsp pH 7,0, água desmineralizada 5% previamente preparada homogenizando até atingir pH 7,0. Por fim adicionou-se o extrato de *E. nuda* a 2% até completar a dispersão.



Figura 3 - Amostra de Gel de *E. nuda* a 2%

4.3. Indução da artrite

Após breve anestesia inalatória com isoflurano, os animais foram inoculados por via intradérmica na base da cauda com 0,1ml de ACF, contendo 1 μ g de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA, ATCC25177). O dia da indução foi considerado o 1º dia do experimento (Dia 1).



Figura 4 - Patas traseiras (sem indução e sem tratamento).



Figura 5 - Aplicação do Adjuvante Completo de Freund (ACF) na base da cauda dos animais com auxílio de um contensor para ratos.



Figura 6 - Patas traseiras (com indução sem tratamento).

4.4. Tratamento com UST

O extrato de *E. nuda* foi administrado por via transdérmica através de um gel aplicado na região plantar das patas traseiras utilizando o equipamento Ultrassom Terapêutico (Bioset®, modelo Sonocel Expert 1Mhz) com cabeçote reduzido. A aplicação foi feita nos grupos III (gel aquoso), IV (diclofenaco) e V (gel de *E. nuda*) através de movimentos circulares lentos, durante 1 minuto com frequência de 1.0 MHz, e intensidade de $0,5W/cm^2$ no modo pulsado. Foram realizadas 10 sessões (1

sessão/dia). Durante o tratamento o animal foi levemente contido por um experimentador treinado, de forma a induzir o mínimo possível de estresse ao animal. O profissional habilitado não era conhecedor do grupo a que pertenciam os animais, garantindo assim, o cegamento da pesquisa (Figura 7).

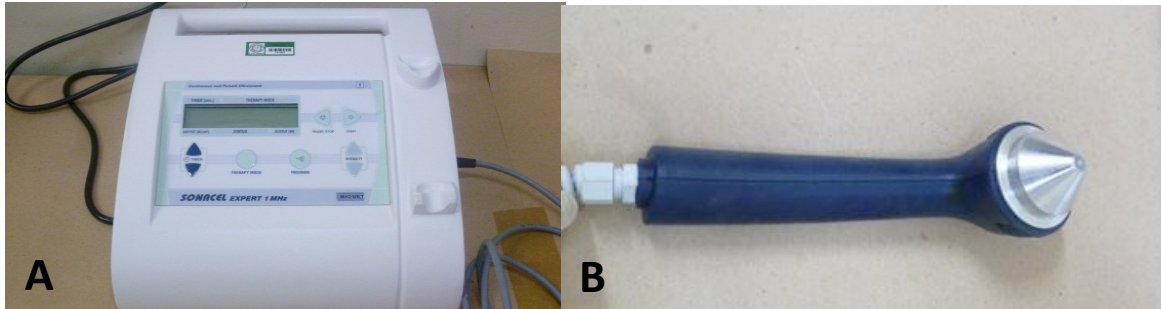


Figura 7 - (A) Aparelho UST Bioset ® modelo Sonocel Expert 1,0MHz; (B), detalhe do cabeçote reduzido (ERA 0,8 cm²)

O tratamento teve início no décimo quinto dia após a indução (Figura 8), visto que os sinais clínicos da artrite aparecem normalmente cerca de 10 dias após a indução e apresenta pico máximo (apêndice 2) na metade da curva cinética de artrite (HEGEN et al., 2008)



Figura 8 - Tratamento por Fonoforese com gel de *Elaeoluma nuda* na região plantar com cabeçote reduzido (ERA 0,8 cm²).

4.5. Avaliação do edema de pata

A evolução do edema de pata foi avaliada por pletismometria digital, usando pletismômetro para ratos e camundongos (Insight®) (Figura 9).



Figura 9 - Pletismômetro Insight ® modelo EFF-304. Equipamento utilizado para obtenção do volume das patas traseiras dos ratos.

Através da imersão da pata do animal em água ocorre o deslocamento do líquido que é captado por gerando uma medida do volume deslocado e volume da pata é visualizado em um visor digital. O deslocamento do líquido foi verificado através da imersão das patas traseiras, direita e esquerda, até a articulação tibio-társica registrando-se o volume deslocado no visor. Os dados foram coletados diariamente do dia 1º. ao 25º dia do experimento e para aumentar a confiabilidade do teste apenas um examinador realizou estas medidas. Os valores de volume de líquido deslocado foram expressos em mL.

4.6. Avaliação do perfil das citocinas

Seguindo o método descrito por (WAYNFORTH; FLECKNELL, 1980), as amostras de sangue para análise de citocinas foram obtidas através de punção

cardíaca, com o animal anestesiado com isoflurano. Em seguida, foi realizada eutanásia com deslocamento cervical.

As amostras de sangue (5ml) foram mantidas sob refrigeração e encaminhadas para o Laboratório de Citometria da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM). As análises foram feitas de acordo com o método descrito por (MITELMAN; BUCCHERI; PRACCHIA, 2009) utilizando Kits CBA (*cytometric beads array*) (BD Biosciences), para a quantificação das citocinas TNF α e IL-1 α .

Seis populações de *beads* com diferentes intensidades de fluorescência foram conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturadas para formar o CBA e lidas no canal FL-3 do citômetro de fluxo FACScalibur (BD). As populações de *beads* foram visualizadas de acordo com as respectivas intensidades de fluorescência. No CBA, as *beads* de captura das citocinas foram misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE, e depois encubadas com as amostras para formar o ensaio em “sanduíche”. Os tubos para aquisição foram preparados com 50 μ L da amostra de sangue, 50 μ L da mistura de *beads* e 50 μ L do reagente de detecção Th1/ Th2 PE. Os tubos foram homogeneizados e incubados por três horas, em temperatura ambiente, no escuro. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o software CellQuest (BD).

4.7. Análise estatística

Os valores do edema foram expressos como média e erro padrão, com intervalo de confiança 95%. Foi utilizada Análise de Variância (Anova One-Way) para comparação de médias com Teste de Dunnett para análise pós-hoc. O Teste de Tendência Linear foi aplicado para analisar entre as médias de citocinas dos grupos se houve linha de tendência significativa (NAZIR et al., 2007).

O nível de significância adotado foi de $p=0,05$, com poder estatístico de 80%. para análise do perfil de assinatura para altos produtores, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a frequência de indivíduos altos produtores deslocava o grupo para um quartil distinto (intervalos de 25%), comparando-se com o valor de (BILLIAU; MATTHYS, 2001).

5. RESULTADOS

Efeito da Fonoforese com Gel de *Elaeoluma nuda* sobre Artrite por Adjuvante Completo de Freund

A avaliação por pletismometria na tabela 2, gráficos 1 e 2 ao final do 21º dia de tratamento o volume das patas dos animais tratados com UST com gel de *E. nuda* foi significativamente menor do que dos animais do grupo controle positivo e dos animais do grupo tratado apenas com gel aquoso. O tratamento com gel de diclofenaco produziu o mesmo efeito que a *E. nuda* sobre a redução dos volumes das patas.

Tabela 2

Pletismometria das Patas no 21º dia de experimento em ratos Lewis com artrite induzida

Grupo	Média	IC 95%
Controle Positivo	2.14 ± 0,390	1.51-2.75
UST com gel Aquoso	1.80 ± 0,350	1.25-2.31
UST com gel Diclofenaco	1.35 ± 0,058	1.25-1.44
UST com gel <i>E. nuda</i>	1.35± 0,060	1.26-1.45

ANOVA one-way, diferença com $p < 0.05$.

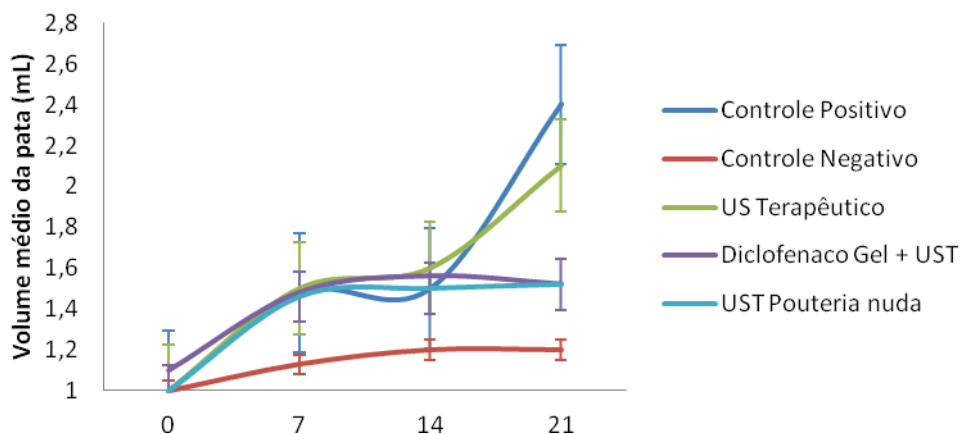


Gráfico 1 - Cinética de Artrite para os diferentes Grupos de Experimento. Os resultados são expressos como volume médio das patas (mL) e erro padrão (SEM)

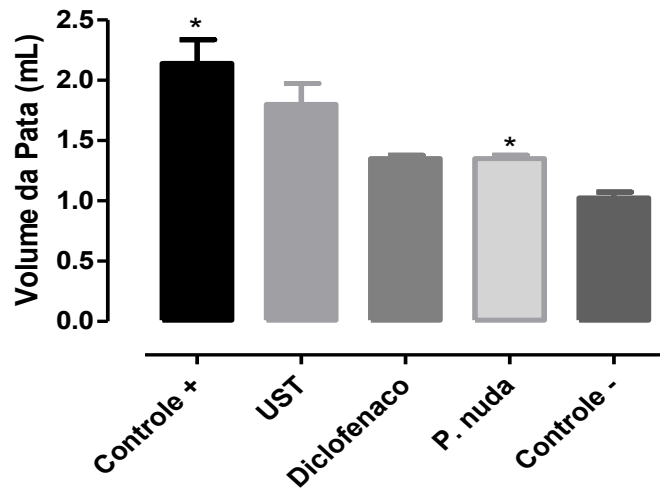


Gráfico 2 - Pletismometria para os diferentes Grupos no 21º dia de experimento. Os resultados são expressos como volume médio das patas (mL) e erro padrão (SEM)

O grupo tratado com ultrassom não apresentou melhora no edema em relação ao controle positivo até o 21º, com atenuação de artrite de apenas 2% indicando que este tratamento não foi efetivo neste período de experimento. Os grupos tratados com fonoforese com gel de diclofenaco e gel de *E. nuda*, produziram atenuação da artrite em 33% e 34%, respectivamente (Gráfico 3).

