

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Odontologia

Timilly Mayra Martins da Cruz

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E
ANTIEDEMATOGÊNICO DO GEL OXYFLOWER® EM MODELO DE
EDEMA DE PATA INDUZIDO POR ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND
EM RATOS**

Diamantina

2017

Timilly Mayra Martins da Cruz

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E
ANTIEDEMATOGÊNICO DO GEL OXYFLOWER® EM MODELO DE
EDEMA DE PATA INDUZIDO POR ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND
EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre

Área de concentração: Clínica Odontológica

Linha de pesquisa: Lesões inflamatórias, císticas e neoplásicas da cavidade bucal

Orientadora: Profa. Dra. Cintia Tereza Pimenta de Araújo

Coorientadores: Prof. Dr. Wagner de Fátima Pereira e Profa. Dra. Patrícia Furtado Gonçalves

Diamantina

2017

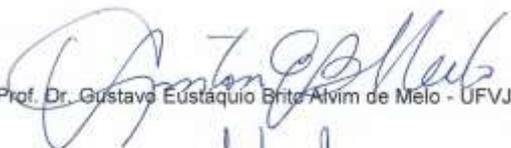
TIMILLY MAYRA MARTINS DA CRUZ

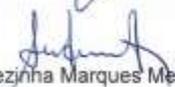
**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIEDEMATOGÊNICO DO GEL
OXYFLOWER® EM MODELO DE EDEMA DE PATA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao
PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA - STRICTO
SENSU, nível de MESTRADO,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de
MAGISTER SCIENTIAE EM
ODONTOLOGIA.

Orientadora: Profa. Dra. Cíntia
Tereza Pimenta de Araújo

Data da aprovação: 28/07/2017


Prof. Dr. Gustavo Eustáquio Brito Avim de Melo - UFVJM


Profa. Dra. Ana Terezinha Marques Mesquita - UFVJM


Profa. Dra. Cíntia Tereza Pimenta de Araújo - UFVJM

DIAMANTINA

Ficha Catalográfica - Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Jullyele Hubner Costa CRB-6/2972

C957a Cruz, Timilly Mayra Martins da.
2017 Avaliação dos efeitos anti-inflamatório e antiedematogênico do gel Oxyflower® em modelo de edema de pata induzido por adjuvante completo de Freund em ratos / Timilly Mayra Martins da Cruz. – Diamantina, 2017.
81 p.

Orientadora: Cintia Tereza Pimenta de Araújo
Coorientador: Wagner de Fátima Pereira

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia) –Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Essências florais. 2. Edema de pata. 3. Ratos. 4. Adjuvante Completo de Freund. 5. Termografia. I. Araújo, Cintia Tereza Pimenta de. II. Pereira, Wagner de Fátima. III. Título.

CDD 617.634

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

**Aos meus amados pais, Wilson e Mirlene, ao meu irmão, Juninho, ao Vitor, à
minha família e amigos amados: Dedico.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e à minha mãezinha Nossa Senhora Aparecida por terem guardado a mim e aos que amo todos os dias.

Aos meus pais, Wilson e Mirlene, por sempre acreditarem em mim, em meu potencial e principalmente nos meus sonhos. Obrigada por cada palavra de apoio, amor incondicional, cada ligação e preocupação. Vencemos mais uma etapa!

Ao meu irmão, Juninho, agradeço todas as risadas e companheirismo. Sempre juntos!

Aos meus avós Nonô e Romancina, minha eterna gratidão.

A todos da minha família, que compreenderam minha ausência e me enviaram palavras de amor, alegria e orações poderosas.

Ao meu namorado Vitor e à sua família. Obrigada pelo apoio, amor e por viver de perto toda minha trajetória, sempre me apoiando e me dando forças.

A todos meus amigos, que sempre torceram por mim e estão comigo dentro do meu coração.

Aos meus eternos Mestres e amigos da Odontologia, que me ajudaram a me apaixonar pela profissão e agora pela docência.

Ao meu eterno orientador, Professor Wagner, que tanto se dedicou e dedica a este projeto. Não tenho palavras para agradecer todo o carinho, paciência e alegria. Peço permissão para me espelhar em sua conduta e em sua paixão pela pesquisa e docência.

A minha orientadora Professora Cintia Pimenta, a qual me acolheu com tanto carinho. Agradeço sua atenção materna, as dicas e por sempre estar disposta a escutar meus desabafos.

A minha coorientadora Professora Patrícia Furtado, meu exemplo de carreira e conduta. Espero um dia chegar perto do que você representa para mim.

A minha amiga: Agnes Meireles, essencial não somente para o desenvolvimento desta pesquisa, mas para a minha vida. Obrigada por dividir seu tempo entre mim e Laurinha e por sempre ser tão solícita (em qualquer assunto).

Às minhas meninas: Lilian Pereira, Izabela Brandão e Alessandra Souza. Obrigada por sempre deixarem as coisas mais leves, pelas risadas e alegria em pesquisar (mesmo nos sábados, domingos e feriados). Sem vocês nada disso teria se realizado!

Aos amigos, professores e funcionários do CIPq- Saúde, agradeço todos os sorrisos e a disposição em sempre ajudar!

Ao PPGOdonto, aos Professores, colegas de sala e à Gislene. Obrigada pela oportunidade de estar com vocês neste caminho.

Aos meus alunos, sempre tão carinhosos, agradeço pela confiança e por aumentar ainda mais meu amor pela docência.

Aos meus ratinhos, por terem nos ajudado a concretizar este estudo.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho.

Por fim, agradeço a UFVJM, meu berço diamante e à CAPES, pela concessão da bolsa.

EPÍGRAFE

“Homenageia, sim, os que te acenam dos pedestais que conquistaram, merecidamente, à custa de inteligência e trabalho; contudo, reverencia também aqueles que talvez nada te falem e que muito fizeram e ainda fazem por ti, muitas vezes ao preço de sacrifícios pungentes”

Anjos desconhecidos (capítulo 76). Por Emmanuel e Chico Xavier

RESUMO

Introdução: A inflamação é um mecanismo de defesa primária que protege o organismo de estímulos nocivos ou prejudiciais. Os medicamentos anti-inflamatórios tais como os Anti-Inflamatórios Não Esteroidais (AINEs) e os corticosteróides são utilizados para tratar os distúrbios inflamatórios, porém, diversos efeitos colaterais têm sido relatados. Neste contexto, produtos naturais têm contribuído bastante para o desenvolvimento de terapias farmacológicas modernas e eficazes. Alguns medicamentos naturais apresentam grande potencial terapêutico, como por exemplo, o Oxyflower®. Este remédio baseia-se na ação de essências florais, porém seus efeitos biológicos ainda não foram devidamente investigados. **Objetivos:** Investigar os possíveis efeitos anti-inflamatório e antiedematogênico do gel Oxyflower® em modelo animal de inflamação crônica. **Metodologia:** 25 ratos machos da linhagem *Holtzman* foram aleatoriamente divididos em 5 grupos experimentais (controle, veículo do Oxyflower®, Oxyflower®, triancinolona acetona e diclofenaco dietilamônio). A inflamação foi quimicamente induzida por meio da injeção de 200 µL de Adjuvante Completo de Freund (ACF) na pata traseira direita dos ratos. O volume e espessura das patas dos ratos foram mensurados com pletismômetro de pata e paquímetro digital, respectivamente. Durante 14 dias, os animais foram tratados com os fármacos e tiveram acompanhamento de sua massa corporal. Neste período a temperatura das patas traseiras foram avaliadas com um termógrafo digital. Foram realizadas análises histológicas e leucometria. Os dados foram analisados como média ± erro padrão ou desvio padrão da média e apresentados como a variação (delta) do volume, espessura e temperatura das patas traseiras. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelos testes de variância ANOVA (*two* e *one-way*), seguidos do *post hoc* de Tukey e teste Qui-Quadrado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. **Resultados:** O gel Oxyflower® promoveu reduções no volume, espessura e temperatura das patas dos ratos, injetados com ACF, quando comparados aos animais do grupo controle. Não houve diferença em relação ao ganho de massa corporal nos diferentes grupos experimentais. Os resultados para leucometria e histologia não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. **Conclusão:** O gel Oxyflower® apresentou atividade antiedematogênica semelhante à Triancinolona e ao Diclofenaco. A termografia infravermelha é um método aplicável na avaliação da temperatura tecidual associada ao edema, neste modelo experimental.

Palavras chave: Essências florais; Edema de pata; Ratos; Adjuvante Completo de Freund; Termografia

ABSTRACT

Introduction: Inflammation is a primary defense mechanism that protects the body from harmful or harmful stimuli. Anti-inflammatory drugs such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and corticosteroids are used to treat inflammatory disorders, but several side effects have been reported. Thus, natural products have contributed greatly to the development of modern and effective pharmacological therapies. Some natural medicines have great therapeutic potential, such as Oxyflower®. This drug is based on the action of flower essences, but its biological effects have not yet been properly investigated. **Objectives:** To investigate the possible anti-inflammatory and anti-infective effects of Oxyflower® gel in an animal model of chronic inflammation. **Methods:** 25 male rats of the *Holtzman* strain were randomly divided into 5 experimental groups (control, Oxyflower® vehicle, Oxyflower®, triamcinolone acetone and diclofenac diethylammonium). Inflammation was chemically induced by injecting 200 µL of Complete Freund's Adjuvant (CFA) into the right hind paw of rats. The volume and thickness of the paws of the rats were measured with a paw plethysmometer and digital caliper, respectively. During 14 days, the animals were treated with the drugs and had monitoring of their body mass. In this period the temperature of the hind legs were evaluated with a digital thermograph. Histological analysis and leukometry were performed. Data were analyzed as mean ± standard error or standard deviation of the mean and presented as the variation (delta) of the volume, thickness and temperature. The differences between the groups were analyzed by ANOVA (two and one-way) variance tests, followed by Tukey post hoc and Chi-Square test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. **Results:** The Oxyflower® gel promoted reductions in the volume, thickness and temperature of the legs of the rats injected with ACF when compared to the animals of the control group. There was no difference in relation to body mass gain in the different experimental groups. The results for leukometry and histology did not show significant differences between the groups. **Conclusion:** Oxyflower® gel presented anti-edematogenic activity similar to Triamcinolone and Diclofenac. Infrared thermography is an applicable method for evaluation of tissue temperature associated with edema, in this experimental model. Infrared thermography is an applicable method for assessing tissue temperature associated with edema in this experimental model. The anti-inflammatory effect of Oxyflower® gel could not be confirmed. However, biomolecular, immunological and immunohistochemical analyzes may help confirm the possible anti-inflammatory effect of Oxyflower® gel.

Key words: Flower essences; Paw edema; Rats; Complete Freund's Adjuvant; Thermography

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E GRÁFICOS

Figura 1 – Eventos temporais coordenados da inflamação aguda	25
Figura 2 – Imagem demonstrativa do local de aferição da espessura das patas traseiras dos ratos, com o paquímetro digital	41
Figura 3 – Imagem demonstrativa da utilização do pletismômetro de pata para aferição do volume das patas traseiras dos ratos	42
Figura 4 – Imagem demonstrativa da utilização do termógrafo digital para aferição da temperatura das patas traseiras dos ratos	44
Figura 5 – Registros termográficos adquiridos com termógrafo portátil	45
Figura 7 – Desenho esquemático das regiões da lâmina de esfregaço sanguíneo	47
Gráfico 1 – Representação gráfica da variação do volume (Delta volume) das patas dos ratos, para cada grupo experimental. Diferenças significativas ($p < 0,05$), entre todos os grupos ^(a) ou apenas os grupos veículo, triancinolona e diclofenaco ^(b) comparados ao grupo controle. ANOVA <i>two-way</i> e <i>post hoc</i> de Tukey.....	50
Gráfico 2 – Representação gráfica da variação da espessura (Delta espessura) das patas dos ratos, para cada grupo experimental. Diferenças significativas entre o grupo controle ^(a) ou entre todos os grupos ^(b) comparados ao grupo controle. ANOVA <i>two-way</i> e <i>post hoc</i> de Tukey	51
Gráfico 3 – Representação gráfica da variação da temperatura (Delta temperatura) das patas de ratos, para cada grupo experimental. Diferenças significativas entre todos os grupos ^(a) ; grupos controle e veículo ^(b) ; grupos controle, Oxyflower e triancinolona ^(c) e entre controle e Oxyflower ^(d) comparados ao grupo controle. ANOVA <i>two-way</i> e <i>post hoc</i> de Tukey	52
Gráfico 4 – Distribuição das médias das massas corporais de ratos com edema de pata induzido pelo ACF	53
Gráfico 5 – Leucometria Global de ratos com edema de pata induzido pelo ACF	54

Gráfico 6 – Leucometria Diferencial de ratos com edema de pata induzido pelo ACF **55**

Figura 8 – Representação Histológica da presença de infiltrado inflamatório nas patas de ratos após 28 dias de indução do edema com ACF **57**

Figura 9 – Aparência histológica da presença de tecido necrótico (N), margeado por neutrófilos (A), macrófagos espumosos (ME) e formação de granuloma (G) nas patas de ratos com edemas induzidos pelo ACF (B) **58**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Material permanente e de consumo	35
Tabela 2 – Caracterização dos Grupos Experimentais de acordo com os fármacos utilizados	38
Tabela 3 – Caracterização dos tempos experimentais	39
Tabela 4 – Caracterização das suspensões/emulsões injetadas nas patas dos ratos	40
Tabela 5 – Leucometria Diferencial dos ratos com edema de pata induzido pelo ACF	56
Tabela 6 – Análise qualitativa da presença de infiltrado inflamatório nas patas dos animais injetados com ACF	57

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Δ – Delta

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

ACF – Adjuvante Completo de Freund

AIE – Anti-Inflamatório Esteroidal

AINE – Anti-Inflamatório Não Esteroidal

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APC – Célula Apresentadora de Antígeno

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CIPq – Centro Integrado de Pesquisa e Pós-Graduação em Saúde

COX – Ciclooxigenase

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

HE – Hematoxilina-Eosina

IL – Interleucina

IN – Instrução Normativa

IFN γ – Interferon gama

iNOS – Óxido Nítrico Sintase induzível

LABIMUNO – Laboratório de Imunologia

LCD – *Liquid Crystal Display*

LEB – Laboratório de Ensaio Biológicos

LOX – Lipooxigenase

LT – Leucotrieno

m/v – Massa/volume

mg/Kg – Miligrama/quilograma

mg/mL – Miligrama/mililitro

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mm³ – Milímetro cúbico

MMP – Metaloproteinase de Matriz

MPO - Mieloperoxidase

NO – Óxido Nítrico

NOS – Óxido Nítrico Sintase

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAF – Fator Ativador de Plaquetas