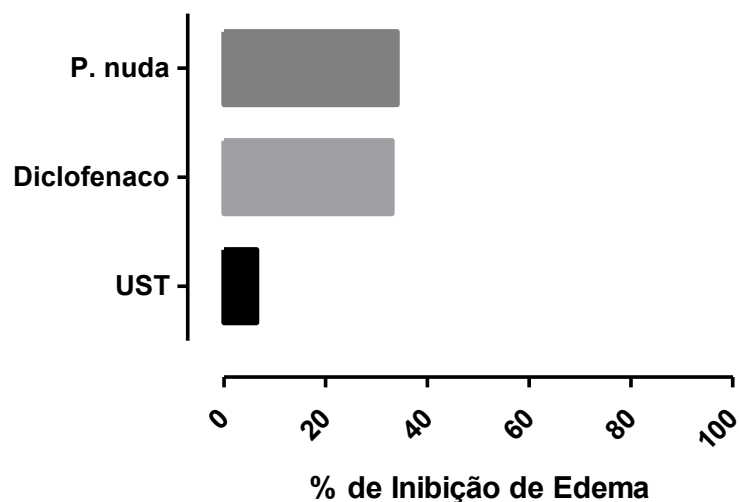


Gráfico 3 - Percentual de inibição de edema em relação ao controle positivo no 21º dia de experimento.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados da quantificação de citocinas TNF- α e IL1- α . Os níveis séricos de TNF- α foram significativamente menores nos animais tratados com *E. nuda* em relação a todos os demais grupos. Foram observados menores níveis séricos de IL1- α nos animais tratados com *E. nuda* em relação aos outros grupos. Vide tabela abaixo.

Tabela 3
Quantificação das Citocinas TNF α e IL-1 α no 210 de Experimento

Grupo	TNF α (pg/mL)		IL-1 α (pg/mL)	
	Média	IC 95%	Média	IC 95%
Controle Positivo	11,25 \pm 1,25	9,33-13,17	17,92 \pm 2,24	14,36-21,48
UST Gel Aquoso	11,44 \pm 1,10	7,89-12,51	14,82 \pm 2,18	12,53-17,10
UST Gel Diclofenaco	10,20 \pm 2,20	9,69-13,18	15,76 \pm 2,78	12,31-19,21
UST Gel <i>E.nuda</i>	7,32 \pm 3,10	3,47- 11,18	13,18 \pm 1,60	11,50-14,86

ANOVA one-way, diferença significativa com $p < 0.05$.

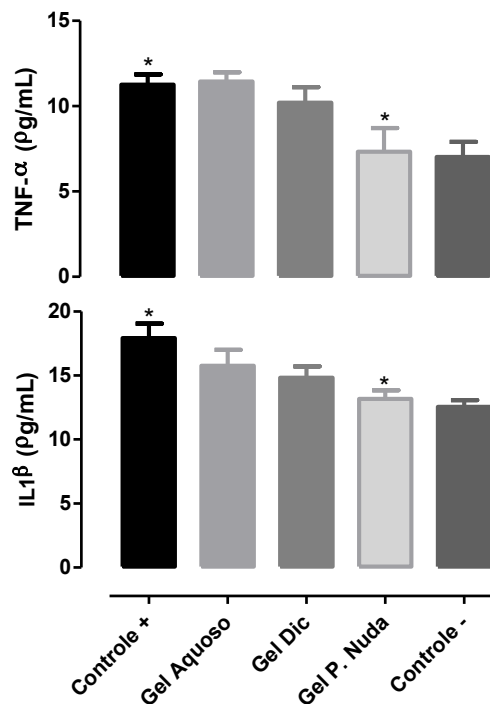


Gráfico 4 - Quantificação de Citocinas TNF- α e IL1 α

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho é o primeiro estudo demonstrando a ação anti-inflamatória da espécie *Elaeoluma nuda in vivo*. Entretanto, anteriormente, a avaliação fitoquímica de espécies do gênero *Pouteria* revelou a presença de compostos bioativos de alto interesse farmacológico como terpenoides, flavonoides e saponinas (SILVA; SIMEONI; SILVEIRA, 2009). Screening fitoquímico preliminar revelou que extratos de *E. nuda* contém fenóis, flavonóides, taninos, saponinas (OLIVEIRA et al., 2009), alcalóides e antronas (Carneiro, A. L. B., dados não publicados). Também foi observado, que em células tumorais (linhagens MDA-MB435, HCT-8, SF295, HL60), o extrato de *Elaeoluma nuda* foi capaz de inibir o crescimento destas células tumorais (CARNEIRO et al., 2008).

No presente estudo o tratamento por fonoforese com gel de *Elaeoluma nuda* apresentou eficácia superior à fonoforese com gel de diclofenaco, um agente anti-inflamatório amplamente usado. Estes resultados demonstram que, assim como outras espécies do gênero *Elaeoluma*, a espécie *E. nuda* também apresenta atividade anti-inflamatória em modelo de inflamação. Tratamentos eficazes em modelos de artrite induzida por adjuvantes, apresentam alto valor preditivo para uso em humanos (HEGEN; KEITH; COLLINS, 2008). Nesse sentido, deve-se destacar o efeito atenuador apresentado pelo gel de *Elaeoluma nuda* associado à fonoforese sobre artrite por adjuvante como uma perspectiva de tratamento. Até o presente, nenhum composto bioativo do extrato de *Elaeoluma nuda* foi identificado como responsável por essas atividades.

Diferenças nos níveis basais de citocinas séricas em nível individual representam um importante ponto a ser considerado. Assim, a análise categórica de *baixos* ou *altos* produtores de citocinas entre os animais representa uma boa estratégia para analisar o efeito dos tratamentos. Isto porque minimiza o impacto dos valores individuais tornando os dados mais homogêneos (BILLIAU; MATTHYS, 2001). Através desta estratégia é possível observar o número de animais com perfil alto produtor de TNF- α e IL1- α em cada grupo, permitindo a comparação direta entre os grupos.

O perfil da assinatura de altos produtores de citocinas do grupo tratado com fonoforese com gel de *E. nuda* foi semelhante ao controle negativo, com menor número de altos produtores entre os grupos em que houve indução de artrite

(Gráficos 5 e 6). O grupo tratado apenas com US e gel aquoso apresentou perfil de altos produtores semelhantes ao controle positivo.

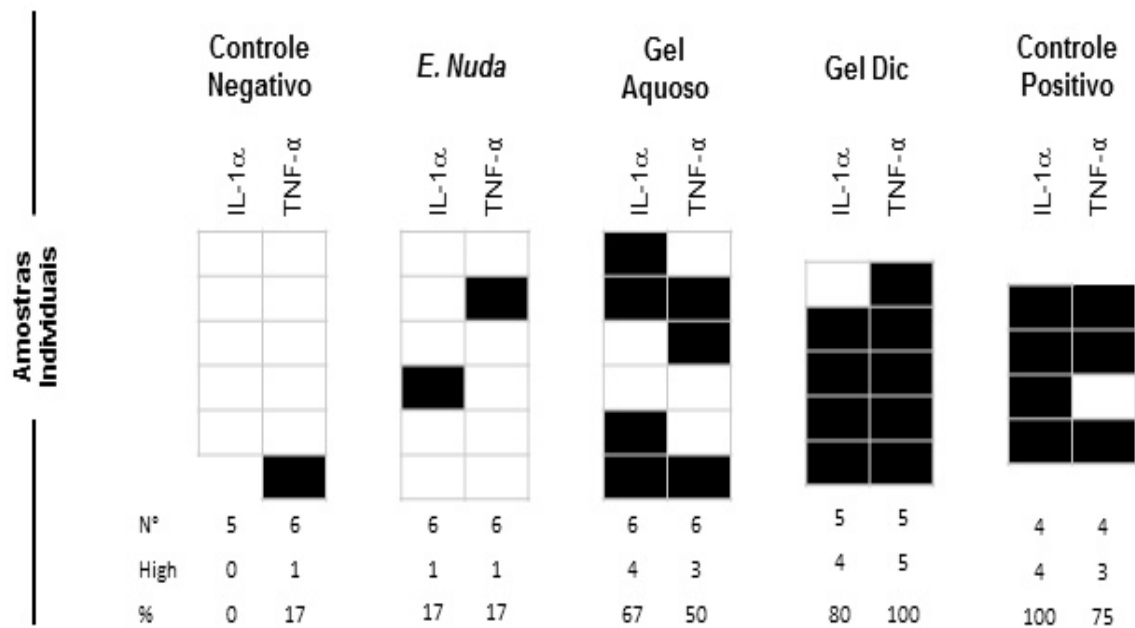


Gráfico 5 - Assinatura Individual de Citocinas para Altos Produtores

O Fator de necrose tumoral (TNF- α) e a Interleucina-1 α (IL1- α) são citocinas pleiotrópicas que exercem papel-chave na imunopatogenia da artrite induzida por adjuvante, assim como na artrite reumatoide (BEVAART; VERVOORDELONK; TAK, 2010; LOO et al., 1995). A principal fonte de TNF- α e IL1- α são células dendríticas, macrófagos ativados, células T e células NK e, quando secretado, promove ativação endotelial, ativação celular e indução de proteínas da fase aguda, configurando-se como citocinas pro-inflamatórias (IMBODEN, 2009). A fonoforese com gel de *E. nuda* foi capaz de reduzir os níveis séricos destas citocinas, assim como o número de animais com perfil alto produtor, com importante efeito atenuador sobre o edema da pata dos ratos.

A inibição de TNF- α e IL1- β é capaz de promover diversos efeitos importantes como: reduzir a expressão de moléculas do MHC, reduzir a produção de prostaglandinas, reduzir a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, a ativação de condrócitos e osteoclastos, assim como reduzir a angiogênese (SHIMIZU et al., 2003). Esses achados sugerem que o efeito anti-inflamatório da fonoforese

com gel de *E. nuda* acontece, sobretudo, por sua ação ainda não caracterizada sobre as células produtoras destas citocinas.