PG – Prostaglandina

PLA – Fosfolipase A

PMN – Neutrófilos Polimorfonucleares

RDC – Regime Diferenciado de Contratação

SNC – Sistema Nervoso Central

Th1 – Linfócitos T *Helper* 1

TNF α – Fator de Necrose Tumoral alfa

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFVJM – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

v/v – % Volume/Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 A inflamação: Aspectos gerais	21
3.1.1 A inflamação aguda	24
3.1.2 A inflamação crônica	26
3.2 Farmacoterapia da inflamação	27
3.2.1 Fármacos Anti-Inflamatórios Não Esteroidais (AINEs)	27
3.2.2 Fármacos Anti-Inflamatórios Esteroidais (AIEs)	28
3.2.3 A terapia e os remédios florais floral	29
3.2.3.1 O gel <i>Oxyflower</i>®	30
3.3 Modelos experimentais de inflamação	31
3.3.1 Modelo de inflamação induzida por injeção de Adjuvante Completo de Freund (ACF)	31
3.4 Termografia infravermelha	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Tipo de estudo	36
4.2 Material utilizado	36
4.3 Fármacos utilizados	37
4.4 Preparações	37
4.5 Considerações éticas	38
4.6 Animais	38

4.7	Caracterização dos grupos experimentais	39
4.8	Caracterização dos tempos experimentais	39
4.9	Indução da inflamação	40
4.10	Avaliação da espessura e do volume das patas traseiras dos animais	41
4.11	Tomadas termográficas	44
4.12	Eutanásia e finalização humanitária	46
4.13	Análises leucocitárias	46
4.13.1	Realização dos leucogramas	47
4.13.1.1	<i>Leucometria Global</i>	47
4.13.1.2	<i>Leucometria Diferencial</i>	47
4.14	Processamento e análises histológicas	48
4.15	Análise estatística	49
5	RESULTADOS	51
5.1	Variação do volume das patas traseiras para cada grupo experimental	51
5.2	Variação da espessura das patas traseiras para cada grupo experimental	51
5.3	Alterações termográficas	53
5.4	Variação da massa corporal dos animais	54
5.5	Análise dos leucócitos circulantes	55
5.5.1	Leucometria Global	55
5.5.2	Leucometria Diferencial	56
5.6	Análises histológicas	57
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÃO	69
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
9	ANEXO	81

1 INTRODUÇÃO

A resposta inflamatória consiste em um importante evento das imunidades inata e adaptativa e, nos quais células e mediadores colaboram para neutralizar e eliminar o estímulo prejudicial, permitindo assim, a manutenção da homeostase e possibilidade do início do processo de cicatrização (DHINGRA, 2015; MEDZHITOV, 2010). Acredita-se que a inflamação seja uma resposta fisiológica, que, em última instância, visa restaurar a arquitetura e a função tecidual. Nessa circunstância, a resposta inflamatória inicial protege o indivíduo e é considerada auto-limitante, progredindo para a completa resolução da situação (SOUZA *et al.*, 2013).

Tipicamente, a inflamação é caracterizada por sinais como vermelhidão, calor, inchaço, dor e perda funcional. A vermelhidão (hiperemia) / calor e o inchaço ocorrem devido ao aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, respectivamente. A dor é provocada pela sensibilização dos nervos aferentes primários, enquanto que a perda de função é, provavelmente, consequência do somatório de vários fatores, especialmente do edema e da dor (MONTENEGRO *et al.*, 2006; LEVINE, 1999).

A inflamação costuma ser dividida em três fases: a inflamação aguda, a resposta imune e a inflamação crônica. A inflamação aguda refere-se à resposta inicial à lesão tecidual; é mediada pela liberação de autacóides e, em geral, precede o desenvolvimento da resposta imune. Ocorre resposta imune quando as células imunologicamente competentes são ativadas em resposta a organismos estranhos ou substâncias antigênicas liberadas durante a resposta inflamatória aguda ou crônica. O resultado da resposta imune pode ser benéfico para o hospedeiro, quando faz com que os microorganismos invasores sejam fagocitados ou neutralizados. Por outro lado, o resultado pode ser deletério se resultar em inflamação crônica sem regressão do processo subjacente. A inflamação crônica envolve a liberação de diversos mediadores que não são proeminentes na resposta aguda (KATZUNG, 2003).

A lesão celular associada à inflamação atua sobre as membranas celulares, provocando a liberação de enzimas lisossomais pelos leucócitos; a seguir, ocorre liberação de ácido araquidônico a partir de compostos precursores, e são sintetizados vários eicosanóides, como as prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos entre outros (KATZUNG, 2003)

Modelos experimentais de inflamação, com o uso de animais, têm sido utilizados para avaliar a produção de mediadores inflamatórios locais, o processamento da nocicepção em sítios do Sistema Nervoso Central (SNC), além das propriedades anti-inflamatórias e a eficácia analgésica de alguns fármacos (MACCARSON, 2015). O modelo de inflamação induzida por Adjuvante Completo de Freund (ACF) é um dos mais utilizados em pesquisa. O Adjuvante Completo de Freund é preparado a partir de óleos não metabolizáveis, como por exemplo o óleo de parafina e contém cepas de *Mycobacterium tuberculosis* inativas. Desenvolvido pela primeira vez por Jules Freund, na década de 1940. O ACF promove a liberação lenta de antígenos, necessários para estimular uma forte e persistente resposta inflamatória (FREUND, 1956; FREUND, 1947; FREUND & McDERMOTT, 1942).

A resposta inflamatória é caracterizada por aumentos na permeabilidade dos vasos sanguíneos, o que resulta em aumento do fluxo sanguíneo tecidual, o que altera o padrão de calor. A temperatura das extremidades e da pele depende em grande parte da taxa subjacente de circulação e do metabolismo tecidual (BERRY *et al.*, 2003). Neste contexto, a termografia infravermelha é caracterizada por ser um método não invasivo, por meio do qual é possível acompanhar várias lesões inflamatórias, que podem evoluir para doenças crônicas como a periodontite, o abscesso lingual, tumores mistos das glândulas salivares ou a sinusite maxilar crônica (DOBRZYNSKI *et al.*, 2009). O uso do termógrafo vem sendo utilizado também para auxiliar no exame de outras doenças, como por exemplo, câncer do colo do útero, câncer oral, câncer de mama e artrite (EYK, 2009; BOAS, 2006; KIM, LEE & JEONG, 2004; HAYASE *et al.*, 1992; OBLINGER, ENGEL & FRANKE, 1985).

Os medicamentos anti-inflamatórios tais como os Anti-Inflamatórios Não Esteroidais (AINEs) e os corticosteróides são utilizados para reduzir os distúrbios inflamatórios originalmente em seu mecanismo de ativação. No entanto, podem apresentar sérios efeitos adversos, como impactos gastrointestinais e imunossupressão, respectivamente (DAR *et al.*, 2016). Grande número de compostos anti-inflamatórios com propriedades estruturais diversas foram isolados, principalmente de plantas e atuam em múltiplos alvos nas vias inflamatórias. Os produtos naturais fornecem uma rica fonte para a descoberta de novas terapias, o que levou ao desenvolvimento de várias das drogas mais utilizadas no mundo, como por exemplo o ácido salicílico, um precursor da aspirina, derivado da casca de salgueiro (*Salix* spp.); a reserpina, uma droga antipsicótica e anti-

hipertensiva de *Rauwolfia* spp e antimaláricos tais como a quinina de casca de *Cinchona* (GOSSLAU *et al.*, 2011; LI & VEDERAS, 2009; RICHTON, 2008; SCHMIDT *et al.*, 2008). Mais de 100 medicamentos baseados em produtos naturais estão em estudos clínicos (LI & VEDERAS, 2009) e dos 252 medicamentos na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são exclusivamente de origem vegetal (SAHOO *et al.*, 2010).

As terapias complementares e alternativas correspondem a uma diversificada gama de práticas relacionadas à saúde e possuem utilização fora do âmbito biomédico convencional (HALL *et al.*, 2017). Entre as práticas de Medicina Alternativa e Complementar encontram-se: a acupuntura, a quiropraxia, ervas, essências florais e a homeopatia (KIDD, 2012).

A terapia moderna baseada em essências florais foi desenvolvida pelo médico britânico, Edward Bach, em meados da década de 1930 (KIDD, 2012; GRAHAN & VLAMIS, 1999; KAMINSK, 1998). Neste contexto, inclui-se o Oxyflower®, um remédio composto de essências florais. Ao entrar em contato com as células, estimula a ação das moléculas de oxigênio do organismo, acionando as enzimas antioxidantes endógenas e desencadeando os processos fisiológicos benéficos da respiração e reparação celular. Estas essências vibracionais podem interferir na atividade imunológica, regulando a matriz biológica e ampliando a biorreceptividade das células (KOCHHANN, 2013; BOVOLON, 2015).

Segundo o fabricante, possui indicação para tratamento de halitose, periodontite, aftas, higiene bucal, assepsia de prótese dentária fixa e removível, candidíase, artrite, artrose, entre outras. Basicamente, sua formulação consiste em polímero carboxivinílico, espessante, água purificada, conservantes e essências florais de *Viola*, *Rosa canina* e *Wedelia paludosa*. Alguns estudos envolvendo os efeitos dessas plantas separadamente foram desenvolvidos *in vivo*, entre os quais podemos citar: o efeito anti-inflamatório relacionado à família Violaceae (DROZDOVA & BUBENCHIKOV, 2005) e à família Rosaceae (LATTANZIO *et al.*, 2011) e efeitos antinociceptivos relacionados à *Wedelia paludosa* (BLOCK *et al.*, 1998).

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar as atividades anti-inflamatória e anti-edematogênica do gel Oxyflower® em um modelo de edema de pata em ratos, quimicamente induzido pelo Adjuvante Completo de Freund (ACF).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os possíveis efeitos anti-inflamatório e antiedematogênico do gel Oxyflower® em modelo experimental de inflamação crônica induzida quimicamente pelo Adjuvante Completo de Freund (ACF) em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do gel Oxyflower® sobre a resposta inflamatória nas patas de ratos, após a injeção do ACF;
- Avaliar o efeito do gel Oxyflower® sobre a resposta edematogênica nas patas de ratos, após a injeção do ACF;
- Comparar os efeitos do gel Oxyflower® com drogas anti-inflamatórias padrões, sobre o edema e a inflamação induzida nas patas de ratos após a injeção do ACF;
- Avaliar o efeito do gel Oxyflower® sobre a quantidade de leucócitos do sangue periférico em animais com edema de pata induzido pelo ACF;
- Realizar análises histológicas nas lesões nas patas dos ratos com edema induzido pelo ACF, após o tratamento com gel Oxyflower® ou com drogas anti-inflamatórias padrão;
- Realizar avaliações termográficas teciduais, durante a evolução do processo inflamatório induzido nas patas de ratos pela injeção do ACF.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A Inflamação: aspectos gerais

A inflamação é uma reação complexa de tecidos vascularizados à infecção ou lesão celular, que envolve acúmulo extravascular de proteínas plasmáticas e leucócitos e que desempenha um papel crucial na defesa do organismo (HANCOCK *et al.*, 2016; ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015). É desencadeada por fatores exógenos, em resposta à invasão por um agente infeccioso ou por lesões de origem térmica, química, física ou mecânica e, ainda, por reações autoimunes, que resultam em um conjunto de respostas locais e sistêmicas (CARLBERG *et al.*, 2016). A inflamação também é desencadeada por fatores endógenos, sintetizados por células, como resultado de lesão tecidual, morte celular, necrose ou metabolismo celular deficiente (CARLBERG *et al.*, 2016).

A principal função da inflamação é remover os estímulos nocivos e proteger os tecidos de injúrias adicionais (TAKEUCHI, 2016; NATHAN, 2002; TEDGUI & MALLAT, 2001).

O processo inflamatório é composto por respostas vasculares, celulares e bioquímicas envolvendo uma complexa interação entre as células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, monócitos/macrófagos, plaquetas) e vasculares (células endoteliais e da musculatura lisa) (VISHWANADHAM, SUNITHA & RAMESH, 2016).

Modificações na microcirculação, tais como os fenômenos angiogênicos, migração de leucócitos pelo leito vascular e liberação de moléculas solúveis nos tecidos danificados são as principais características da inflamação, que é uma reação secundária em resposta às lesões, para se atingir a homeostase tecidual (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2008).

Embora o processo inflamatório seja conhecido pela humanidade há milhares de anos, o primeiro a definir seus sinais clínicos foi o médico romano Cornelius Celsus. Os sinais descritos por ele são conhecidos hoje como os sinais cardinais da inflamação: *rubor* (vermelhidão, devido ao aumento do aporte sanguíneo no local da inflamação -

hiperemia), *tumor* (edema causado pelo aumento da permeabilidade vascular), *calor* (aumento da temperatura no local da inflamação, associado com ao aumento do fluxo sanguíneo) e *dolor* (dor, em parte devido à sensibilização das terminações nervosas, provocada por mediadores inflamatórios). Mais tarde, em 1858, foi descrito por Rudolph Virchow o quinto sinal cardinal, *functio laesa* (perda de função dos órgãos e tecidos envolvidos), esse sinal é considerado um sinal universal da inflamação, pois acompanha todos os processos inflamatórios, já os quatro sinais descritos por Celsus, se aplicam à inflamação aguda que acompanha as feridas e infecções (MEDZHITOV, 2010).

Em uma inflamação, podemos evidenciar três fases. A primeira corresponde a alterações causadas diretamente pela agressão (o tecido destruído por uma queimadura, por exemplo), caracterizando uma fase alternativa. Segue-se a fase exsudativa, caracterizada pelas alterações vasculares que propiciam a saída dos vasos de seus constituintes líquidos e de suas células. Por fim, desenvolve-se a fase produtiva, caracterizada pela proliferação local de vasos e células. Esta última, corresponde à tentativa de reparar as alterações causadas pela agressão e pela fase exsudativa (MONTENEGRO & FRANCO, 2006).

Os fatores solúveis que medeiam a resposta inflamatória são classificados em quatro categorias principais: (1) metabólitos inflamatórios de lipídios como o fator ativador de plaquetas (PAF) e os inúmeros derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas), os quais são gerados a partir de fosfolípidos celulares; (2) três cascatas de proteases (coagulação, complemento e cininas), que geram vários peptídeos pró-inflamatórios; (3) o óxido nítrico, um potente vasodilatador endógeno e (4) um grupo de substâncias derivadas de polipeptídeos e conhecidas como citocinas, determinantes principais na composição do infiltrado celular, na ativação celular e respostas sistêmicas à inflamação (GALLIN *et al.*, 1992).

Na fase aguda da inflamação, os neutrófilos são os primeiros a responderem aos vários estímulos nocivos e danos teciduais (HARLAN, 1985). Os neutrófilos rapidamente extravasam da circulação para o local da lesão, onde inativam microorganismos invasores, liberando grânulos antimicrobianos e realizando a fagocitose. Durante a fagocitose, os neutrófilos engolfam microorganismos invasores em fagossomos, dentro dos quais as células produzem altos níveis de superóxido. O superóxido dos fagossomos é a principal fonte de muitas espécies reativas de oxigênio (EROs) (BEDARD & KRAUSE, 2007; REST & SPITZNAGE, 1977).

À medida que as respostas inflamatórias persistem, os monócitos circulantes migram gradualmente para o local da lesão e se diferenciam em macrófagos maduros (SINGER & CLARK, 1999), cuja função fagocítica ajuda a remover patógenos inativados e detritos celulares. Além disso, como um regulador chave na fase tardia da inflamação, macrófagos promovem o reparo tecidual ao produzir citocinas anti-inflamatórias (SERHAN & SAVILL, 2005) e gerar EROs extracelulares em um nível inferior aos neutrófilos (BEDARD & KRAUSE, 2007). As EROs geradas neste estágio regulam a remodelação do tecido, a formação de novos vasos e a reepitelização (JIANG *et al.*, 2011).

O efetivo reparo tecidual é fundamental para a sobrevivência de todos os organismos vivos (ERMING, MARTIN & TOMIC-CANIC, 2014). Quando uma célula sofre agressão focal, as organelas inviáveis podem ser isoladas num vacúolo limitado por membrana, digeridas e eliminadas, enquanto as partes perdidas são reconstituídas, voltando a célula à sua estrutura normal. Por vezes, as membranas lipídicas peroxidadas formam um resíduo quimicamente heterogêneo, de difícil digestão (lipofuscina), que é então posto de lado no interior da célula, enquanto ela continua a viver. Quando, em vez de atingir focalmente as células no seu citoplasma, a lesão causa a perda de muitas células, o reparo é mais complexo e pode assumir duas possibilidades: a) se as células parenquimatosas morrem, mas o estroma permanece íntegro, o reparo se faz a partir de células do mesmo tipo das que se perderam, voltando o órgão à sua estrutura normal (regeneração); se o estroma é destruído, o reparo se faz fundamentalmente às custas do tecido conjuntivo (cicatrização), o que quase sempre aparece combinado com certo grau de regeneração dos elementos epiteliais, os quais podem ou não reproduzir a estrutura que tinham anteriormente. Neste último caso ocorre uma regeneração atípica (MONTENEGRO & FRANCO, 2006).

O grau e a duração da resposta variam e isso influencia o resultado final. Existem grandes benefícios em aumentar a resposta inflamatória, mas também há consequências negativas, incluindo a ativação de uma resposta fibrótica, que é definida pelo acúmulo excessivo de tecidos conjuntivos e colágenos que podem debilitar a função do tecido e, em alguns casos, levar à perda de funcionalidade dos órgãos envolvidos (ERMING, WYNN & MARTIN, 2017).

Durante muitos anos, as inflamações crônicas e agudas foram pensadas como processos distintos, envolvendo diferentes células e mediadores inflamatórios e com

resultados bastante diferentes. No entanto, considera-se que os processos estão interligados, sendo que quando o agente inflamatório não é eliminado pelo processo inflamatório agudo, pode haver evolução para a inflamação crônica (LO *et al.*, 1999).

3.1.1 A inflamação aguda

A principal maneira pela qual o sistema imune lida com as infecções e lesões teciduais é estimulando a inflamação aguda, que é o acúmulo de leucócitos, proteínas plasmáticas e fluido derivado do sangue em tecido extravascular, local de infecção ou lesão. Os leucócitos e as proteínas plasmáticas normalmente circulam no sangue e são recrutados para os locais de infecção ou lesão, onde elas realizam várias funções efetoras que servem para matar os microorganismos e iniciar o reparo do tecido danificado (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015).

Tipicamente, o leucócito mais abundante que é recrutado do sangue para os locais de inflamação aguda é o neutrófilo, mas os monócitos sanguíneos que se tornam macrófagos no tecido, são cada vez mais importantes ao longo do tempo e podem se tornar a população dominante em algumas reações (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015). Estas células são responsáveis pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina beta (IL- β) e IL-6, histaminas, prostaglandinas e leucotrienos na área afetada (MURPHY & WEAVER, 2016).

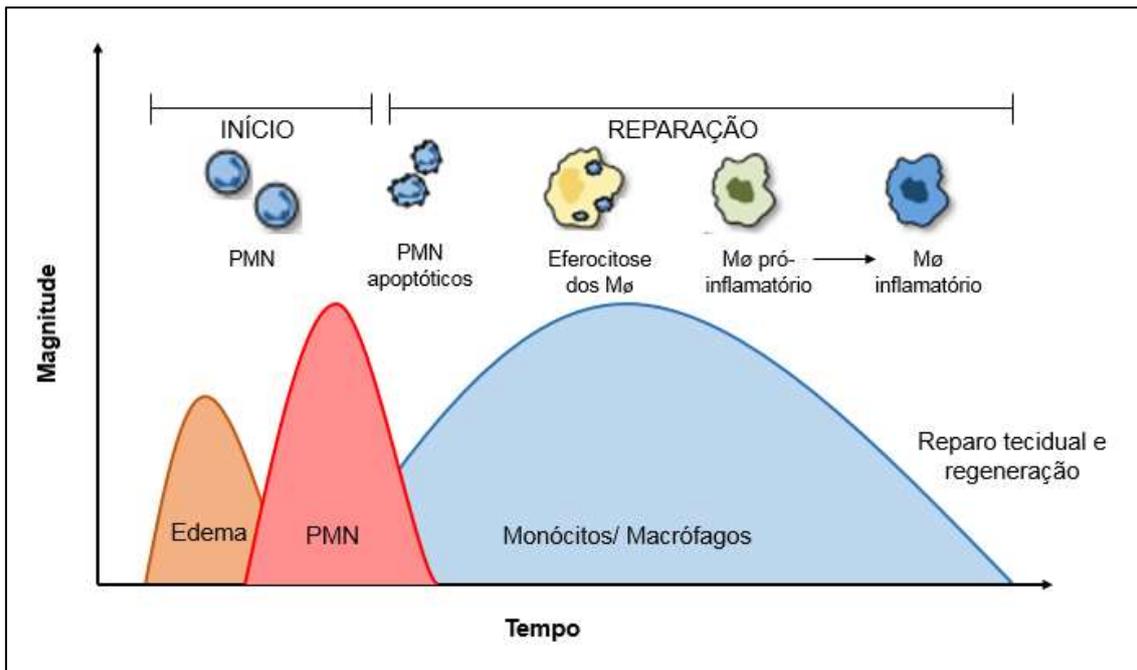
Entre as proteínas plasmáticas importantes e que entram nos locais inflamatórios, incluem-se as proteínas do complemento, anticorpos e reagentes de fase aguda. A distribuição destes componentes derivados do sangue para os locais inflamatórios é dependente de alterações reversíveis nos vasos sanguíneos dos tecidos infectados ou danificados. Essas alterações abrangem mudanças no fluxo sanguíneo para o tecido atribuídas à dilatação arteriolar, adesividade aumentada dos leucócitos circulantes para o revestimento endotelial das vênulas e permeabilidade aumentada dos capilares e vênulas às proteínas plasmáticas e fluidos. Todas essas alterações são induzidas por citocinas e pequenas moléculas mediadoras inicialmente derivadas das células residentes nestes tecidos, tais como os mastócitos, macrófagos e células endoteliais (MURPHY & WEAVER, 2016; ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015).

A inflamação aguda pode ser dividida em 2 fases gerais: iniciação e resolução (Figura 2). A iniciação é marcada pelo edema tecidual resultante do aumento do fluxo sanguíneo e permeabilidade da microvasculatura, processos que são mediados, em parte, por mediadores lipídicos (por exemplo, leucotrienos e prostaglandinas) e outros produtos vasoativos (por exemplo, histamina e bradicinina). Subseqüentemente, os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) migram para a área afetada, direcionados para o local da lesão por meio dos sinais químicos exsudados, incluindo mediadores lipídicos pró-inflamatórios tais como leucotrienos B4 (LTB4) e quimiocinas. Os PMN's atravessam os vasos sanguíneos devido às interações precisas com receptores de adesão endotelial e posteriormente fagocitam e degradam patógenos dentro dos fagossomos (GIMBRONE & GARCÍA-CARDEÑA, 2016; KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013; GRANGER *et al.*, 2010).

A resposta inflamatória aguda é auto-regulada, em parte devido ao *feedback* negativo apresentado pelas vias inflamatórias de sinalização, por exemplo, os antagonistas dos receptores endógenos, quando o estímulo é eliminado (PERRETTI, 2015; SERHAN, CHIANG & DALLI, 2015; HEADLAND & NORLING, 2015; GILROY & DE MAEYER, 2015; CREAN & GODSON, 2015; COLGAN, 2015; VIOLA & SOEHNLEIN, 2015; HAWORTH & BUCKLEY, 2015; MONTERO-MELENDZ, 2015; WALLACE *et al.*, 2015).

Em geral, a imunidade inata inicia a inflamação aguda em poucos minutos, e com o estímulo removido, a resposta inflamatória resolve a situação em poucas horas ou no máximo em 3 dias (FRANCESCHI & CAMPISI, 2014).

Figura 1: Eventos temporais coordenados da inflamação aguda.



Legenda: mø = macrófago (Adaptado de SANSBURY & SPITE, 2016).

3.1.2 A inflamação crônica

A inflamação crônica é caracterizada por uma resposta de duração prolongada, podendo originar-se a partir de infecções persistentes, exposição prolongada a agentes tóxicos e autoimunidade (ROBBINS, 1994). A inflamação pode ser benéfica quando bem controlada. No entanto, em excesso, pode-se tornar prejudicial devido a sua potente ação de destruição tecidual, progredindo para a inflamação crônica, degeneração tecidual, cicatrização e fibrose local, o que pode provocar disfunção tecidual (CARLBERG *et al.*, 2016; MEDZHITOV, 2010). Na maioria dos casos, esse dano tecidual é provocado pelo acúmulo excessivo de leucócitos (NORLING & SERHAN, 2010).

A inflamação crônica é reconhecida por não apresentar um padrão, ou seja, varia de acordo com os tipos de mediadores celulares e humorais envolvidos (TASAKA, 2006). Além disso, pode estar associada ainda à presença de linfócitos e macrófagos e também à proliferação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e de tecido conjuntivo (GALLIN *et al.*, 1999). Ocorre um predomínio da resposta imune adaptativa, com maior presença de monócitos e linfócitos (SERHAN *et al.*, 2007).

A persistência do processo inflamatório parece estar associada à fatores de risco na gênese e/ou aumento da incidência de uma ampla gama de doenças crônicas tais como alergia (por exemplo, asma enfisema, reações oculares e cutâneas), hipertensão arterial, diabetes, complicações cardiovasculares, acidente vascular encefálico, aterosclerose, artrite, artrite reumatóide, osteoporose, doença de Alzheimer e Parkinson, esclerose múltipla bem como muitos cânceres (por exemplo, próstata, colorretal, pulmão, ovário, mama, pâncreas, fígado, estômago e melanomas) (KHATAMI, 2009; KHATAMI, 2008; KHATAMI, 2005).

3.2 Farmacoterapia da inflamação

3.2.1 Fármacos Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINEs)

Os Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINEs) são comumente usados em todo o mundo. Devido à ampla gama de indicações e propriedades terapêuticas os AINEs estão entre os produtos farmacêuticos mais utilizados em todo o mundo, principalmente devido as suas propriedades analgésicas e anti-edematogênicas (PEREIRA-LEITE *et al.*, 2017; BLUMBERG & FOX, 2001). São indicados para tratamentos em curto prazo de condições dolorosas comuns, incluindo dores de cabeça, dor menstrual e também para terapias prolongadas de doenças inflamatórias crônicas, incluindo osteoartrite e artrite reumatóide (MARTINDALE, 2011).

Os AINEs inibem as enzimas ciclooxigenase-1 e 2 (COX-1, COX-2) envolvidas na síntese de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs) (SEIBERT *et al.*, 1994; VANE, 1971; VANE, 1996). Também reduzem a dor, febre e, também, a inflamação. A maior parte dos AINEs não é seletiva para a COX-1 ou para a COX-2, contudo, alguns fármacos mais recentes desse grupo tendem a ter seletividade ou preferência para a COX-2. Os inibidores da nova geração de COX-2 podem reduzir o efeito colateral gastrointestinal dos fármacos antiinflamatórios, mas eventualmente podem aumentar o risco cardiovascular, pois sua inibição seletiva da COX-2 induz o desequilíbrio entre PGI₂ e TXA₂ e a redução do NO vasodilatador (MAO, LI & SUN, 2014; .DAY & GRAHAN, 2013; BACCHI *et al.*, 2012; SIMMONS, BOTTING & HLA, 2004).

A COX-1 é uma isoenzima constitutiva com funções em muitos processos fisiológicos, incluindo a citoproteção da mucosa gastrointestinal e manutenção da homeostase renal. Contrariamente, a expressão de COX-2, é geralmente induzida por mediadores inflamatórios e catalisa a produção de prostaglandinas em condições inflamatórias e oncológicas (PATRIGNANI & PATRONO, 2015; CONAGHAN, 2012).

Os efeitos adversos mais comuns dos AINEs estão relacionados à sua administração crônica e mais comumente, afetam o trato gastrointestinal. Sintomas que variam desde eventos leves, como o refluxo gastroesofágico e sintomas dispépticos até situações mais complexas como sangramento, perfuração e obstrução do trato gastrointestinal e nefropatia, principalmente quando se utilizam fármacos não seletivos para COX-1 ou COX-2 (HARIRFOROOSH, ASGHAR & JAMALI, 2013; SOSTRES, GARGALLO & LANAS, 2013). Além disso, devido à sua fácil disponibilidade comercial, ocorrem também casos de abuso, mau uso, descumprimento de prescrições médicas e combinações injustificadas com outras drogas, o que configuram grandes problemas (WILCOX & CRYER, 2005).