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstram que a fonoforese com gel de *E. nuda* 2%, apresentou efeito antiedematogênico sobre a artrite induzida por adjuvante em ratos Lewis sugerindo que componentes do gel de *Elaeoluma nuda* tenham papel anti-inflamatório quando usado para tratamento tópico e também que este tratamento obteve-se diminuição das citocinas IL-1 α e TNF α . em níveis similares ao diclofenaco.

8. REFERÊNCIAS

- ALAMANOS, Y.; DROSOS, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*, v. 4, n. 3, p. 130-136, 2005.
- ALFREDO, P. P. et al. Qualitative analysis of effects of phonophoresis with *Arnica montana* onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles. *Fisioter Pesq*, p. 273-279, 2008.
- ALFREDO, P. P.; ANARUMA, C. A.; PIÃO, A. Effects of phonophoresis with *Arnica montana* onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles: An experimental study. *Ultrasonics*, v. 49, n. 4-5, p. 466-471, 2009.
- BARNES, D. Efeito do ultra-som sobre a nocicepção e o processo inflamatório em modelos animais e sobre a estrutura química de fármacos. 2008. 66p. Dissertação de Mestrado, UNIVATES - Centro Universitário Univates, Lajeado, 2009.
- BEDOYA, L. et al. Guatemalan plants extracts as virucides against HIV-1 infection. *Phytomedicine*, v. 15, n. 6-7, p. 520-524, 2008.
- BÉRTOLO, M. B. et al. Atualização do consenso brasileiro no diagnóstico e tratamento da artrite reumatoide. *Rev Bras Reumatol*, v. 47, n. 3, p. 151-9, 2007.
- BEVAART, L.; VERVOORDELDONK, M. J.; TAK, P. P. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? *Arthritis & Rheumatism*, v. 62, n. 8, p. 2192-2205, 2010.
- BIANCHETTI, P.; et al. Avaliação eletroquímica e espectrofotométrica de soluções de rotina submetidas a ultrassom terapêutico. *Revista Liberato*, v. 10, n. 14, p. 139-148, 2009.
- BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *Journal of leukocyte biology*, v. 70, n. 6, p. 849-860, 2001.
- CAGNIE, B. et al. Phonophoresis versus topical application of ketoprofen: comparison between tissue and plasma levels. *Physical therapy*, v. 83, n. 8, p. 707-712, 2003.
- CAMARGO, L. C. S. Efeito antiinflamatório do extrato de *Zingiber officinale* aplicado por fonoforese sobre o edema de pata de ratos. 2006. 76p. Dissertação de Mestrado, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.
- CARNEIRO, A. L. B.; et al. Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 1, p. 31-38, 2008.
- CARVALHO, M. A. P.; LANNA, C. C. D.; BÉRTOLO, M. B. *Reumatologia: diagnóstico e tratamento*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- CASIMIRO, L. et al. Therapeutic ultrasound for the treatment of rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev*, v. 3, n. 3, 2002.
- CHUNG, J. et al. Anti-inflammatory effect of low intensity ultrasound (LIUS) on complete Freund's adjuvant-induced arthritis synovium. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*, v. 20, n. 4, p. 314-322, 2012.

- CIENA, A. P. et al. Therapeutic ultrasound effects in a sciatica experimental model. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 15, n. 6, p. 424-427, 2009.
- CRAVEIRO, A. C. S.; CARVALHO, D. M. M.; NUNES, R. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. *Rev Bras Farmacogn*, v. 18, (Supl.), 2008.
- DA ROSA, C.; MACHADO, C. A. Plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças reumáticas: revisão. *Rev. Bras. Farm*, v. 88, n. 1, p. 26-32, 2007.
- DURAI, M.; HUANG, M. N.; MOUDGIL, K. D. Self heat-shock protein 65-mediated regulation of autoimmune arthritis. *Journal of autoimmunity*, v. 33, n. 3, p. 208-213, 2009.
- FERREIRA, L. et al. Ultra-som e Meios de Contacto: medição das condutibilidades específicas. *Arquivos de Fisioterapia*. v. 1, p. 14-22, 2006.
- FUNOVITS, J.; ALETAHA, D.; BYKERK, V. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: methodological report phase I. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 69, n. 9, p. 1589-1595, 2010.
- GUIRRO, E.; GUIRRO, R. Fisioterapia Dermato Funcional: Fundamentos, Recursos. *Patologia*, v. 1, p. 3-23, 2002.
- HEGEN, M.; KEITH JR, J. C.; COLLINS, M. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 67, n. 11, p. 1505-1515, 2008.
- HERNANDEZ, C. et al. Isolation and evaluation of antimutagenic activity of phenolic compounds from *Pouteria campechiana* Baehni. *Philip J Sci*, v. 137, n. 1, p. 1-10, 2008.
- HOCHBERG, E. A. Risk Factors for Rheumatoid Arthritis: Other Nongenetic Host Factors. In: HOCHBERG M.C.; SILMAN, A. J., et al. (Ed.). *Rheumatoid Arthritis*. Philadelphia: Mosby Elsevier, p.35-38, 2009. .
- HSIEH, Y. L. Effects of ultrasound and diclofenac phonophoresis on inflammatory pain relief: suppression of inducible nitric oxide synthase in arthritic rats. *Physical therapy*, v. 86, n. 1, p. 39-49, 2006.
- IMBODEN, J. B. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annual Review of Pathological Mechanical Disease*, v. 4, p. 417-434, 2009.
- ISAACS, J. D. The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all? *Nature Reviews Immunology*, v. 10, n. 8, p. 605-611, 2010.
- JOHNS, L. D. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis. *Journal of Athletic Training*, v. 37, n. 3, p. 293-299, 2002.
- KITCHEN, S.; RIBEIRO, L. B. *Eletroterapia: prática baseada em evidências*. 11ª ed. São Paulo: Manole, 2003.
- KNIGHT, B. et al. Induction of adjuvant arthritis in mice. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 90, n. 3, p. 459-465, 1992.
- KOEKE, P. U. et al. Comparative study of the efficacy of the topical application of hydrocortisone, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair

process in rat tendons. *Ultrasound in medicine & biology*, v. 31, n. 3, p. 345-350, 2005.

LOO, F. A. J.; et al. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor α , and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction effect of in situ blocking in murine antigen-and zymosan-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v. 38, n. 2, p. 164-172, 1995.

LOW, J.; REED, A. *Eletroterapia aplicada: princípios e prática*. 3^a ed. São Paulo: Manole, 2001.

MACIEL, M. A. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAIA FILHO, A. et al. Effect of aloe (*Aloe barbadensis* Mill.) gel combined with ultrasound in the acute inflammatory process. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 13, n. 2, p. 146-150, 2011.

MITELMAN, A. K.; BUCCHERI, V.; PRACCHIA, L. F. Quantificação das citocinas séricas Th1/Th2 por citometria de fluxo no linfoma de Hodgkin clássico. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, v. 31, n. 4, p. 260-6, 2009.

MITRAGOTRI, S.; KOST, J. Low-frequency sonophoresis: a review. *Advanced drug delivery reviews*, v. 56, n. 5, p. 589-601, 2004.

MONTENEGRO, L. et al. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). *Rev Bras Farmacogn*, v. 16, (Supl.), 2006.

MONTI, D.; GIANNELLI, R.; CHETONI, P. Comparison of the effect of ultrasound and of chemical enhancers on transdermal permeation of caffeine and morphine through hairless mouse skin in vitro. *International journal of pharmaceutics*, v. 229, n. 1, p. 131-137, 2001.

NAZIR, N. M et al. A. Immunomodulatory effect of bergenin and norbergenin against adjuvant-induced arthritis - A flow cytometric study. *Journal of ethnopharmacology*, v. 112, n. 2, p. 401-405, 2007.

NUNES, M. et al. Comparação do Perfil de Anticorpos Anti-imunoglobulina G em murinos imunizados com IgG humana associada a diferentes adjuvantes. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 6, n. 1, 2009.

OLIVEIRA, V. M. A. et al. In vitro screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. *Acta Amazonica*, v. 39, n. 4, p. 973-980, 2009.

PARIZOTTO, N. et al. Utilização da fonoforese em desordens músculo-esqueléticas: uma meta-análise. *Revista Brasileira de Fisioterapia*, v. 7, n. 1, p. 9-15, 2003.

PEARSON, C. M. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Royal Society of Medicine*. v.91, n.1, p.95-101, 1956.

PEARSON, C. M.; WOOD, F. D. Passive transfer of adjuvant arthritis by lymph node or spleen cells. *The Journal of experimental medicine*, v. 120, n. 4, p. 547-560, 1964.

PINTO, M. R. D. C.; MIGUEL, R. D. C. C.; REZENDE, G. G. Tratamento da artrite reumatoide. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 46, p. 219-223, 2006.

PNMNPC. Programa nacional de plantas medicinais e fitoterapicos. MINISTERIO DA SAUDE - SECRETARIA DE CIÊNCIA, T. E. I. E. Brasilia: 78 p. 2008.

RAYCHAUDHURI, S. Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology*, v. 22, n. 2, p. 109-118, 2010.

RICOLDY, D. et al. Efeito do ultrassom associado ao gel de calêndula sobre a atividade reparadora em lesões musculares experimentais. *Acta Scientiarum. Health Science*, v. 32, n. 2, p. 135-140, 2010.

ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 8ª ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2010.

RODRIGUES, F. C. R., et al. Diagnosing rheumatoid arthritis early. *RBAC*. v. 37, p. 201-204, 2005.

ROSIM, G. C. et al. Diclofenac phonophoresis in human volunteers. *Ultrasound in medicine & biology*, v. 31, n. 3, p. 337-343, 2005.

SHIMIZU, M. et al. Hyaluronan inhibits matrix metalloproteinase-1 production by rheumatoid synovial fibroblasts stimulated by proinflammatory cytokines. *The Journal of rheumatology*, v. 30, n. 6, p. 1164-1172, 2003.

SILMAN, A. J.; PEARSON, J. E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, v. 4, n. Suppl 3, p. 265-272, 2002.

SILVA, C. A. M.; SIMEONI, L. A.; SILVEIRA, D. Genus *Pouteria*: chemistry and biological activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 2A, p. 501-509, 2009.

SILVA JUNIOR, F. S. R., F. A. C. Artrite induzida por Zymosan em ratos – Mecanismos envolvidos na hipernocicepção e na lise da cartilagem articular. *Acta Reum. Port.* v. 31, p. 143-149, 2006.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Rev Bras Farmacogn*, v. 18, p. 618-626, 2008.

STARKEY, C.; FRAGOSO, C. Recursos terapêuticos em fisioterapia: termoterapia, eletroterapia, ultra-som, terapias manuais. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2001.

TAYLOR, P. C.; MEHTA, P.; TULL, T. Aetiopathology of rheumatoid arthritis. *Medicine*, v. 38, n. 4, p. 163-166, 2010.

TERAHARA, T. et al. Dependence of low-frequency sonophoresis on ultrasound parameters; distance of the horn and intensity. *International journal of pharmaceutics*, v. 235, n. 1, p. 35-42, 2002.

TOBÓN, G. J.; YOUINOU, P.; SARAUX, A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: rheumatoid arthritis. *Journal of autoimmunity*, v. 35, n. 1, p. 10-14, 2010.

VAN DEN BERG, W. B. Lessons from animal models of arthritis over the past decade. *Arthritis Res Ther*, v. 11, n. 5, p. 250, 2009.

VAN EDEN, W.; WAGENAAR-HILBERS, J. P. A.; WAUBEN, M. H. M. Adjuvant Arthritis in the Rat. In: (Ed.). *Current Protocols in Immunology*: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

WAYNFORTH, H. B.; FLECKNELL, P. A. Experimental and surgical technique in the rat. Academic Press, London, 1980.

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*, v. 56, n. 4, p. 133-138, 2007.

WOOD, A. J. J.; OLSEN, N. J.; STEIN, C. M. New drugs for rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*, v. 350, n. 21, p. 2167-2179, 2004.

YOUNG, A. et al. Mortality in rheumatoid arthritis. Increased in the early course of disease, in ischaemic heart disease and in pulmonary fibrosis. *Rheumatology*, v. 46, n. 2, p. 350-357, 2007.

9. ANEXOS

ANEXO A: Projeto PIBIC 2012 Associado**Termo de Compromisso do Orientador
PIBIC - Programa de Iniciação Científica**

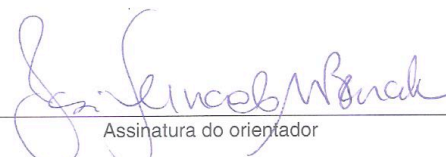
Mediante a aprovação do projeto **PIB-S/0149/2012**

Título do projeto: **ANÁLISE RADIOLÓGICA DE PATAS DE RATOS LEWIS COM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE E TRATADOS COM EXTRATO DE Pouteria nuda**

Eu, **Jose Fernando Marques Barcellos**, comprometo-me em:

1. Desenvolver o projeto de pesquisa independente de recebimento do material, uma vez que, a Universidade Federal do Amazonas tenta buscar fontes de financiamento, podendo ou não conseguir o patrocínio;
2. Orientar o(s) Bolsista(s)/Voluntário(s) nas distintas fases de pesquisa;
3. Cumprir todos os prazos de entrega das frequências, resumo, relatórios (parcial e final) até a data indicada no folder de INFORMES do Programa devidamente assinado por mim. Passando o prazo deverei entregar junto uma justificativa, anexa devidamente assinada, de acordo com a Resolução Normativa 035/2003 - CONSEPE/UFAM;
4. Informar oficialmente por escrito ao DAP, caso necessite ausentar-se de Manaus, indicando o responsável pela assinatura da frequência do Bolsista;
5. Informar oficialmente ao Departamento de Apoio à Pesquisa, impreterivelmente até o último dia útil de cada mês, a inadimplência dos bolsistas e/ou voluntários em relação as atividades dos projetos ou desligamento por motivos pessoais ou colação de grau dos mesmos, isto é, para que se possa executar o cancelamento e/ou substituição em tempo hábil;
6. Participar juntamente com o bolsista e/ou voluntário da avaliação parcial e final (oral e/ou painel).

Manaus, 28/6/12


Assinatura do orientador

ANEXO B: Projeto PIBIC 2011**Associado****Termo de Compromisso do Orientador
PIBIC - Programa de Iniciação Científica**

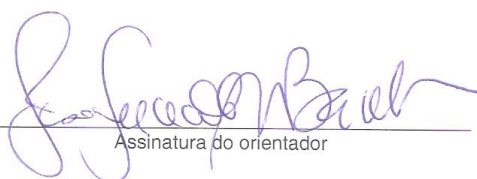
Mediante a aprovação do projeto **PIB-S/0064/2011**

Título do projeto: **Efeito anti-inflamatório do extrato da folha de Pouteria nuda na artrite induzida por adjuvante em ratos Lewis**

Eu, **Jose Fernando Marques Barcellos**, comprometo-me em:

1. Desenvolver o projeto de pesquisa independente de recebimento do material, uma vez que, a Universidade Federal do Amazonas tenta buscar fontes de financiamento, podendo ou não conseguir o patrocínio;
2. Orientar o(s) Bolsista(s)/Voluntário(s) nas distintas fases de pesquisa;
3. Cumprir todos os prazos de entrega das frequências, resumo, relatórios (parcial e final) até a data indicada no folder de INFORMES do Programa devidamente assinado por mim. Passando o prazo deverei entregar junto uma justificativa, anexa devidamente assinada, de acordo com a Resolução Normativa 035/2003 - CONSEPE/UFAM;
4. Informar oficialmente por escrito ao DAP, caso necessite ausentar-se de Manaus, indicando o responsável pela assinatura da frequência do Bolsista;
5. Informar oficialmente ao Departamento de Apoio à Pesquisa, impreterivelmente até o último dia útil de cada mês, a inadimplência dos bolsistas e/ou voluntários em relação as atividades dos projetos ou desligamento por motivos pessoais ou colação de grau dos mesmos, isto é, para que se possa executar o cancelamento e/ou substituição em tempo hábil;
6. Participar juntamente com o bolsista e/ou voluntário da avaliação parcial e final (oral e/ou painel).

Manaus, 28 / 06 / 12


Assinatura do orientador

ANEXO C: Projeto PIBIC 2011 Associado**Termo de Compromisso do Orientador
PIBIC - Programa de Iniciação Científica**

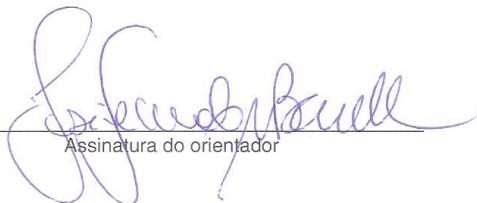
Mediante a aprovação do projeto **PIB-B/0033/2011**

Título do projeto: **Estudo in vivo do efeito anti-inflamatório de Pouteria nuda na Artrite Reumatóide: Perfil de Citocinas**

Eu, **Jose Fernando Marques Barcellos**, comprometo-me em:

1. Desenvolver o projeto de pesquisa independente de recebimento do material, uma vez que, a Universidade Federal do Amazonas tenta buscar fontes de financiamento, podendo ou não conseguir o patrocínio;
2. Orientar o(s) Bolsista(s)/Voluntário(s) nas distintas fases de pesquisa;
3. Cumprir todos os prazos de entrega das frequências, resumo, relatórios (parcial e final) até a data indicada no folder de INFORMES do Programa devidamente assinado por mim. Passando o prazo deverei entregar junto uma justificativa, anexa devidamente assinada, de acordo com a Resolução Normativa 035/2003 - CONSEPE/UFAM;
4. Informar oficialmente por escrito ao DAP, caso necessite ausentar-se de Manaus, indicando o responsável pela assinatura da frequência do Bolsista;
5. Informar oficialmente ao Departamento de Apoio à Pesquisa, impreterivelmente até o último dia útil de cada mês, a inadimplência dos bolsistas e/ou voluntários em relação as atividades dos projetos ou desligamento por motivos pessoais ou colação de grau dos mesmos, isto é, para que se possa executar o cancelamento e/ou substituição em tempo hábil;
6. Participar juntamente com o bolsista e/ou voluntário da avaliação parcial e final (oral e/ou painel).

Manaus, 28 / 6 / 12


Assinatura do orientador

ANEXO D: Projeto PIBIC 2010 Associado**Termo de Compromisso do Orientador
PIBIC - Programa de Iniciação Científica**

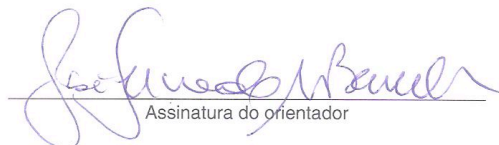
Mediante a aprovação do projeto **PIB-B/0044/2010**

Título do projeto: **Estudo do efeito anti-inflamatório de Pouteria nuda na artrite reumatóide: Perfil de Citocinas**

Eu, **Jose Fernando Marques Barcellos**, comprometo-me em:

1. Desenvolver o projeto de pesquisa independente de recebimento do material, uma vez que, a Universidade Federal do Amazonas tenta buscar fontes de financiamento, podendo ou não conseguir o patrocínio;
2. Orientar o(s) Bolsista(s)/Voluntário(s) nas distintas fases de pesquisa;
3. Cumprir todos os prazos de entrega das frequências, resumo, relatórios (parcial e final) até a data indicada no folder de INFORMES do Programa devidamente assinado por mim. Passando o prazo deverei entregar junto uma justificativa, anexa devidamente assinada, de acordo com a Resolução Normativa 035/2003 - CONSEPE/UFAM;
4. Informar oficialmente por escrito ao DAP, caso necessite ausentar-se de Manaus, indicando o responsável pela assinatura da frequência do Bolsista;
5. Informar oficialmente ao Departamento de Apoio à Pesquisa, impreterivelmente até o último dia útil de cada mês, a inadimplência dos bolsistas e/ou voluntários em relação as atividades dos projetos ou desligamento por motivos pessoais ou colação de grau dos mesmos, isto é, para que se possa executar o cancelamento e/ou substituição em tempo hábil;
6. Participar juntamente com o bolsista e/ou voluntário da avaliação parcial e final (oral e/ou painel).