3.2.2 Fármacos Anti-inflamatórios Esteroidais (AIEs)

Os Anti-inflamatórios Esteroidais (AIEs) são fármacos cujo mecanismo de ação envolve a ligação a receptores específicos, localizados no citoplasma das células de tecidos-alvo. Exercem um efeito modulatório sobre a expressão de um grande número de genes. O efeito induzido por esses fármacos pode ser resultado da interação direta sobre sequências específicas de DNA, promovendo transativação de genes de proteínas anti-inflamatórias ou, indiretamente, a inibição dos fatores de transcrição de genes que codificam mediadores inflamatórios como citocinas, moléculas de adesão e enzimas. Como consequência, ocorre supressão da produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão, por meio da inibição da função das células apresentadoras de antígenos/ macrófagos (responsáveis pela ativação dos linfócitos T), inibição da degranulação dos mastócitos, redução da produção de prostaglandinas (PGs) e leucotrienos pela redução da expressão do gene para ciclooxigenase (COX-2), entre vários outros efeitos que, contribuem para as atividades anti-inflamatória e imunossupressora dessa classe de fármacos (BOZIMOWSKI, 2015).

Embora sejam fármacos anti-inflamatórios eficazes, a sua administração crônica frequentemente resulta em reações adversas graves como redução da densidade óssea, desequilíbrio de fluidos e eletrólitos, elevação da glicemia, imunossupressão, aumento da pressão intraocular, elevação da pressão arterial, entre outras (SCHIMMER & FUNDER, 2011).

3.2.3 A terapia e os remédios florais

O conhecimento de que os produtos naturais representam uma rica fonte para a descoberta terapêutica levou ao desenvolvimento de muitas drogas utilizadas no mundo. Em vista do aumento da necessidade de agentes anti-inflamatórios eficazes, os produtos naturais ganharam atenção crescente. No entanto, tais extratos devem ser rigorosamente avaliados e caracterizados quimicamente para assegurar uma adequada consistência em seu desempenho (GOSSLAU *et al.*, 2011).

Com o intuito de suprimir o processo inflamatório, diversos agentes farmacoterapêuticos vem sendo empregados (DAR *et al.*, 2016). Os medicamentos à base de plantas estão presentes na humanidade desde a antiguidade até os dias atuais (NEWMAN, 2000). De acordo com o relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 80% da população global ainda depende dos remédios tradicionalmente utilizados (UMAMAHESWARI, SHREEVIDYA & NUNI, 2000).

Os medicamentos à base de plantas podem ser utilizados, como extrato bruto ou como compostos puros isolados para o tratamento de várias doenças. A terapêutica convencional atualmente disponível contém princípios ativos que visam um caminho específico, porém as drogas à base de plantas atuam de maneira mais abrangente. Tais drogas são compostas por múltiplos constituintes ativos que podem agir sinergicamente, seguindo caminhos celulares complexos (KUMAR *et al.*, 2013).

Atualmente, vários mecanismos relacionados à ação anti-inflamatória de compostos derivados de plantas têm sido investigados. Em termos gerais, esses mecanismos incluem a inibição de enzimas inflamatórias, por exemplo, fosfolipase A2 (PLA-2), COX, lipoxigenase (LOX), Óxido Nítrico Sintase (NOS), a regulação da atividade das células inflamatórias tais como linfócitos, macrófagos e mastócitos, a

inibição de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-6, IL-1a, IL-1) entre outros (DAR *et al.*, 2016).

A terapêutica com essências florais utiliza de princípios semelhantes à homeopatia, embora os remédios individuais dessas essências não tenham sido reconhecidos como remédios homeopáticos. A terapia moderna baseada em essências florais foi desenvolvida pelo médico britânico, Edward Bach, em meados de 1930 (KIDD, 2012; GRAHAN & VLAMIS, 1999; KAMINSK, 1998). Tais remédios são produzidos pela diluição dos componentes florais em água, o que resulta em uma “tintura mãe”. Tal “tintura mãe” constitui em uma preparação resultante da extração por contato de longo período de vegetais, dessecados ou naturais, pelos processos de maceração e percolação. É a forma farmacêutica básica, ponto de partida de formas homeopáticas derivadas, possuindo assim, semelhanças com medicamentos homeopáticos (ERNST, 2010).

As terapias complementares e alternativas correspondem a uma diversificada gama de práticas relacionadas à saúde, que possuem utilização fora do âmbito biomédico convencional (HALL *et al.*, 2017). Atualmente, muitos pacientes utilizam uma ou mais práticas de medicina alternativa, sendo que a maioria destes tem consciência desses medicamentos e de como eles podem ser usados para o seu completo bem-estar. Entre as práticas de Medicina Alternativa e Complementar, encontramos: a acupuntura, a quiropraxia, uso de ervas, essências florais e a homeopatia (KIDD, 2012).

Por sua própria natureza, as Essências Florais não têm impacto direto sobre a bioquímica do corpo, como os alimentos, medicamentos ou drogas psicoativas. Não são medicamentos e não interferem na sua ação, pois não possuem princípios ativos. (Vade Mecum das Essências Vibracionais, 2010; ALCOFORADO, 2012)

3.2.3.1 O Gel Oxyflower®

O Oxyflower® é um gel comercialmente disponível para uso tópico ou oral. Segundo o fabricante, o remédio caracteriza-se por ser um modulador do peróxido de hidrogênio, que ao entrar em contato com o organismo estimula a ação oxidativa das moléculas de oxigênio, acionando as enzimas antioxidantes endógenas e desencadeando os processos fisiológicos benéficos da respiração e reparação celular. Ainda segundo o

fabricante, possui diversas indicações, entre elas: tratamento da halitose, periodontite, aftas, higiene bucal, assepsia de prótese dentária fixa e removível, candidíase, dores reumáticas, artrite, artrose, fibromialgia e lombalgia. Basicamente, sua formulação consiste em Polímero carboxivinílico, espessante, água purificada, conservante e essências vibracionais florais de *Viola*, *Rosa canina* e *Wedelia pal.*

As essências vibracionais florais têm sua dispensação e comercialização permitidas em farmácias, pois constam da lista de Produtos Permitidos da Instrução Normativa – IN N° 9 de 17 de agosto de 2009, que faz parte da Resolução – RDC N° 44 de mesma data, da ANVISA.

3.3 Modelos experimentais de inflamação

Os modelos animais são amplamente utilizados, com sucesso, para melhorar a compreensão do ser humano em relação às diferentes doenças e contribuem significativamente para o desenvolvimento de novas terapias (WEBB, 2014).

Os modelos animais de inflamação são utilizados para avaliar a produção de mediadores inflamatórios locais, o processamento da sensação de dor em sítios do Sistema Nervoso Central (SNC), propriedades anti-inflamatórias e analgésicas dos fármacos (MCCARSON, 2015). Estes modelos são estudados pela humanidade há mais de 80 anos (WEBB, 2014).

Diferentes disciplinas terapêuticas desenvolveram afinidade por determinadas espécies animais em grande parte em razão da disponibilidade, facilidade de uso, custo e capacidade reprodutiva, com o intuito de desenvolver modelos semelhantes às doenças humanas (HELDRIK, 2012; FOX *et al.*, 2002).

3.3.1 Modelo de inflamação induzida por injeção do Adjuvante Completo de Freund (ACF) em roedores

O modelo experimental com injeção intraplantar de Adjuvante Completo de Freund (ACF) é rotineiramente usado para estudar a inflamação crônica, hipersensibilidade e artrite reumatóide em animais (PARVATHY & MASOCHA, 2013; KOO *et al.*, 2013; CORVO *et al.*, 2000; KNIGHT *et al.*, 1992). A inflamação provocada nestes modelos também pode ser utilizada para avaliar a produção de mediadores inflamatórios, as propriedades anti-inflamatórias de agentes como os AINEs e a eficácia de compostos analgésicos putativos na reversão da hipersensibilidade cutânea (MCCARSON, 2015).

A injeção do ACF resulta em edema localizado, bem como hiperalgia mecânica e térmica (SIMJEE *et al.*, 2007; NEGRI *et al.*, 2006; WATANABE *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2005). O edema atinge seu auge em 24 horas após a indução inflamatória podendo persistir por pelo menos 7 dias, desencadeando reações imunológicas (ZHAO *et al.*, 2015; GRIS *et al.*, 2014; KUSUDA *et al.*, 2011; BENDELE, 2001; IADAROLA *et al.*, 1988; STEIN *et al.*, 1988).

Dentro de um dia após a injeção de ACF, a resposta inflamatória aguda é iniciada e a pata injetada torna-se vermelha e edematosa (van DEN BERG, 2009; KRISHNASWAMY, ORTMANN & KIMPEL, 2005). Esta reação de fase aguda continua envolvendo tecidos intra-articulares e sinoviais até o 5º dia. A partir do 5º dia a inflamação se espalha para os tecidos para-articulares e também envolve ossos na região subcondral (formação de paniculite). A inflamação das articulações locais continua se não tratada. Após cerca de 12 dias a inflamação torna-se crônica com dano extensivo das articulações no local da injeção. As articulações nos locais não injetados também são afetadas (NARENDHIRAKANNAN, SUBRAMANIAN & KANDASWAMY, 2007; HENSON & BRUNSON, 1970; PEARSON & WOOD, 1963).

A maioria dos estudos sobre os mecanismos de ação do ACF foram realizados nos primeiros anos após sua descoberta, quando pouco se sabia sobre o destino do antígeno injetado periféricamente. Freund, em 1956, sugeriu três mecanismos de ação: 1) prolongar a presença de antígenos no local da injeção, 2) transporte mais efetivo dos antígenos para o sistema linfático e para os pulmões, onde o adjuvante promove a acúmulo de células relacionadas com a resposta imunológica e 3) outros mecanismos que permaneceriam não identificados, porque seus esclarecimentos exigiriam conhecimento sobre "como os anticorpos são formados e como a sensibilização se desenvolve" (BILLIAU & MATTHYS, 2001; FREUND, 1956).

Atualmente, sabe-se que a injeção de ACF provoca a liberação de mediadores inflamatórios como a PGE2, óxido nítrico, leucotrienos B2 (LTB2), TNF- α , IL-2 e IL-17 (NISAR *et al.*, 2015). Esses mediadores pró-inflamatórios podem causar sinovite, inflamação poliarticular, reabsorção óssea e também resultar em degeneração articular (BENDELE, 2001). Além disso, essas citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel importante na indução de dor nas articulações, provocando sensibilização de neurônios, direta ou indiretamente, pela síntese de prostaglandinas (KIDD & URBAN, 2001).

Estudos envolvendo a injeção de ACF em roedores constituem excelentes modelos para a avaliação da hiperalgesia mecânica e da alodínea, por produzir dor persistente, a qual se assemelha à dor pós-operatória e dores crônicas observadas em humanos. Além disso, o uso de AINEs apresenta boa eficácia neste modelo. Como desvantagem, este modelo apresenta a possibilidade de os animais ficarem doentes devido à indução inflamatória, desenvolvendo uma inflamação nos sítios injetados e também a possibilidade de formação de granulomas e outras lesões. (MULEY, KRUSTEV & MCDUGALL, 2016). De acordo com Muley e colaboradores (2016), este modelo pode apresentar dados pouco confiáveis se desenvolvido em camundongos.

3.4 Termografia infravermelha

A termografia é um método de obtenção de imagens com a utilização de equipamento para detecção de radiação infravermelha, emitida a partir de uma determinada superfície. Em seguida essas imagens são organizadas como um diagrama de distribuição com informações sobre a temperatura (HAMAGUCHI, 2014). Consiste em um método não invasivo caracterizado que pode apresentar sensibilidade (SOROKO *et al.*, 2014; DIAKIDES & BRONZINO, 2008; MERLA & ROMANI, 2006) e reprodutibilidade (MEIRELES *et al.*, 2017).

O método termográfico permite o registro das condições tróficas dos tecidos, bem como os mecanismos termorreguladores, que se encontram alterados em áreas com metabolismo tecidual aumentado, ou com resposta inflamatória (HEIMMAN *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2005). Por este método, a temperatura corporal é representada graficamente

(termograma), com cores diferentes para cada escala de temperatura (CALKOSINSK *et al.*, 2015). Cada pixel no termograma representa a temperatura medida da superfície de um objeto. As informações podem ser exibidas em tons de cinza ou como uma escala de cores. Em uma escala de cores, as áreas mais quentes são retratadas como brancas ou vermelhas, enquanto as áreas mais frias aparecem azuis ou pretas. As variações no padrão térmico (cor) refletem gradientes térmicos que representam mudanças de temperatura na pele devido às anormalidades subjacentes (COLAK *et al.*, 2008; EDDY, van HOOGMOED & SNYDER, 2001).

A termografia infravermelha é um método bastante útil na determinação do efeito terapêutico de tratamentos específicos. (HAMAGUCHI, 2014). Por meio das imagens obtidas é possível identificar lesões inflamatórias, que podem evoluir para doenças crônicas como a periodontite, o abscesso lingual, tumores mistos das glândulas salivares ou a sinusite maxilar crônica (DOBRZYNSKI *et al.*, 2009). O termógrafo vem sendo utilizado também, como exame complementar no diagnóstico de outras doenças, como por exemplo, câncer do colo do útero, câncer oral, câncer de mama e artrite (EYK, 2009; BOAS, 2006; KIM, LEE & JEONG, 2004; HAYASE *et al.*, 1992; OBLINGER, ENGEL & FRANKE, 1985). Nem sempre fornece detalhes específicos de uma doença, no entanto, pode auxiliar definindo a localização da área inflamada e/ou a progressão da lesão. A resposta inflamatória é caracterizada por aumentos na permeabilidade dos vasos sanguíneos, o que resulta em aumento do fluxo sanguíneo, que altera o padrão de calor. A temperatura das extremidades e da pele depende em grande parte da taxa subjacente de circulação e metabolismo tecidual (BERRY *et al.*, 2003).

A termografia é um indicador extremamente sensível de variações nos padrões de calor. Por esta razão os termogramas também podem ser facilmente influenciados por fatores externos, que podem induzir variações em seus resultados. Por este motivo, as imagens devem ser realizadas sob controle das condições ambientais. As influências internas e externas podem ainda, alterar a regulação da dinâmica do fluxo sanguíneo e da temperatura. Além disso, é provável que ocorram variações individuais nos animais, em diferentes horas do dia (HEIMMAN *et al.*, 2014).

A *Food and Drug Administration* (FDA/Estados Unidos) afirma que se trata de um exame complementar (Ventura, 2011) que dispensa radiação ionizante, acesso venoso ou qualquer outro procedimento invasivo. Portanto, é uma tecnologia com amplo uso

como ferramenta auxiliar podendo ainda ser empregada em estudos animais e clínicos (CALKOSINSKI *et al.* 2015; SNEKHALATHA *et al.* 2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

O presente trabalho trata-se de um estudo experimental realizado nas dependências do Laboratório de Ensaio Biológicos (LEB) e do Laboratório de Imunologia (Labimuno) pertencentes ao Centro Integrado de Pesquisa e Pós-Graduação em Saúde (CIPq), localizados no Campus JK da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM). Foram utilizadas, ainda, as dependências do Laboratório de Histopatologia, localizado no Campus I da UFVJM.

4.2 Material Utilizado

Tabela 1: Material permanente e de consumo.

Material Permanente	Material de Consumo
Balança digital (Balmak)	Cassetes Histológicos
Câmara hemocitométrica de Neubauer	Corantes: Eosina, Hematoxilina
Instrumental Cirúrgico	Formaldeído 10%
Paquímetro digital (ZAAS, 150 mm)	Lâminas e lamínulas para microscopia
Termógrafo digital (FLIR i7®, EUA)	Luvas de látex descartáveis
Cronômetro	Máscaras descartáveis
Microscópio de Luz (Olympus – Japão)	Parafina
Micrótomo (LEICA, Alemanha)	Potes coletores
Micropipetas de volumes variáveis	Recipiente para medicamentos
Pletismômetro de Pata (ScienLabor, Brasil)	Seringas Descartáveis 5 mL e 50 UI
	Tubos coletores heparinizados

4.3 Fármacos Utilizados

- Adjuvante Completo de Freund (ACF - Santa Cruz Biotechnology, Inc, EUA) – agente indutor de inflamação crônica
- Cloridrato de cetamina 10% (CETAMIN®; Syntec, Brasil) – agente anestésico
- Cloridrato de xilasina 2% (SEDALEX®, Syntec, Brasil) – sedativo, miorrelaxante e analgésico
- Diclofenaco dietilamônio 10 mg/g (Gel creme; Medley, Brasil) – anti-inflamatório não esteroidal
- Triancinolona acetona 0,1% (creme manipulado) – anti-inflamatório esteroidal
- Óleo mineral parafínico de grau farmacêutico (Naturol, Farmax, Brasil)
- Oxyflower® (Fisioquantic, Brasil) – modulador frequencial floral
- Polímero Carboxivinílico (Carbopol - Fisioquantic, Brasil) – veículo para preparo de suspensões.

4.4 Preparações

- Adjuvante completo de Freund (ACF) – Corresponde ao agente flogógeno. Foi aliquotado em eppendorfs estéreis de 2 mL.
- Óleo mineral parafínico de grau farmacêutico (Naturol, Farmax, Divinópolis, Brasil) – Corresponde ao veículo do agente flogógeno. Foi filtrado em microfiltro 0,22 µm e aliquotado em eppendorfs estéreis de 2 mL.
- A solução de cetamina foi utilizada na proporção de 60 mg/kg de peso corporal, por via intraperitoneal, juntamente com a xilasina.
- A solução de xilazina foi utilizada na proporção 8 mg/kg de peso corporal, por via intraperitoneal, juntamente com a cetamina.

4.5 Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFVJM (CEUA/UFVJM) sob o protocolo 050/2016 em 26/10/2016 (vide anexo A).

4.6 Animais

Foram utilizados 25 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Holtzman*, machos, com massa corporal entre 240 e 280g e aproximadamente, 8 semanas de vida. Os animais foram provenientes do biotério da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos no Biotério do CIPq - Saúde.

Os animais experimentais foram mantidos no Biotério Setorial do CIPq, em caixas de polipropileno com dimensões de 41x34x16 cm, com livre acesso à água filtrada e ração padrão para roedores. As caixas contendo os animais foram alocadas em gabinetes fechados, com sistemas de ventilação, exaustão e ciclos Claro/Escuro de 12 horas, em sala climatizada com temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$). As caixas foram lavadas e a maravalha substituída duas vezes por semana, para manter as adequadas condições de higiene. O ambiente de manutenção dos animais era fechado e o acesso restrito ao pessoal previamente autorizado e treinado, portando equipamentos de proteção individual (EPI's).

4.7 Caracterização dos grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos experimentais, de acordo com a tabela 2.

Tabela 2: Caracterização dos grupos experimentais de acordo com os fármacos utilizados.

Grupos	Substâncias utilizadas	Quantidade (g)	Protocolo de Administração			
			Via	Tempo	Local	Amostra
1	Controle *	--	--	1 minuto**	Pata direita	5
2	Veículo do Gel Oxyflower®	0,3	Tópica	1 minuto	Pata direita	5
3	Gel Oxyflower®	0,3	Tópica	1 minuto	Pata direita	5
4	Triancinolona acetonida 0,1%	0,3	Tópica	1 minuto	Pata direita	5
5	Diclofenaco dieltiamônio 10 mg/g	0,3	Tópica	1 minuto	Pata direita	5

* No grupo controle não foi utilizada nenhuma substância. ** Somente massagem.

Em todos os grupos, a terapêutica medicamentosa foi realizada diariamente, uma vez ao dia, no mesmo horário, durante os primeiros 14 dias experimentais. Entretanto, no grupo 1 (Controle) em todos os momentos experimentais foi realizada somente a massagem para simular a aplicação tópica do fármaco. Após o 14º dia, os animais continuaram sendo acompanhados e avaliados, contudo, sem nenhuma intervenção terapêutica. No 28º dia todos os animais foram eutanasiados.

4.8 Caracterização dos tempos experimentais

As avaliações da espessura, volume e registros termográficos das patas traseiras direita e esquerda, de cada animal foram realizadas de acordo com o seguinte protocolo e tempos experimentais, apresentados na tabela 3:

Tabela 3: Caracterização dos tempos experimentais.

Tempos experimentais	Procedimento/ tempo decorrido da injeção de ACF
Tempo 0	Aferições iniciais / Injeção intraplantar de ACF
Tempo 1	Aferições / 30 minutos
Tempo 2	Aferições / 24 horas (1 dia)
Tempo 3	Aferições / 48 horas (2 dias)
Tempo 4	Aferições / 72 horas (3 dias)
Tempo 5	Aferições / 96 horas (4 dias)
Tempo 6	Aferições / 7 dias
Tempo 7	Aferições / 14 dias

4.9 Indução da inflamação

A inflamação foi induzida quimicamente utilizando-se o Adjuvante Completo de Freund (ACF, ImmunoCruz, EUA), por aplicação intradérmica na superfície intraplantar das patas posteriores dos ratos, como descrito previamente por Stein *et al.*, (1988). O protocolo experimental foi baseado nos estudos de Mo e colaboradores (2013), com algumas alterações.

Inicialmente os animais tiveram sua massa corporal avaliada. Em seguida foram posicionados em decúbito ventral, em uma bancada, previamente preparada, sob contenção mecânica (contenção manual), por aproximadamente 2 minutos, para o procedimento de injeção das suspensões, de acordo com a tabela 4:

Tabela 4: Caracterização das suspensões/emulsões injetadas nas patas dos ratos.

Suspensão/ Emulsão	Concentração	Volume	Superfície intraplantar injetada
Adjuvante Completo de Freund (ACF)	5% m/v	0,2 mL	Direita
Óleo mineral	90% v/v	0,2 mL	Esquerda

4.10 Avaliação da Espessura e do Volume das patas traseiras dos animais

Um pesquisador foi responsável por realizar as medidas da espessura e do volume de ambas as patas traseiras de todos os animais, antes da indução química do edema e nos tempos experimentais especificados anteriormente. Com o intuito de aumentar a confiabilidade dos dados obtidos, cada avaliação foi realizada três vezes consecutivas, sendo utilizada a média das três medidas para obter o registro de cada momento.

A espessura (em mm) das patas traseiras foi obtida por meio de um paquímetro digital posicionado em um local padrão previamente definido (Figura 2).

Figura 2: Imagem demonstrativa do local de aferição da espessura das patas traseiras dos ratos, com o paquímetro digital

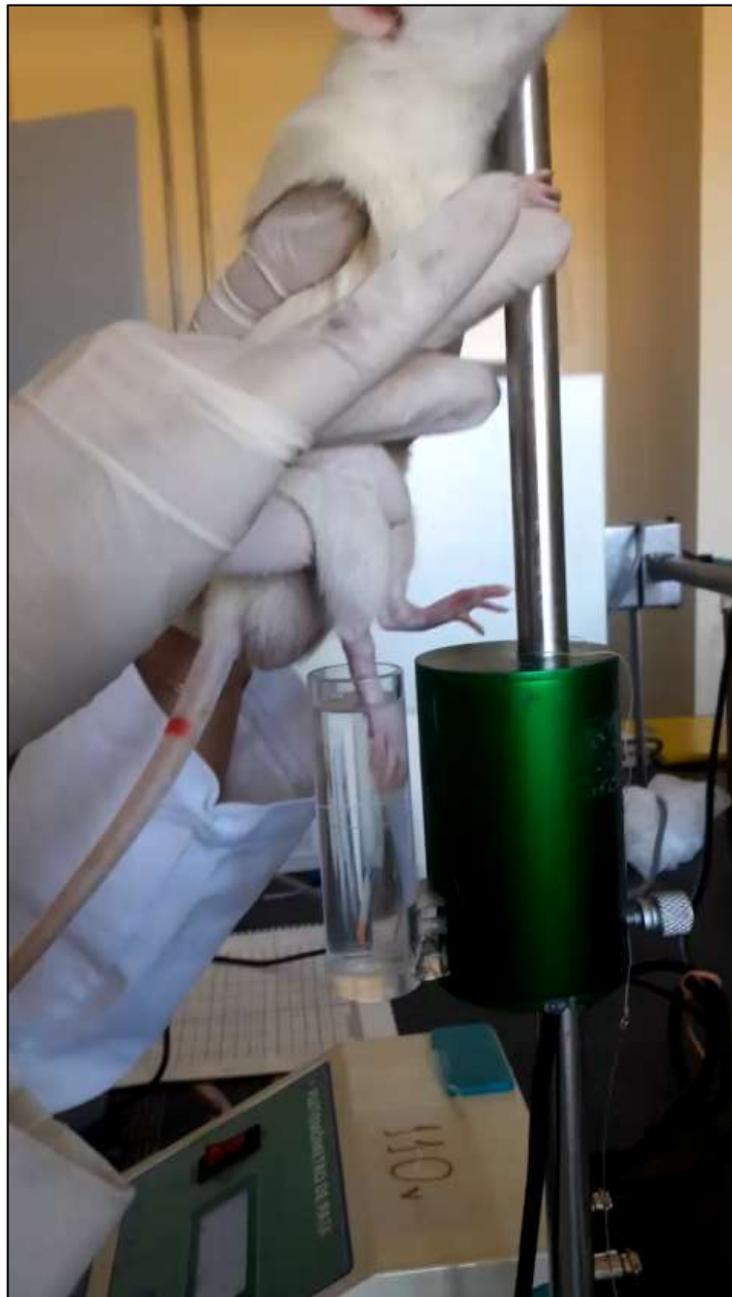


Fonte: Arquivo pessoal

Para a verificação dos volumes das patas, foi utilizado um pletismômetro de Pata (ScienLabor, Brasil). No momento da avaliação as patas traseiras de cada animal foram emergidas na solução do pletismômetro, dentro da cubeta do equipamento, até um ponto previamente definido (articulação tíbio-társica). Durante o processo de avaliação do volume, após a inserção da pata do animal na cubeta do equipamento, o deslocamento do fluido, aciona um transdutor cujo sinal é transformado em mililitros e registrado em um

painel digital do equipamento. O sinal elétrico produzido é proporcional ao volume de líquido deslocado pelas patas avaliadas (Figura 3).

Figura 3: Imagem demonstrativa da utilização do pletismômetro de pata para aferição do volume das patas traseiras dos ratos.



Fonte: Arquivo pessoal

O cálculo do edema foi obtido por meio da subtração dos valores médios encontrados para a pata posterior direita menos os valores médios encontrados para a pata posterior esquerda, em cada animal avaliado (Δ , em mL).

4.11 Tomadas termográficas

Outro pesquisador foi responsável por realizar as tomadas termográficas de ambas as patas traseiras dos animais, antes da indução química do edema e nos tempos experimentais especificados, segundo o estudo realizado por Calkosinski *et al.*, (2015) com modificações.

As imagens foram registradas (Figura 4) com câmera termográfica digital, portátil (FLIR i7®, Flir Systems, Portland, EUA). A câmera possui tela LCD colorida de 7.1 cm, capta temperaturas entre -20 a 250°C e apresenta resolução de imagem de 120x120 (14400 pixels) com 0,1°C de sensibilidade térmica. A câmera foi posicionada perpendicularmente a uma distância de 0,6m da superfície plantar das patas traseiras dos ratos. A calibração prévia (Figura 5) do equipamento foi realizada em todas as avaliações pelo registro de fita isolante de emissividade conhecida (0,95) fixada nas paredes do local de medida. A temperatura e a umidade do ambiente também foram registradas em cada avaliação. Em cada tempo e para cada rato foram realizados 3 registros da pata direita e 3 registros da pata esquerda. Posteriormente as imagens foram tratadas pelo software *Flir Tools*, usando a temperatura ambiente, umidade e uma emissividade padrão de 0,97. Os resultados foram expressos pela variação de temperatura (ΔT , em °C) dos animais de cada grupo nos tempos experimentais específicos.

Figura 4: Imagem demonstrativa da utilização do termógrafo digital para aferição da temperatura das patas traseiras dos ratos.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 5: Registros termográficos adquiridos com termógrafo portátil. Durante a calibração do equipamento os testes de repetitividade mostraram valores de desvios de 0,00 a 0,54°C.



Imagem gentilmente cedida pela Dra. Agnes Batista Meireles

4.12 Eutanásia e finalização humanitária

No 28º dia do experimento, todos os animais foram anestesiados, com solução anestésica contendo cetamina (60 mg/kg) e xilasina (8 mg/kg) por via intraperitoneal. Após adequada anestesia, procedeu-se a coleta de amostras de sangue por punção cardíaca e os animais foram eutanasiados pelo processo de exsanguinação.