Manaus, 28, 06, 12


Assinatura do orientador

ANEXO E: Projeto PIBIC 2010 Associado**Termo de Compromisso do Orientador
PIBIC - Programa de Iniciação Científica**

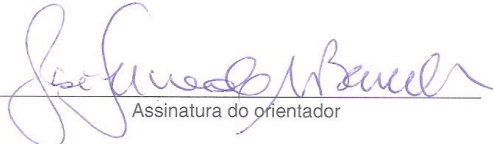
Mediante a aprovação do projeto **PIB-B/0044/2010**

Título do projeto: **Estudo do efeito anti-inflamatório de Pouteria nuda na artrite reumatóide: Perfil de Citocinas**

Eu, **Jose Fernando Marques Barcellos**, comprometo-me em:

1. Desenvolver o projeto de pesquisa independente de recebimento do material, uma vez que, a Universidade Federal do Amazonas tenta buscar fontes de financiamento, podendo ou não conseguir o patrocínio;
2. Orientar o(s) Bolsista(s)/Voluntário(s) nas distintas fases de pesquisa;
3. Cumprir todos os prazos de entrega das frequências, resumo, relatórios (parcial e final) até a data indicada no folder de INFORMES do Programa devidamente assinado por mim. Passando o prazo deverei entregar junto uma justificativa, anexa devidamente assinada, de acordo com a Resolução Normativa 035/2003 - CONSEPE/UFAM;
4. Informar oficialmente por escrito ao DAP, caso necessite ausentar-se de Manaus, indicando o responsável pela assinatura da frequência do Bolsista;
5. Informar oficialmente ao Departamento de Apoio à Pesquisa, impreterivelmente até o último dia útil de cada mês, a inadimplência dos bolsistas e/ou voluntários em relação as atividades dos projetos ou desligamento por motivos pessoais ou colação de grau dos mesmos, isto é, para que se possa executar o cancelamento e/ou substituição em tempo hábil;
6. Participar juntamente com o bolsista e/ou voluntário da avaliação parcial e final (oral e/ou painel).

Manaus, 28/06/12


Assinatura do orientador

ANEXO F: Certificado de Membro de Diretório de Pesquisa

Grupo de pesquisa: Morfologia e Patologia Celular

<http://dgp.cnpq.br/diretorioc/fontes/detalhegrupo.jsp?grupo=0082...>



Diretório dos Grupos de Pesquisa no Brasil



Grupo de Pesquisa Morfologia e Patologia Celular



Identificação

Recursos Humanos

Linhas de Pesquisa

Indicadores do Grupo

Identificação

Dados básicos

Nome do grupo: Morfologia e Patologia Celular

Status do grupo: certificado pela instituição

Ano de formação: 2007

Data do último envio: 26/06/2012 18:00

Líder(es) do grupo: Jose Fernando Marques Barcellos -

Área predominante: Ciências Biológicas; Morfologia

Instituição: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

órgão: Departamento de Morfologia

Unidade: Laboratório de Histologia

Endereço

Logradouro: Estrada do Contorno S/No. Mini Campus Bloco C02 Laboratório

Bairro: Aleixo

CEP: 69077000

Cidade: Manaus

UF: AM

Telefone: 81226666

Fax: 33054231

Home page:

Repercussões dos trabalhos do grupo

Trabalhos e Projetos voltados a Histologia, Patologia e ecologia animal e Humana

Recursos humanos

Pesquisadores

Jose Fernando Marques Barcellos - (líder)

Lígia Fernandes Abdalla

Lilian Regiani Merini

Lúcia de Paula

Maria Ines Braga de Oliveira

Maria Lúcia Góes de Araújo

Michella Bezerra Lima

Rogério Olmedija de Araujo

Rosana Pimentel Correia

Total: 9

Estudantes

Anderson da Paz Penha

Andrey Amorim de Lima

Asaphe Lemes Dutra

Carlos Klínger Rodrigues Serrão

Gabriela Piraice Gomes

Hugo Marlon de Castro Negreiros

Jaime Ribas Galvão Júnior

Luis Fernando Tupinambá da Silva

Luiz Otavio de Araujo Bastos

Marcelo Miguel Brito de Oliveira

Mariana Martins de Barros

Marianna Mariah de Freitas Noronha

Rafael Ferreira Wanderley

Regina Silva de Araujo

Samuel Nuno Pereira Lima

Wilma Camila Aparecida de Souza Pereira

Total: 16

Técnicos

Maiza da Conceição - Graduação - Histotecnologista

Total: 2

Grupo de pesquisa: Morfologia e Patologia Celular

<http://dgp.cnpq.br/diretorio/fontes/detalhegrupo.jsp?grupo=0082...>

Rosilene Campos - Ensino Profissional de nível técnico - Histotecnologista

Linhas de pesquisa**Total: 7**

- Anatomia e Histologia Animal
- BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO ANIMAL
- Complicações Terapia Transfusional no HUGV
- EPIDEMIOLOGIA E SAÚDE
- Histopatologia Placenta Humana
- Inflamação - Artrite Reumatóide
- Morfologia de Arraias de água doce

Empresas associadas ao grupo**Total: 0****Indicadores de recursos humanos do grupo**

	Integrantes do grupo	Total
Pesquisador(es)		9
Estudante(s)		16
Técnico(s)		2

Nomes grafados em vermelho: integrantes sem Currículo Lattes ou com inconsistências nos dados de identificação entre os formulários de Currículo e de Grupo de Pesquisa.

Fechar

ANEXO G: Certificado Comitê de Ética em Experimentação Animal do Projeto CNPq associado.



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

ANEXO H: Certificado Comitê de Ética em Experimentação Animal

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**, e o projeto de mestrado “Ação do gel de *Pouteria nuda* aplicado por fonoforese em artrite induzida por adjuvante em ratos Lewis”, sob responsabilidade de **JOSÉ FERNANDES MARQUES BARCELLOS**, estão 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

ANEXO I: Protocolo do Pedido de Patente

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

COMPROVANTE DE PROTOCOLIZAÇÃO

Comprovante: Abertura de Processo

Emissão: 27/06/2012

Número do Processo : 23105.007561/2012**Data de Abertura :** 27/06/2012**Hora :** 15:04:53**Tipo de Documento:** Ofício**Procedência :** 1.50.03.00.00.00.00.00 - Depto de Morfologia**Interessado :** 1.14.00.00.00.00.00.00 - Pró-Reitoria de Inovação Tecnológica**Assunto :** 1.0.0.00.00.0 :- Administração Geral**Resumo Assunto :** Pedido de patente. Interessado: Prof. Dr. José Fernando Marques Barcellos.**Destino Inicial :** Departamento de Gestão da Inovação, Propriedade Intelectual e Transferência TecnológicaUNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Pró-Reitoria de Inovação TecnológicaM^{te} do P. Socorro de Lima Verde Coelho
Diretora Dept. de Gestão de Propriedade Intelectual

Assinatura

28/06/2012

ANEXO J: Ofício PROTEC

PODER EXECUTIVO
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
LABORATÓRIO DE HISTOLOGIA I



Rio de Janeiro, 27 de junho de 2012.

CÓPIA

Ilma Sra Socorro de Lima Verde Coelho

Dir. do Dep. de Gestão da Inovação, PI e TT - DePI
Pró-reitoria de Inovação Tecnológica - PROTEC

Prezada diretora,

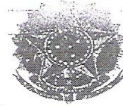
Venho por meio deste encaminhar pedido/ declaração de invenção tecnológica. O presente pedido diz respeito a um produto originário de dissertação de mestrado PPGIBA.

Desde já grato pela atenção e me coloco a disposição para qualquer esclarecimento.

Atenciosamente,


Prof. José Fernando Marques Barcellos, Dr.

ANEXO k: Formulário autorização INPA



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
 MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA - MCT
 INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
 DIVISÃO DE SUPORTE ÀS ESTAÇÕES E RESERVAS - DSER

Formulário de Autorização*

(* Apenas para funcionários do INPA)

Dados Pessoais		Informações Básicas	
Nome: ADRIAN MARTIN POHLIT		[] Visita/Aula [X] Coleta/Pesquisa [] Outros	
Profissão/Cargo: PESQUISADOR ADJUNTO		Período: 27 / 02 / 2004	
RG/CPF: V101711-3	Telefone(s) Contato: 643-3177	Permanência: [] Pernoite [X] Trânsito	
Endereço: RUA ATLÂNTICA 95, APTO. C BAIRRO: RAIZ MANAUS-AM		Período das atividades: [X] Matutino [X] Vespertino [] Noturno	
Origem		Objetivo	
Instituição: INPA		Unidade de Conservação: RESERVA DUCKE	
Setor: CPPN		Coletar amostras das espécies dos seguintes gêneros vegetais: <i>Aptandra</i> spp. (Olacaceae), <i>Lacmella</i> spp. (Apocynaceae), <i>Pleurisanthes</i> spp. (Icacinaceae), <i>Guattertops</i> spp. (Annonaceae), <i>Pinzona</i> spp. (Dilleniaceae) como parte das atividades de pesquisas para o doutorado em Biotecnologia / UFAM.	
Projeto: Plantas Antimalarias da Amazônia (CNPq)		Material da Coleta	
Relação de Acompanhantes (ou em anexo)		cascas, folhas, galhos, frutos e raízes (conforme a disponibilidade)	
Ana Lúcia Basílio Carneiro (Phd Biotecnologia/UFAM)			
Viviana Maria Araújo de Oliveira (Phd Biotecnologia/UFAM)			
Everaldo da Costa Pereira (mateiro)			
Observações			
O trabalho será efetuado na Reserva Ducke, com entrada pela manhã ou pela tarde, de acordo com a meteorologia (ausência de chuva).			

Autorizado em 27 / 02 / 2004.

De acordo,

Hugo Guimarães Mesquita

[Assinatura]

Ezio Sargentini Júnior
 Coordenador/Chefe

Ezio Sargentini Júnior
 Coordenador / CPPN
 PO. 286-2202

[Assinatura]
 Adrian Martin Pohlit
 Solicitante

[Assinatura]
 Adrian Martin Pohlit
 Responsável

Dr. Adrian M. Pohlit
 Pesquisador
 CRQ Nº 14100583

RECEBI EM 27/02/04

Walevisio Marques Gomes


ANEXOL: Declaração PROTEC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PRÓ-REITORIA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA - PROTEC
 Departamento de Gestão da Inovação, Propriedade Intelectual e
 Transferência de Tecnologia - DePI

**DECLARAÇÃO**

DECLARAMOS para os devidos fins que os pesquisadores/professores **José Fernando Marques Barcellos**, **Lilian Regiani Merini**, **Silvania da Conceição Furtado**, **Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes**, do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas – ICB/UFAM e **Ana Lúcia Basílio Carneiro** docente da **Universidade Federal da Paraíba – UFPB** deram entrada nesta **Pró-Reitoria de Inovação Tecnológica – PROTEC** na **Declaração de Invenção**, em 28/06/2012 para apreciação, análise e futura elaboração de relatório descritivo, para cumprimento do Pedido de patente. A pesquisa tem como título inicial de: **“Gel Aquoso de ...”**

Manaus, 28 de junho de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
 Pró-Reitoria de Inovação Tecnológica

Mª do P. Socorro de Lima Verde Coelho
 Diretora Dept. de Gestão de Propriedade Intelectual

Local: Prédio da Reitoria, 1º Andar, Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 3.000 –
 Coroado – Campus Universitário, Setor Norte – CEP: 69077- 000, Manaus-AM
Telefone: (92) 3305-1758 / (92) 9318-3195, **E-mail:** depi_protec@ufam.edu.br.
Site: www.protec.ufam.edu.br

ANEXO M: Certificado FeSBE

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

agradecimentos:



ANEXO N: Certificado MIEPEX

UFAM

Universidade Federal do Amazonas
Pró-Reitoria de Extensão e Interiorização

CERTIFICADO

*C*ertificamos que

**ANTONIO LUIZ BOECHAT, MAYARA S. VASCONCELOS, LILIAN
REGIANE MERINI, MARCELO MIGUEL BRITO DE OLIVEIRA, ANDREY
AMORIM DE LIMA E SILVANIA DA CONCEIÇÃO FURTADO**

Apresentaram o trabalho intitulado "Determinação das Condições Experimentais para um Modelo de Artrite Murina Induzida por Adjuvante", modalidade banner/pôster, na I Mostra Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão, realizada no período de 30 de Novembro a 02 de Dezembro de 2010, promovida pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e demais Instituições de Ensino Superior (IES) de Manaus/AM.

Manaus, 02 de Dezembro de 2010.

Luiz Furtado M. da R. Almeida
Pró-Reitor de Extensão e Interiorização

ANEXO O: Artigo original**ATENUAÇÃO DA ARTRITE INDUZIDA EM RATOS PELA FONOFORSE
COM GEL AQUOSO DA PLANTA AMAZÔNICA *Elaeoluma nuda*
(Sapotaceae).****ADJUVANT ARTHRITIS ATENUATION BY AMAZONIAN PLANT *Elaeoluma
nuda* L. (Sapotaceae) USING GEL PHONOPHORESIS**

Autores

Lilian Regiani Merini^{1,5,6}, Silvânia da Conceição Furtado^{2,5}, Marcelo Miguel Brito de Oliveira³, Antonio Luiz Boechat^{1,5}, Ana Lúcia Basílio Carneiro³, José Fernando Marques Barcellos^{1,2}

1. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas.
2. Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas.
3. Iniciação Científica, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas.
4. Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Brasil.
5. Grupo Amazônico para Estudo da Inflamação e Autoimunidade (GAIA)
6. Instituto de Saúde e Biotecnologia do Médio Solimões, Campus Coari, Universidade Federal do Amazonas, Brasil.

Autor Correspondente:

Lilian Regiani Merini, Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas.
Endereço: Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 3000 – Coroado, Manaus, Brasil.
CEP 69077-000. e-mail: lilianmerini@ufam.edu.br.

Keywords: *Elaeoluma nuda*, phonophoresis, Adjuvant Induced Arthritis

RESUMO

Relevância Etnofarmacológica. Diversas espécies do gênero *Pouteria* são usadas pela população nativa do Brasil por suas propriedades anti-inflamatórias, entre outras. As propriedades anti-inflamatórias do extrato da planta amazônica *Elaeoluma nuda* foi identificada recentemente em estudos de prospecção farmacológica.

Objetivos: O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato em gel aquoso de *E. nuda* por fonoforese em ratos.

Metodologia: Para os propósitos deste trabalho, foi induzida artrite por adjuvante em ratos Lewis. Após indução, foi administrado diariamente a fonoforese com gel de *E. nuda*, comparada ao gel de diclofenaco dietilomônio e com ultrassom terapêutico sem fonoforese. A artrite foi avaliada nos diferentes grupos por pletismometria. Foram quantificadas as citocinas pro-inflamatórias TNF- α e IL1- α através de CBA (*Cytometric Bead Array*). **Resultados:** o efeito da fonoforese com gel aquoso de *E. nuda* sobre a artrite da pata de ratos, foi equivalente à fonoforese com gel de diclofenaco dietilomônio quando comparados ao controle ($p=0.002$), com redução da artrite em 33%. O ultrassom terapêutico sem fonoforese não mostrou efeito significativo no 21º. dia de experimento. Houve redução significativa dos níveis de TNF- α e IL1- α no grupo tratado com fonoforese com gel de *E. nuda* ($p=0.0398$; $p=0.0278$, respectivamente).

Conclusão: Os resultados deste estudo demonstram o efeito anti-inflamatório da fonoforese com gel de *E. nuda* sobre a artrite induzida por adjuvante.

INTRODUÇÃO

Muitas espécies vegetais da América do Sul, sobretudo da Amazônia são estudadas com boa perspectiva para aplicação na saúde humana. No Brasil diversas espécies do gênero *Pouteria* são utilizadas por suas propriedades como desinfetante, purgativo, vermífugo, afrodisíaco, e disenteria (MONTENEGRO et al., 2006). O gênero *Pouteria* pertencente à família Sapoteceae possui aproximadamente 80 espécies. *Elaeoluma nuda* (Baehni) Aubrév, cujo basionímio conhecido é *Pouteria nuda* é uma Sapotaceae identificada na Reserva Adolfo Ducke, em Manaus, AM. Espécies do gênero *Pouteria* também foram investigadas quanto ao seu potencial antimalárico e antiretroviral (BEDOYA et al., 2008). Foi demonstrado por ensaios *in vitro* que a espécie *E. nuda* apresenta ação anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e hemolítica (CARNEIRO et al., 2008; MONTENEGRO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009).

A fonoforese é a aplicação tópica de substâncias ativas na camada externa da pele, com o auxílio do ultrassom terapêutico pulsado (MITRAGOTRI; KOST, 2004; TERAHARA et al., 2002). A aplicação de fonoforese de baixa frequência por ultrassom aumenta a concentração do princípio ativo no tecido tratado aumentando a permeabilidade da pele para moléculas de baixo e alto peso molecular (MITRAGOTRI; KOST, 2004). Esta propriedade parece especialmente significativa quando utilizada com baixas frequências de ultrassom (SILMAN; PEARSON, 2002). A fonoforese por ultrassom de baixa frequência também tem sido aplicada com sucesso associada com extratos vegetais, em modelos animais de inflamação (ALFREDO, 2008; ALFREDO et al., 2009; PEARSON; WOOD, 1964; RICOLDY et al., 2010).

A artrite induzida por adjuvante de Freund em ratos Lewis é um modelo de inflamação para investigação da patogenia da autoimunidade e avaliação de novas terapias (CARNEIRO et al., 2008; HEGEN et al., 2008; PEARSON, 1956; WHITEHOUSE, 2007). Considerando a importância etnofarmacológica do gênero *Pouteria* no Brasil, bem como o potencial farmacológico da espécie *Elaeoluma nuda* em pesquisas *in vitro*, este trabalho propõe-se analisar o efeito anti-inflamatório da fonoforese com gel de *E. nuda* sobre a artrite induzida por adjuvante de Freund.

METODOLOGIA

*Extrato aquoso de *Elaeoluma nuda**

O extrato aquoso utilizado neste estudo foi obtido a partir da planta amazônica *Elaeoluma nuda*, coletada na Reserva Florestal Adolpho Ducke (Estado do Amazonas, Brasil). A exsicata está depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) sob o n° 179316. O extrato foi obtido segundo método já padronizado (OLIVEIRA et al., 2009).

Preparação do Gel

O gel foi preparado no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) utilizando a seguinte composição: água desmineralizada 87,65%, nipagim 0,15%, propilenoglicol 4,00%, trietanolamina qsp pH 7,0, água deionizada 5% e extrato aquoso de *E. nuda* 2%, misturados até a completa dispersão. Em seguida foi adicionado lentamente carbopol 1,20%, pulverizando-o e deixando-o hidratar por 30 minutos. Seguiu-se com a mistura das substâncias sob aquecimento em temperatura -60°C. Adicionou-se trietanolamina qsp (pH 7,0), água desmineralizada 5% homogeneizando-se até atingir pH 7,0. Por fim adicionou-se o extrato aquoso liofilizado de *E. nuda* a 2% agitando-se até completa dispersão. A serragem total obtida das folhas foi 52,51g, a massa do extrato liofilizado rendeu 8,33g, obtendo-se um rendimento de 15,86%.

Animais

Foram utilizados 20 ratos Lewis machos, com 8 semanas de idade, mantidos no Biotério da Universidade Federal do Amazonas UFAM, pesando entre média +/- DP (250 e 350g), mantidos com água e ração *ad libitum*, e em condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro /escuro) e temperatura controlada a 22°C. O projeto foi submetido ao CEEA da UFAM e aprovado através do protocolo n° 001/2010 (CEEA) UFAM.

Para este experimento os animais foram divididos em 5 grupos: Grupo 1 – Controle negativo (sem indução e sem tratamento); Grupo 2 – Controle positivo (com indução e sem tratamento); Grupo 3 – Gel aquoso com indução e tratamento com UST; Grupo 4 – Fonoforese com gel de diclofenaco dietilômônio; Grupo 5 – Fonoforese com gel de *E. nuda* 2%.

Atividade Anti-Inflamatória sobre Artrite Induzida por Adjuvante Completo de Freund

A indução de artrite ocorreu no dia zero do experimento através de injeção de 0,1mL de adjuvante completo de Freud (Difco®) na base da cauda (PEARSON, 1956), sob efeito de anestesia inalatória com isoflurano. A partir do 15º dia de experimento, quando os sinais de artrite (edema e rubor) tornaram-se evidentes, foi iniciado o tratamento com fonoforese nos animais dos grupos 3, 4 e 5. A aplicação foi feita por um profissional habilitado, diariamente em ambas as patas traseiras. No 21º dia de experimento os animais foram sacrificados por deslocamento cervical sob efeito de anestesia (isoflurano), após realização de punção cardíaca para retirada de 5ml de sangue (WAYNFORTH; FLECKNELL, 1980).