4.13 Análises leucocitárias

Com o intuito de estabelecer uma comparação com os parâmetros leucocitários normais para ratos machos, especificamente da linhagem *Holtzman*, animais saudáveis que foram descartados pelo Biotério Setorial do CIPq, em diferentes momentos, forneceram sangue para a realização das leucometrias global e diferencial, seguindo os mesmos protocolos aplicados aos animais dos grupos experimentais.

4.13.1 Realização do leucograma

Foram coletados 5 mL de sangue dos animais, por punção cardíaca. O sangue foi armazenado em tubos heparinizados para posterior contagem global e diferencial dos leucócitos, conforme descrito a seguir. O balanço das diferentes populações leucocitárias (leucograma diferencial) foi realizado pela análise do esfregaço sanguíneo, utilizando-se microscopia de luz (microscópio Olympus – BX41 TF – Japão).

4.13.1.1 Leucometria Global

Para a contagem do número total de leucócitos, foi utilizada a técnica de macrodiluição em solução de Turk (solução evidenciadora para contagem de leucócitos). Em um tubo de ensaio, foram adicionados 380 μ L da solução de Turk e 20 μ L de sangue homogeneizado. Após 5 minutos, a solução final foi homogeneizada por inversão do tubo e 10 μ L da solução foram depositados na câmara de Neubauer com auxílio de uma pipeta com a ponteira rinsada. A contagem foi realizada a partir do número de leucócitos encontrado em 4 quadrantes da câmara de Neubauer, sob microscopia de luz e objetiva de 40 vezes. Os resultados foram expressos como número total de leucócitos por quadrante multiplicado por 50.

4.13.1.2 Leucometria Diferencial

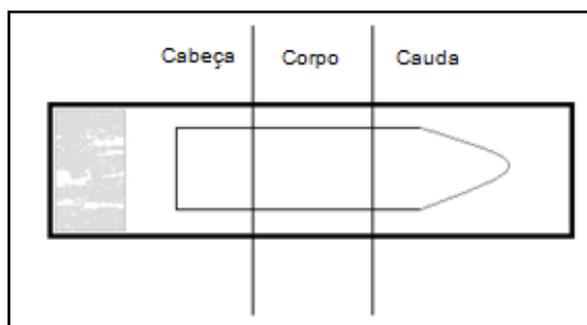
A contagem diferencial dos leucócitos informa a quantidade relativa dos diferentes tipos de leucócitos do sangue periférico (neutrófilos, linfócitos, basófilos, eosinófilos e monócitos) de acordo com suas características morfológicas. Alíquotas de 15 μ L do sangue de cada animal foram utilizadas para o preparo do cito-esfregaço. A alíquota sanguínea foi depositada em uma lâmina de vidro com extremidade fosca e com o auxílio de uma lâmina de vidro lisa, percorreu-se a superfície da lâmina (com angulação de 45°) de maneira a realizar o esfregaço sanguíneo. Após secagem dessa superfície, a lâmina foi identificada e corada através do método May Grunwald e Giemsa (composto

por corante de May-Grunwald, álcool metílico puro, giemsa em pó e glicerina), conforme protocolo a seguir.

Cada esfregaço foi recoberto com 20 gotas do corante May Grunwald, deixando-o atuar por 3 minutos, em um suporte específico para coloração de lâminas. Decorrido este tempo, 20 gotas de água destilada foram acrescentadas de forma homogênea por toda superfície da lâmina. Após 1 minuto, o excesso foi desprezado e cobriu-se a lâmina com 20 gotas do corante Giemsa. Após 15 minutos, a lâmina foi lavada em água corrente e aguardou-se sua secagem total, com a lâmina na posição vertical.

Após secagem, a lâmina foi examinada sob microscopia de luz, primeiramente com a objetiva de 40 vezes, para avaliar a viabilidade da mesma. Para a contagem celular desprezou-se a cabeça e a cauda do esfregaço, utilizando-se somente a região correspondente ao corpo (Figura 6). Com a objetiva de imersão, contou-se 100 leucócitos, fazendo a diferenciação entre estes tipos celulares. A contagem foi iniciada na borda lateral, movendo-se para o centro da lâmina em movimento de zigue-zague, com o intuito de reduzir o erro apresentado pela distribuição não uniforme de células no esfregaço. Os resultados foram expressos em $\%/mm^3$.

Figura 6: Desenho esquemático das regiões da lâmina de esfregaço sanguíneo.



4.14 Processamento e análises histológicas

Após a eutanásia, um fragmento correspondente ao tecido do local da injeção de ACF das patas posteriores, direita e esquerda, de cada animal foram removidas cirurgicamente, com auxílio de lâminas de bisturi estéreis e descartáveis. As amostras a

serem fixadas foram imersas, imediatamente após a sua retirada, em um pote coletor contendo 50 mL de solução de formol tamponado a 10%, durante 72 horas.

Após este período, as amostras de cada animal foram lavadas com solução salina e cada espécime foi transferido para cassetes previamente identificados. Em seguida, os cassetes foram armazenados em solução-tampão de formol 10% até a realização das etapas subsequentes.

O processamento histológico consistiu de três etapas: desidratação com álcool etílico 70,80, 90, 95 e 100% (1 h para cada concentração), diafanização com xilol I, II e III (1 h para cada concentração) e inclusão em parafina I, II e III (2 h, 12 h e 2 h, para cada tipo de parafina). Por fim, procedeu-se à confecção dos cortes (3-4 μ m) em um micrótomo. Em seguida os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. O protocolo de avaliação histológica utilizado foi adaptado de Brenner *et al.*, (2005).

A análise histológica foi realizada por um único examinador, em microscopia de luz com aumentos de 40, 100 e 400 vezes (Opton®, Guiyang, China), por meio de uma descrição qualitativa dos eventos microscópicos do processo inflamatório. As lâminas foram previamente codificadas para que o observador não tivesse conhecimento sobre os grupos experimentais.

As secções dos tecidos das patas traseiras foram analisadas segundo os parâmetros qualitativos para células inflamatórias e variou de escasso (1), moderado (2) ou intenso (3) (FRANCISCHI *et al.*, 2000; CHERNIAK *et al.*, 1995 - com modificações), sendo analisadas em 3 áreas distintas do corte histológico, em aumento de 400 x.

As imagens foram realizadas com a câmera microscópica *AxioCam ERc 5s*, com tamanho de pixels a 2,2 x 2,2 pixels (ZEISS, Alemanha) utilizando-se o microscópio Carl Zeiss Primo Star (ZEISS, Alemanha), nas objetivas de 40, 100 e 400 vezes. O software *AxioVision Release 4.8 – 2.5 P2* (ZEISS, Alemanha) foi utilizado para a captura das fotos (Resolução 2560 x 1920 pixels).

4.15 Análise estatística

Os resultados foram analisados como média \pm erro padrão ou desvio padrão da média, admitindo-se diferença significativa a partir de $p < 0,05$. Os dados relacionados ao volume, espessura e termografia foram analisados por meio do teste ANOVA *two-way*, seguido do post hoc de Tukey (*software* STATISTICA 7.0, StatSoft, South America). Os dados estatísticos relacionados a histologia foram comparados por meio do teste qui-quadrado (*software* SPSS versão 22.0, IBM Analytics, EUA). Na análise estatística do peso corporal e do leucograma, utilizou-se o teste ANOVA *one-way*. Estas análises e as representações gráficas dos resultados foram obtidas por meio do *software* Graphic Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA).

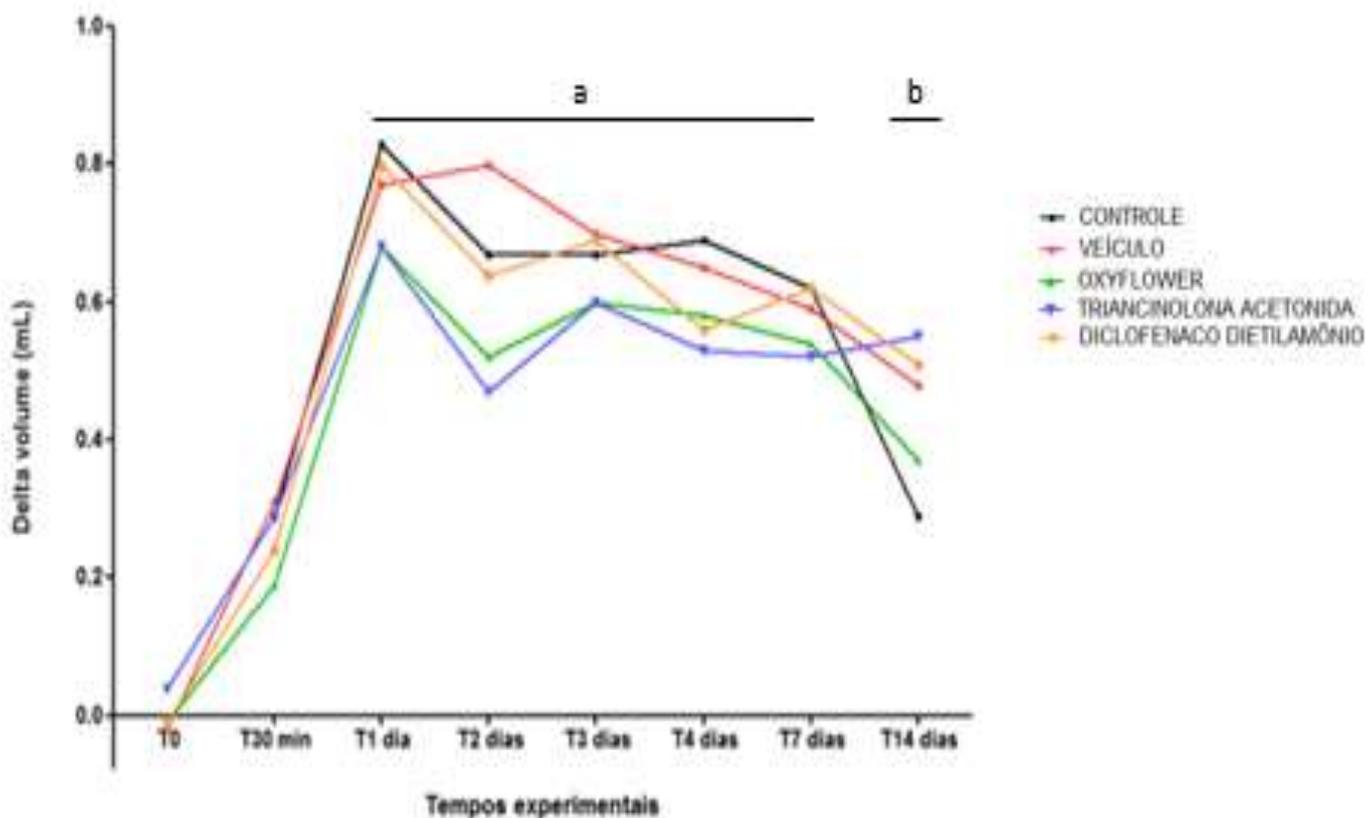
5 RESULTADOS

5.1 Variação do volume das patas traseiras dos ratos para cada grupo experimental

Após a indução do edema por ACF, os volumes das patas traseiras de cada animal foram verificados por meio da pletismografia durante os tempos experimentais previamente especificados. A variação do volume de cada grupo foi calculada por meio do delta volume (Δvol), que correspondeu às médias dos volumes das patas direitas (em mL) subtraídas das médias dos volumes das patas esquerdas (em mL), para cada grupo e tempo experimental.

Os resultados da variação do volume das patas dos ratos estão expressos no gráfico 1, a seguir.

Gráfico 1: Representação gráfica da variação do volume (Delta volume) das patas dos ratos, para cada grupo experimental. Diferenças significativas ($p < 0,05$), entre todos os grupos ^(a) ou apenas os grupos veículo, triancinolona e diclofenaco ^(b) comparados ao grupo controle. ANOVA *two-way* e *post hoc* de Tukey.

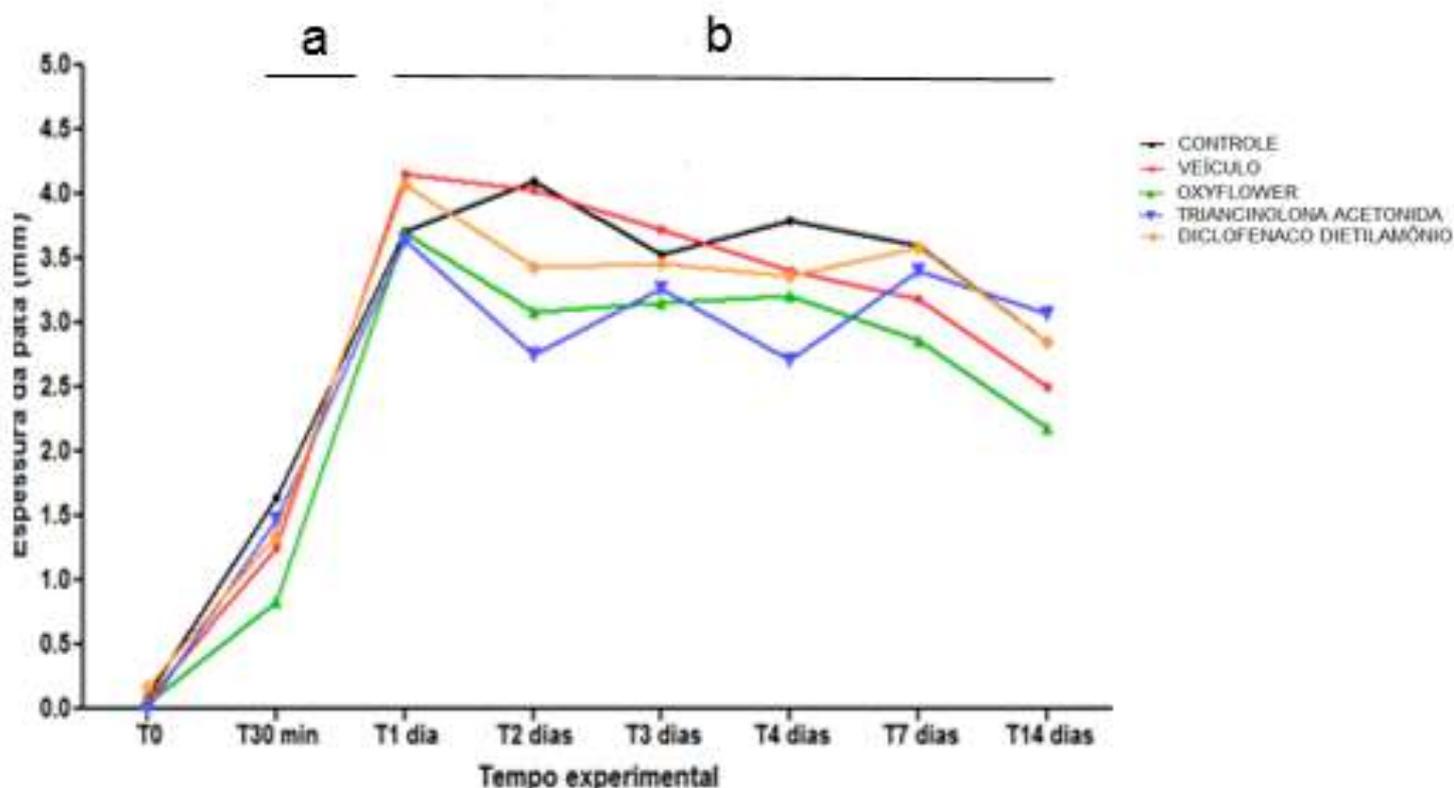


5.2 Variação da espessura das patas traseiras dos ratos para cada grupo experimental

Após a indução do edema por ACF, as espessuras das patas traseiras de cada animal foram verificadas por meio de um paquímetro digital durante os tempos experimentais previamente especificados. A variação da espessura de cada grupo foi calculada por meio do delta espessura (ΔE), que correspondeu às médias das espessuras das patas direitas (em mm) subtraídas das médias das espessuras das patas esquerdas (em mm), para cada grupo e tempo experimental.