O gel de *E. nuda* à 2% foi administrado por via transdérmica na região plantar das patas traseiras utilizando o equipamento Ultrassom Terapêutico (Sonocel Expert 1MHz com cabeçote reduzido, Bioset®, Brasil), mantendo movimentos circulares lentos, com os seguintes parâmetros: tempo de aplicação 1 minuto, frequência (f) de 1.0 MHz, e intensidade (i) de 0,5W/cm², ERA=0.8 cm² modo pulsado sendo uma sessão diária, no horário vespertino com número total de 10 sessões por animal. O gel de diclofenaco dietilomônio (Cataflan®, Novartis) foi aplicado igualmente por 10 sessões, seguindo-se o mesmo protocolo. Durante a aplicação do tratamento o animal foi levemente contido por um experimentador treinado, de forma a induzir o mínimo possível de estresse ao animal.

Avaliação do Edema de Pata

O edema das patas foi avaliado diariamente por observador treinado que não participou do planejamento do experimento (avaliação cega). O volume das patas traseiras foi medido nos dias 0, 7, 14, 21 de experimento através de pletismômetro digital (Insight®). O percentual de inibição de edema foi calculado através da fórmula: $1 - \frac{V_t}{V_c} \times 100$, onde V_t corresponde ao volume de uma pata tratada e V_c o volume da pata controle.

Quantificação de Citocinas TNF-α e IL1-α

A dosagem de citocinas TNF-α e IL1-α séricas foram realizadas por citometria de fluxo CBA (*Cytometric Bead Array*), usando-se os kits CBA flex rat® para TNF-α e IL1-α (BDBiosciences), seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante. Foi utilizado o Citômetro de Fluxo FACScalibur® (*Becton Dickinson*) para leitura das amostras. Para o cálculo das

concentrações e intensidade média de fluorescência de cada citocina foi utilizado o software *FCAP array*TM versão 1.0.1.

Perfil de Assinatura para Altos Produtores de Citocinas

A análise para assinatura de altos produtores de citocinas foi realizada tomando-se a mediana dos valores de MFI obtidos na citometria para cada uma das citocinas de toda a população, conforme método descrito anteriormente (BILLIAU; MATTHYS, 2001). Esses valores foram utilizados como ponto de *cut-off*, classificando-se cada animal em cada grupo como *baixo* ou *alto produtor* de citocinas.

Análise Estatística

Os valores do edema foram expressos como média e erro padrão, com intervalo de confiança 95%. Foi utilizada Análise de Variância (Anova One-Way) para comparação de médias do edema com Teste de Dunnett para análise pós-hoc. O Teste de Tendência Linear foi aplicado para analisar entre as médias de citocinas dos grupos se houve linha de tendência significativa (NAZIR et al., 2007). O nível de significância adotado foi de $p=0,05$, com poder estatístico de 80%. Na análise do perfil de assinatura para altos produtores, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a frequência de indivíduos altos produtores deslocava o grupo para um quartil distinto (intervalos de 25%), comparando-se com o valor de referência (BILLIAU; MATTHYS, 2001).

RESULTADOS

Efeito da Fonoforese com Gel de Elaeoluma nuda sobre Artrite por Adjuvante Completo de Freund

A avaliação por pletismometria na Tabela 1: ao final do 21º. dia de tratamento o volume ds patas dos animais tratados com UST com gel de *E. nuda* foi significativamente menor do que dos animais do grupo controle positivo e dos animais do grupo tratado apenas com gel aquoso. O tratamento com gel de diclofenaco produziu o mesmo efeito que a *E. nuda* sobre a redução dos volumes das patas.

Tabela 1 - Pletismometria das Patas no 21^o de experimento.

Grupo	Média	IC 95%
Controle Positivo	2.14 ± 0,390	1.51-2.75
UST com gel Aquoso	1.80 ± 0,350	1.25-2.31
UST com gel Diclofenaco	1.35 ± 0,058	1.25-1.44
UST com gel <i>E. nuda</i>	1.35± 0,060	1.26-1.45

ANOVA one-way, diferença com p<0.05.

O grupo tratado com ultrassom não apresentou melhora no edema em relação ao controle positivo até o 21º, com atenuação de artrite de apenas 2% indicando que este tratamento não foi efetivo neste período de experimento. Os grupos tratados com fonoforese com gel de diclofenaco e gel de *E. nuda*, produziram atenuação da artrite em 33% e 34%, respectivamente (Figura 3).

Quantificação de TNF-α e IL1-α

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da quantificação de citocinas TNF-α e IL1-α. Os níveis séricos de TNF-α foram significativamente menores nos animais tratados com *E. nuda* em relação a todos os demais grupos. Foram observados menores níveis séricos de IL1-α nos animais tratados com *E. nuda* em relação aos outros grupos. Vide tabela abaixo.

Tabela 2 - Quantificação das Citocinas TNFα e IL-1α no 21^o de Experimento.

Grupo	TNFα (pg/mL)		IL-1α(pg/mL)	
	Média	IC 95%	Média	IC 95%
Controle Positivo	11,25 ± 1,25	9,33-13,17	17,92± 2,24	14,36-21,48
UST Gel Aquoso	11,44 ± 1,10	7,89-12,51	14,82±2,18	12,53-17,10
UST Gel Diclofenaco	10,20± 2,20	9,69-13,18	15,76±2,78	12,31-19,21
UST Gel <i>E.nuda</i>	7,32 ± 3,10	3,47- 11,18	13,18±1,60	11,50-14,86

ANOVA one-way, diferença significativa com p<0.05.

DISCUSSÃO

O presente trabalho é o primeiro estudo demonstrando a ação anti-inflamatória da espécie *Elaeoluma nuda in vivo*. Entretanto, anteriormente, a avaliação fitoquímica de espécies do gênero *Pouteria* revelou a presença de compostos bioativos de alto interesse farmacológico como terpenoides, flavonoides e saponinas (SILVA et al., 2009). Screening fitoquímico preliminar revelou que extratos de *E. nuda* contém fenóis, flavonóides, taninos, saponinas (OLIVEIRA et al., 2009), alcalóides e antronas (Carneiro, A. L. B., dados não publicados). Também foi observado, que em células tumorais (linhagens MDA-MB435, HCT-8, SF295, HL60), o extrato de *Elaeoluma nuda* foi capaz de inibir o crescimento destas células tumorais (CARNEIRO et al., 2008).

No presente estudo o tratamento por fonoforese com gel de *Elaeoluma nuda* apresentou eficácia superior à fonoforese com gel de diclofenaco, um agente anti-inflamatório amplamente usado. Estes resultados demonstram que, assim como outras espécies do gênero *Elaeoluma*, a espécie *E. nuda* também apresenta atividade anti-inflamatória em modelo de inflamação. Tratamentos eficazes em modelos de artrite induzida por adjuvantes, apresentam alto valor preditivo para uso em humanos (HEGEN et al., 2008). Nesse sentido, deve-se destacar o efeito atenuador apresentado pelo gel de *Elaeoluma nuda* associado à fonoforese sobre artrite por adjuvante como uma perspectiva de tratamento. Até o presente, nenhum composto bioativo do extrato de *Elaeoluma nuda* foi identificado como responsável por essas atividades.

Diferenças nos níveis basais de citocinas séricas em nível individual representam um importante ponto a ser considerado. Assim, a análise categórica de *baixos* ou *altos* produtores de citocinas entre os animais representa uma boa estratégia para analisar o efeito dos tratamentos. Isto porque minimiza o impacto dos valores individuais tornando os dados mais homogêneos (BILLIAU; MATTHYS, 2001). Através desta estratégia é possível observar o número de animais com perfil alto produtor de TNF- α e IL1- α em cada grupo, permitindo a comparação direta entre os grupos.

O perfil da assinatura de altos produtores de citocinas do grupo tratado com fonoforese com gel de *E. nuda* foi semelhante ao controle negativo, com menor número de altos produtores entre os grupos em que houve indução de artrite (Figuras 5 e 6). O grupo tratado apenas com US e gel aquoso apresentou perfil de altos produtores semelhantes ao controle positivo.

O Fator de necrose tumoral (TNF- α) e a Interleucina-1 α (IL1- α) são citocinas pleiotrópicas que exercem papel-chave na imunopatogenia da artrite induzida por adjuvante, assim como na artrite reumatoide (BEVAART et al., 2010; LOO et al., 1995). A principal fonte de TNF- α e IL1- α são células dendríticas, macrófagos ativados, células T e células NK e, quando secretado, promove ativação endotelial, ativação celular e indução de proteínas da fase aguda, configurando-se como citocinas pro-inflamatórias (IMBODEN, 2009). A fonoforese com gel de *E. nuda* foi capaz de reduzir os níveis séricos destas citocinas, assim como o número de animais com perfil alto produtor, com importante efeito atenuador sobre o edema da pata dos ratos.

A inibição de TNF- α e IL1- β é capaz de promover diversos efeitos importantes como: reduzir a expressão de moléculas do MHC, reduzir a produção de prostaglandinas, reduzir a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, a ativação de condrócitos e osteoclastos, assim como reduzir a angiogênese (SHIMIZU et al., 2003). Esses achados sugerem que o efeito anti-inflamatório da fonoforese com gel de *E. nuda* acontece, sobretudo, por sua ação ainda não caracterizada sobre as células produtoras destas citocinas.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstram que a fonoforese com gel de *E. nuda* 2%, apresenta efeito atenuador sobre a artrite induzida por adjuvante em ratos Lewis. O ultrassom sem uso de fonoforese com agentes farmacológicos não foi eficaz de produzir efeito atenuador sobre a artrite induzida por adjuvante completo de Freund. Estes resultados sugerem que componentes do gel de *Elaeoluma nuda* tenham um papel anti-inflamatório quando usados para tratamento tópico.

REFERÊNCIAS

- Alfredo, P.P., 2008. Qualitative analysis of effects of phonophoresis with *Arnica montana* onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles. *Fisioter Pesq*, 273-279.
- Alfredo, P.P., Anaruma, C.A., Pião, A., João, S., Casarotto, R.A., 2009. Effects of phonophoresis with *Arnica montana* onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles: An experimental study. *Ultrasonics* 49, 466-471.
- Altman, D.G., 1991. *Practical statistics for medical research*. Chapman & Hall.
- Bedoya, L.M., Álvarez, A., Bermejo, M., González, N., Beltrán, M., Sánchez-Palomino, S., Cruz, S.M., Gaitán, I., del Olmo, E., Escarcena, R., 2008. Guatemalan plants extracts as virucides against HIV-1 infection. *Phytomedicine* 15, 520-524.
- Bevaart, L., Vervoordeldonk, M.J., Tak, P.P., 2010. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? *Arthritis & Rheumatism* 62, 2192-2205.
- Carneiro, A.L.B., Teixeira, M.F.S., Oliveira, V.M.A., Fernandes, O.C.C., Cauper, G.S.B., Pohlit, A.M., 2008. Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103, 31-38.
- Firestein, G.S., 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423, 356-361.
- Hegen, M., Keith Jr, J.C., Collins, M., Nickerson-Nutter, C.L., 2008. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 67, 1505-1515.
- Imboden, J.B., 2009. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annual Review of Pathological Mechanical Disease* 4, 417-434.
- Isomäki, P., 2012. Cytokines in Rheumatoid Arthritis, in: Martin, C.R., Preedy, V.R. (Eds.), *Scientific Basis of Healthcare: Arthritis*. Science Publishers, British Channel Islands, p. 49.
- Maia-Filho, A.L.M., Silva, V.S., Barros, T.L., Costa, C.L.S., Maia, E.P.V.D., Araújo, K.S., Santos, I.M.S.P., Villaverde, A.G.J.B., Carvalho, F.A.S., Carvalho, R.A., 2011. Efeito do gel da babosa (*Aloe barbadensis* Mill.) associado ao ultrassom em processo inflamatório agudo. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 13, 146-150.
- Mitragotri, S., Kost, J., 2004. Low-frequency sonophoresis: a review. *Advanced drug delivery reviews* 56, 589-601.
- Montenegro, L.H.M., Oliveira, P.E.S., Conserva, L.M., Rocha, E.M.M., Brito, A.C., Araújo, R.M., Trevisan, M.T.S., Lemos, R.P.L., 2006. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). *Rev Bras Farmacogn* 16.
- Mutoh, M., Ueda, H., Nakamura, Y., Hirayama, K., Atobe, M., Kobayashi, D., Morimoto, Y., 2003. Characterization of transdermal solute transport induced by low-frequency ultrasound in the hairless rat skin. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 92, 137-146.
- Oliveira, V.M.A., Carneiro, A.L.B., Cauper, G.S.B., Pohlit, A.M., 2009. In vitro screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. *Acta Amazonica* 39, 973-980.
- Pearson, C.M., 1956. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Royal Society of Medicine*, pp. 95-101.

- Ricoldy, D.S., Botura, A.C.A., Oda, J.Y., Takemura, O.S., 2010. Efeito do ultrassom associado ao gel de calêndula sobre a atividade reparadora em lesões musculares experimentais. *Acta Scientiarum. Health Science* 32, 135-140.
- Silva, C.A.M., Simeoni, L.A., Silveira, D., 2009. Genus *Pouteria*: chemistry and biological activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19, 501-509.
- Terahara, T., Mitragotri, S., Kost, J., Langer, R., 2002. Dependence of low-frequency sonophoresis on ultrasound parameters; distance of the horn and intensity. *International journal of pharmaceutics* 235, 35-42.
- Waynforth, H.B., Flecknell, P.A., 1980. *Experimental and surgical technique in the rat*. Academic Press London.
- Whitehouse, M., 2007. 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* 56, 133-138.
- Zarife, M.A., Reis, E.A., Meira, G.C., Carmo, T.M., Lopes, G.B., Malafaia, E.C., Silva, H.R., Santana, N., Martins-Filho, O.A., Reis, M.G., 2011. IL-8 is associated with non-viremic state and IFN-gamma with biochemical activity in HCV-seropositive blood donors. *Intervirology* 54, 87-96.

APÊNDICE DO ARTIGO

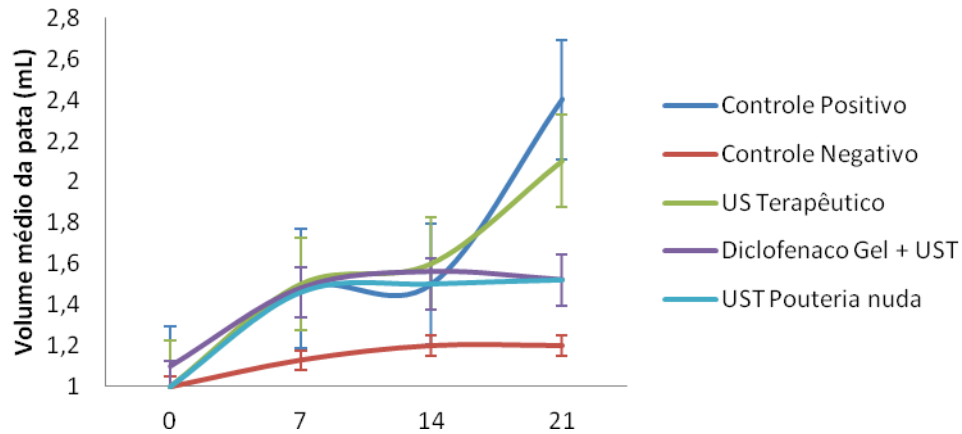


Figura 1. Cinética de Artrite para os diferentes Grupos de Experimento. Os resultados são expressos como volume médio das patas (mL) e erro padrão (SEM).

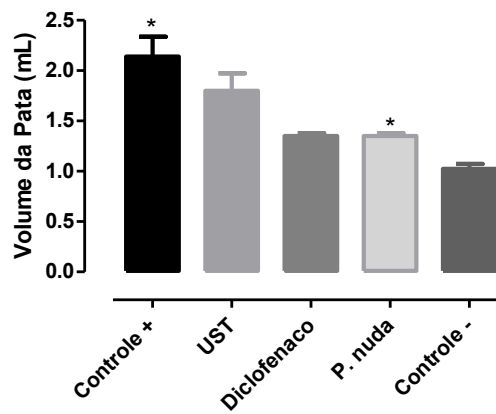


Figura 2. Pletismometria para os diferentes Grupos no 21º dia de experimento. Os resultados são expressos como volume médio das patas (mL) e erro padrão (SEM).

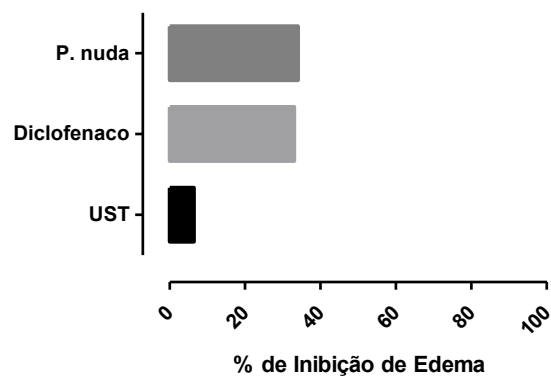


Figura 3. Percentual de inibição de edema em relação ao controle positivo no 21º dia de experimento.

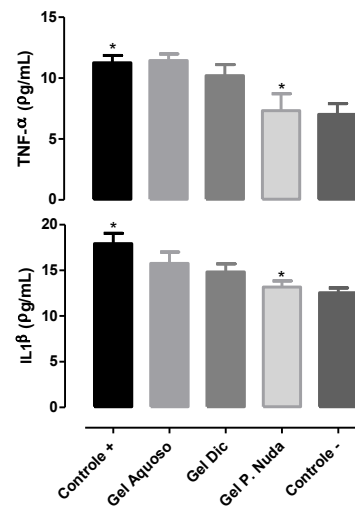
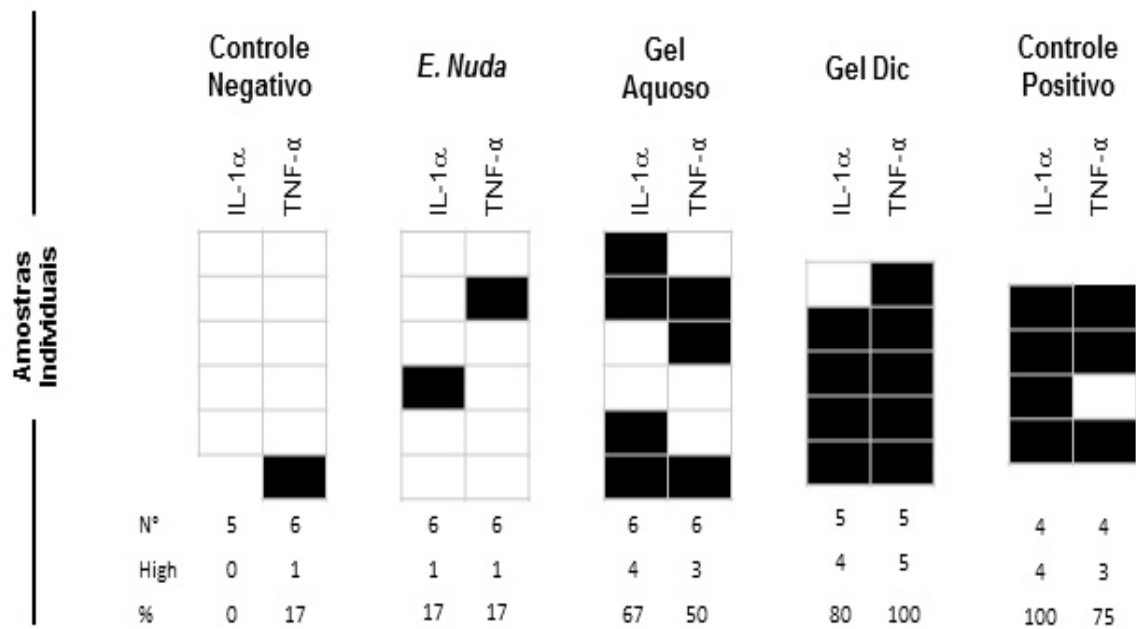


Figura 4. Quantificação de Citocinas TNF- α e IL1 α

Figura 5. Assinatura Individual de Citocinas para Altos Produtores



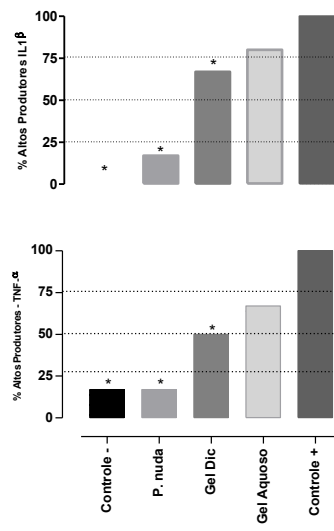


Figura 6. Assinatura de Altos Produtores de Citocinas