Os resultados da variação da espessura das patas dos ratos estão expressos a seguir, no gráfico 2.

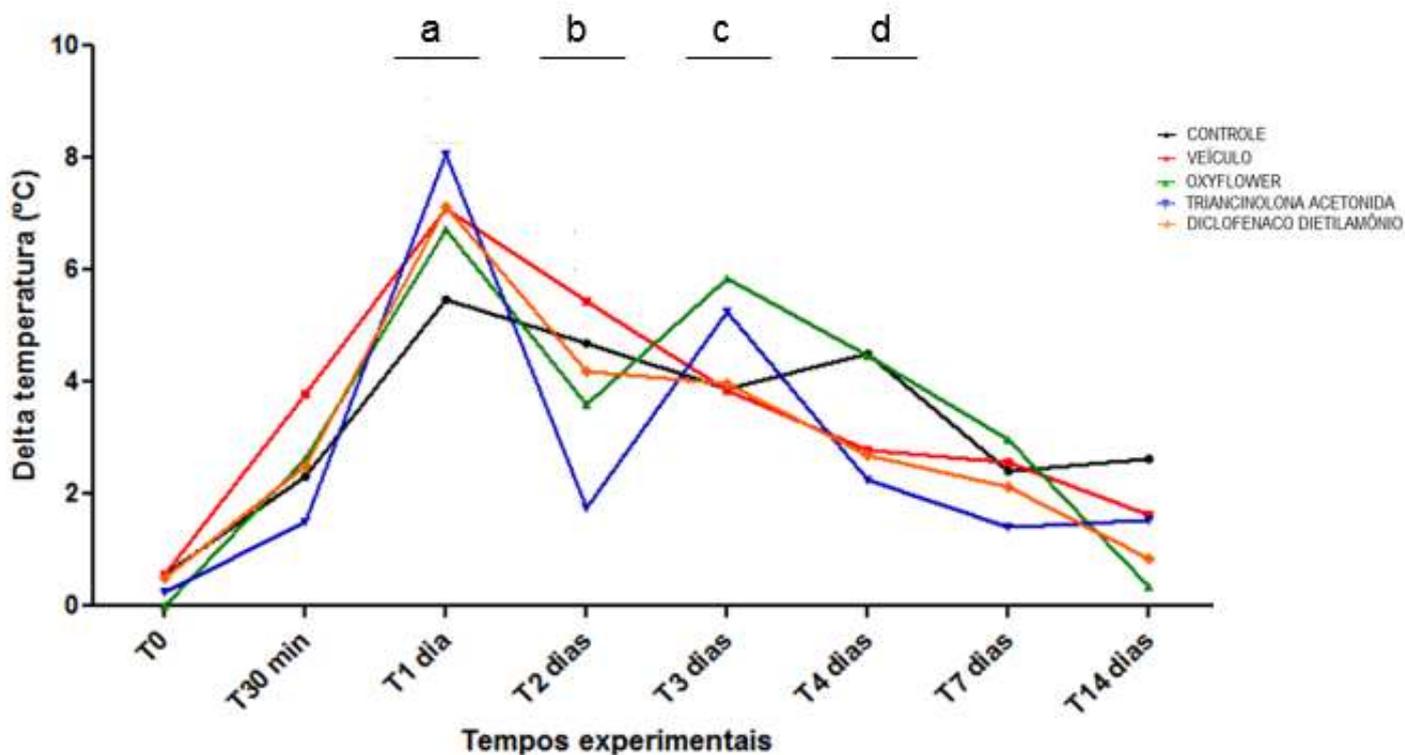
Gráfico 2: Representação gráfica da variação da espessura (Delta espessura) das patas dos ratos, para cada grupo experimental. Diferenças significativas entre o grupo controle ^(a) ou entre todos os grupos ^(b) comparados ao grupo controle. ANOVA *two-way* e *post hoc* de Tukey.



5.3 Alterações termográficas

Com o intuito de acompanhar a variação da temperatura das patas traseiras dos animais, foram realizadas tomadas termográficas em cada grupo e em cada tempo experimental. A variação da temperatura (ΔT), que correspondeu à temperatura da pata direita subtraída da temperatura da pata esquerda, pode ser observado a seguir, no gráfico 3.

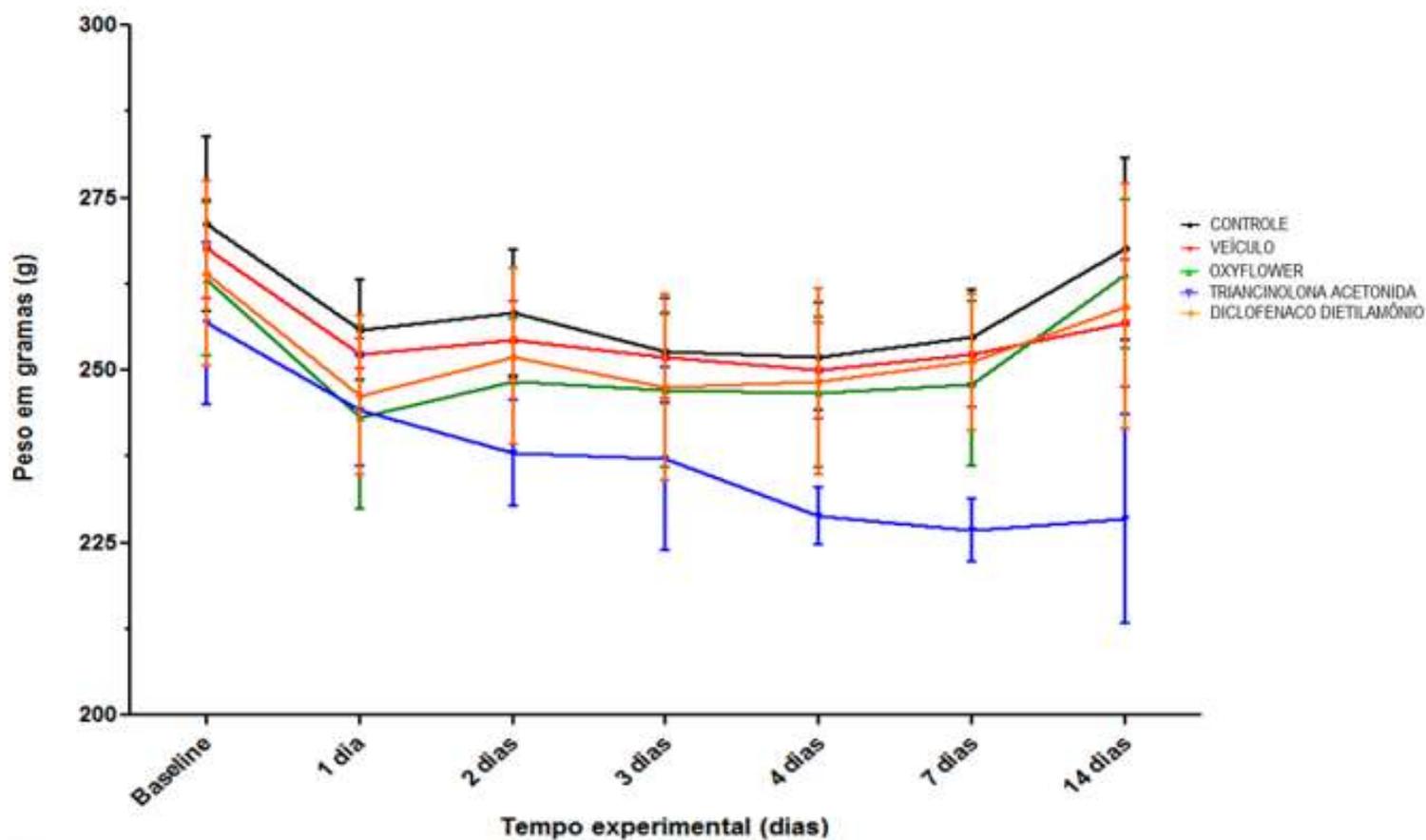
Gráfico 3: Representação gráfica da variação da temperatura (Delta temperatura) das patas de ratos, para cada grupo experimental. Diferenças significativas entre todos os grupos ^(a); grupos controle e veículo ^(b); grupos controle, Oxyflower e triancinolona ^(c) e entre controle e Oxyflower ^(d) comparados ao grupo controle. ANOVA *two-way* e *post hoc* de Tukey,



5.4 Variação da massa corporal dos animais

A média da massa corporal dos animais foi avaliada durante os 28 dias experimentais e sua distribuição por grupo está representada a seguir, no gráfico 4.

Gráfico 4: Distribuição das médias das massas corporais dos ratos de cada grupo experimental ($p > 0,05$ de acordo com o teste ANOVA para medidas repetidas)



5.5 Análise dos leucócitos circulantes

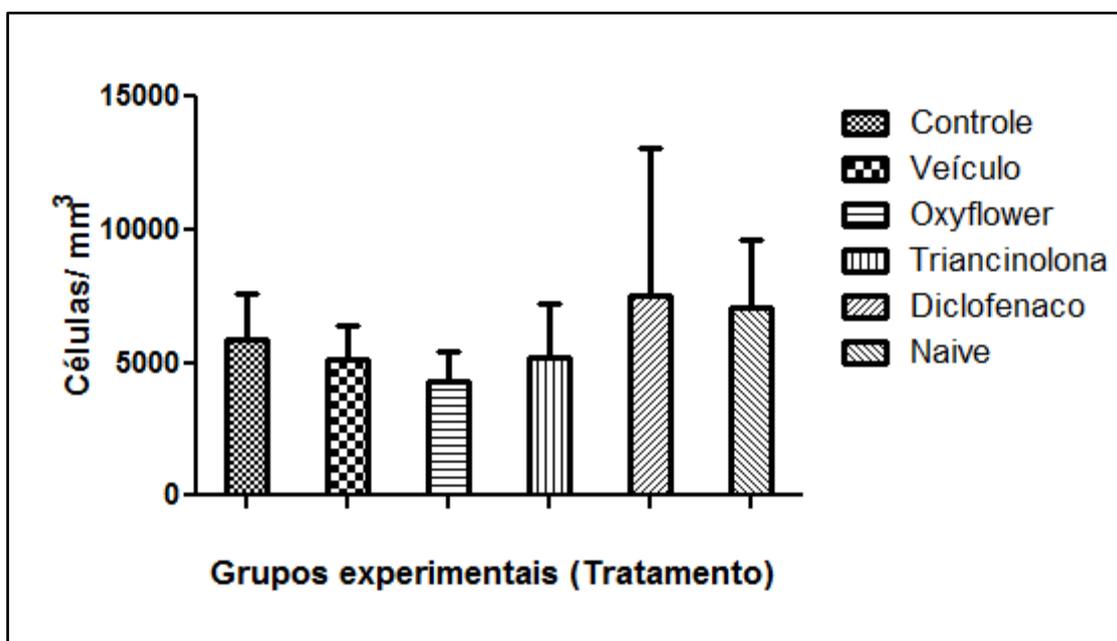
As avaliações dos parâmetros globais e diferenciais das células da série leucocitária foram realizadas ao final dos tempos experimentais, aos 28 dias, por meio de coleta e esfregaços sanguíneos, conforme descrito na seção Material e Métodos.

5.5.1 Leucometria global

Para a determinação do número total de leucócitos circulantes por milímetro cúbico (mm^3) de sangue, observou-se a lâmina com esfregaço sanguíneo em um microscópio na objetiva de 40 x.

A distribuição das células inflamatórias está representada a seguir, no gráfico 5.

Gráfico 5: Leucometria Global de leucócitos do sangue de ratos.

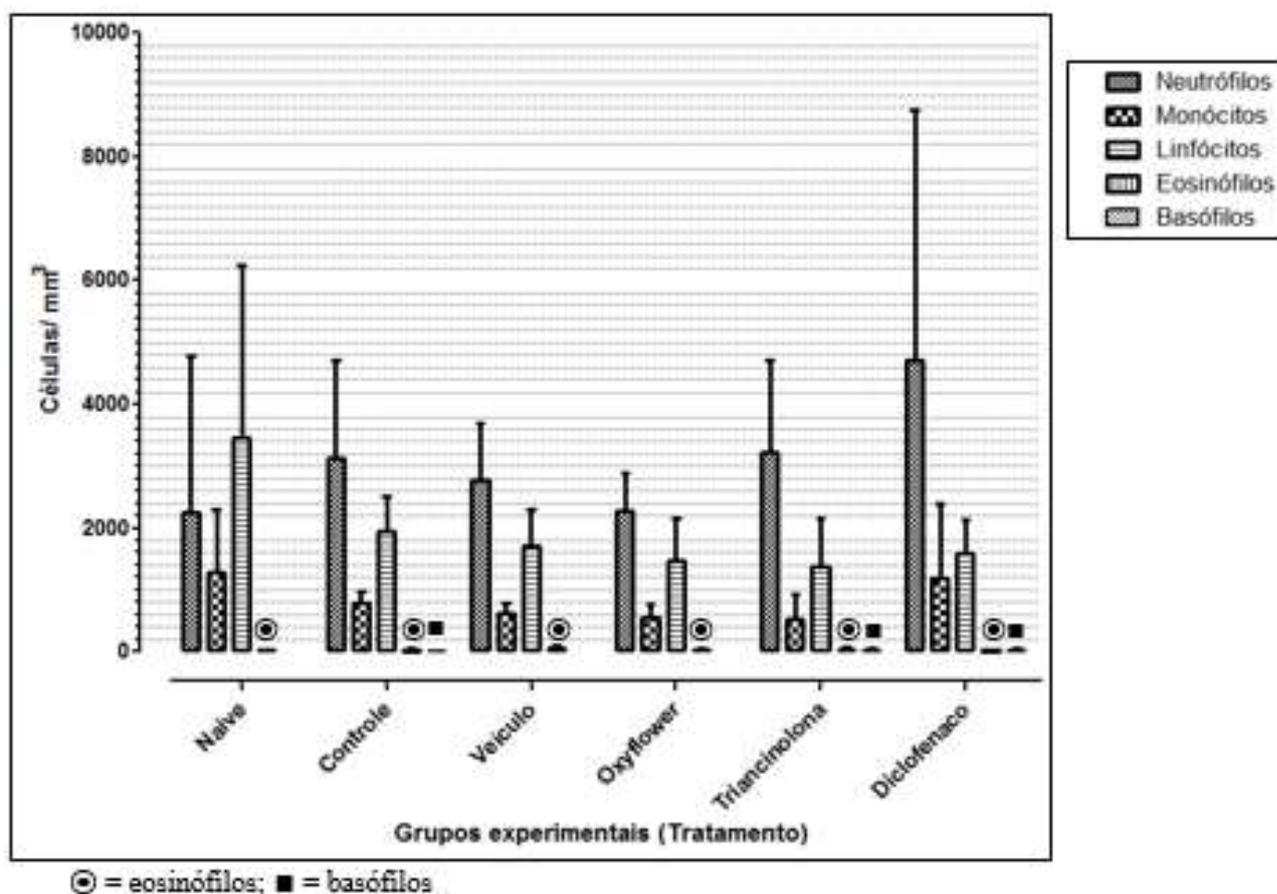


Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$, conforme o teste ANOVA *one-way*)

5.5.2 Leucometria diferencial

A contagem diferencial dos cinco tipos de leucócitos encontrados no sangue circulante (neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos e basófilos) foi realizada utilizando-se coloração específica, câmara de Neubauer, sob microscopia de luz em um aumento de 40 x. A quantidade de células por mm^3 de sangue está representada conforme o gráfico 6 e a média e porcentagem destas células estão representadas na tabela 5.

Gráfico 6: Leucometria diferencial de ratos em cada grupo experimental



Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$, conforme teste ANOVA *one-way*)

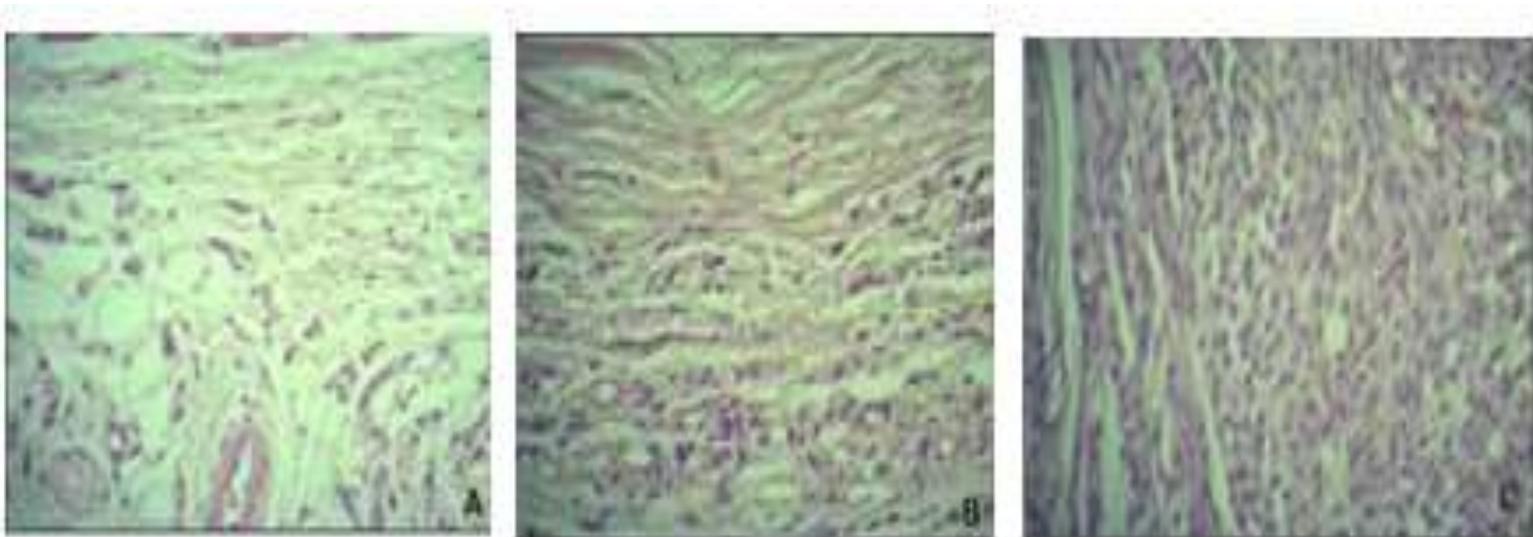
Tabela 5: Leucometria diferencial e suas respectivas porcentagens. Nesta tabela, os valores podem ser comparados com os valores da Leucometria diferencial de ratos machos saudáveis da linhagem *Holtzman*.

Grupos (Tratamento)	Leucócitos totais	%	Neutrófilos	%	Monócitos	%	Linfócitos	%	Eosinófilos	%	Basófilos	%
Naive (sem tratamento)	7025	100	2243	32	1270	18	3461	49	37	1	0	0
Controle	5880	100	3132	53	790,7	13	1936,2	33	7,2	0	13,9	1
Veículo	5140	100	2780,3	54	608,8	12	1707,5	33	43,4	1	0	0
Oxyflower	4310	100	2268,1	53	542,1	13	1480,1	34	19,7	0	0	0
Triancinolona	5180	100	3227,4	62	528,4	10	1374,8	27	33,5	1	15,9	0
Diclofenaco dietilamônio	7510	100	4713,5	63	1176,7	16	1587,7	21	13,9	0	18,2	0

5.6 Análises histológicas

As análises histológicas e as imagens foram realizadas por um pesquisador o qual desconhecia o protocolo realizado em cada animal.

Figura 7: Representação histológica da estratificação da presença do infiltrado inflamatório nas patas de ratos após 28 dias de indução com ACF. Escasso (A), moderado (B) e intenso (C). Coloração com HE e aumento de 400x.



Após a análise qualitativa dos escores, os dados foram tabulados. Houve associação estatisticamente significativa entre pata e avaliação histológica. A pata direita mostrou-se com maior frequência de infiltrado intenso, conforme a tabela 6.

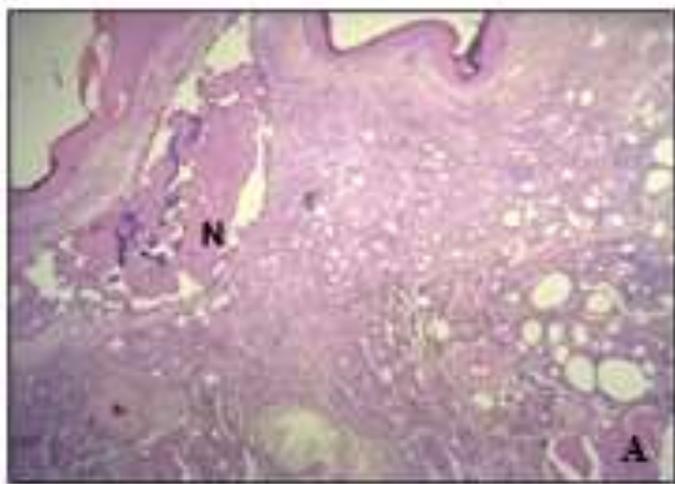
Tabela 6: Análise qualitativa da presença do infiltrado inflamatório das patas direita e esquerda dos animais e valor de p entre os diferentes escores observados, nos três campos histológicos analisados, conforme o teste Qui-Quadrado.

	Pata esquerda	Pata direita	Valor de p
	n (%)	n (%)	
Escasso	1 (1,3)	0 (0,0)	<0,001
Moderado	18 (24,0)	0 (0,0)	
Intenso	56 (74,7)	75 (100,0)	

Todos os animais tiveram suas patas traseiras analisadas histologicamente. Ambas as patas apresentaram característica intensa da presença de infiltrado inflamatório, no entanto, a pata direita (pata induzida) dos animais de todos os grupos, apresentou frequência constante (em todas as lâminas) de macrófagos espumosos (Figura 8a),

granulomas epitelióides de corpo estranho e áreas de necrose (Figura 8b). Na pata esquerda, em sua maioria, foram observados somente a presença de alguns macrófagos espumosos.

Figura 8: Aparência histológica da presença de áreas de tecido necrótico (N) e neutrófilos margeando esta área necrótica (A) e de macrófagos espumosos (ME) e granuloma (G) nas patas de ratos injetados com ACF (B). Coloração HE e aumento de 40 e 400 x, respectivamente.



6 DISCUSSÃO

No presente estudo, buscou-se averiguar a eficácia anti-inflamatória e antiedematogênica do gel Oxyflower® quando comparado aos medicamentos triancinolona acetonida e diclofenaco dietilamônio (utilizados como drogas-referência) e com o veículo do Oxyflower®, em modelo de inflamação induzida por ACF em ratos.

Todos os fármacos utilizados foram aplicados topicamente, em concordância com Muller *et al.*, (1997), que inferiu que a rota transdérmica para a administração de formulações tópicas de anti-inflamatórios apresenta vantagens em comparação com a administração oral, pois permite uma ação direta na área inflamada, evitando as inconveniências da terapia intravenosa (IV). Além disso, Byl (1995) afirmou que o aquecimento apresentado pelas patas dos ratos aumenta a energia cinética das moléculas das drogas e na membrana celular, dilatando os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas, aumentando a circulação nas áreas inflamadas. Essas mudanças fisiológicas podem facilitar a difusão das moléculas do fármaco através da camada córnea para serem coletadas pela rede capilar na derme.

Os modelos animais vêm sendo utilizados para a investigação dos mecanismos de inflamação e de auto-imunidade, entre outros, há mais de 80 anos. Uma vez que a compreensão destes mecanismos ainda se encontra em construção, os modelos animais contribuem significativamente para o desenvolvimento de novas terapêuticas farmacológicas (WEBB, 2013; SUNDBERG *et al.*, 2012; MESTAS & HUGHES, 2004) e investigação dos mecanismos relacionados aos diversos compostos, entre eles, o Oxyflower®, objeto desta investigação.

Neste contexto, diferentes metodologias (WALDER *et al.*, 2014; COBOS *et al.*, 2012; GUPTA, SHARMA & CHAND, 1994; MURAYAMA *et al.*, 1991; IADAROLA *et al.*, 1988; CHANG *et al.*, 1987; TSUMURI *et al.*, 1986; De YOUNG, 1984; HATT, MEHTA & SHRIVASTAVA, 1977; SINGH & GHOSH, 1968; SCHÖNHÖFER, 1967; TONELLI, THIBAUT & RINGLER, 1965) são utilizadas com o intuito de avaliar clinicamente as mudanças fisiológicas procedentes do processo inflamatório. Entre estes métodos, a verificação quantitativa do volume de um edema induzido é o mais comumente aplicado em estudos experimentais (SHEJAWAL, MENON & SHAILAJAN, 2014). Em nosso estudo, foi utilizado o modelo de edema de pata induzido quimicamente por Adjuvante Completo de Freund (ACF) em ratos machos da linhagem

Holtzman. O edema, em seu volume e espessura, foi avaliado por meio da pletismografia e por um paquímetro digital, respectivamente, ambos mensurados em triplicata, conforme preconizado por Ferreira (1979).

A injeção intraplantar do adjuvante é responsável por induzir uma resposta inflamatória prolongada (OMOTE *et al.*, 2002), apresentando sinais caracterizados por hiperemia, aumento da circunferência da pata (edema) e dor (LI *et al.*, 2005) além de manifestações imunológicas tais como potencialização da ativação de linfócitos T e acúmulo de células apresentadoras de antígenos (APC) (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2008). O edema induzido por este agente flogógeno atinge seu pico em 24 horas e persiste por pelo menos 7 dias, desencadeando respostas imunológicas (IADAROLA *et al.*, 1988; STEIN *et al.*, 1988; KUSUDA *et al.*, 2011; GRIS *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2015; BEN *et al.*, 2017). Em conformidade com esses autores, no presente estudo os animais apresentaram os valores máximos, tanto nas variáveis volume quanto espessura, 1 dia após a injeção e mantiveram o edema nos dias experimentais seguintes. No grupo controle, que recebeu injeção de ACF e não recebeu tratamento e também no grupo tratado com Oxyflower® observou-se que o edema foi resolvido no 14^o dia, onde não mais se observou diferença estatística em relação ao tempo inicial, quando a variável analisada foi o volume. Quanto à espessura, não podemos inferir que houve resolução do processo inflamatório dentro do tempo experimental, com base nos dados estatísticos pois o instrumento utilizado (paquímetro) é utilizado manualmente e também pode apresentar erros de medição (100 a 200 mm), conforme previsto pelo fabricante, ao contrário do pletismômetro de pata, o qual apresenta resultados mais fidedignos.

No presente estudo, o protocolo terapêutico foi realizado durante 14 dias seguidos. Isto se deve ao fato que a resposta ao *Mycobacterium tuberculosis* presente na composição do ACF é considerada agressiva e bifásica, conforme relatado por Ben e colaboradores (2017) e van Eden, Wagenaar-Hilbers & Waben (2001). Isto significa que o período a ser utilizado para a avaliação dos efeitos das drogas na modulação do processo inflamatório é limitado. Sendo assim, é indicado que a terapêutica seja iniciada antes que a doença seja visível clinicamente, o que acontece 10 dias após a injeção do *M. tuberculosis*. A concentração dos bacilos presentes na emulsão de ACF pode se apresentar em torno de 5 mg/mL ou menos, como consequência, a intensidade ou incidência da doença podem diminuir em casos de uso de doses insuficientes. Sendo assim, no presente

estudo os ratos foram injetados com uma dose única de 200 µL de ACF, estando o bacilo na concentração de 5% m/v na pata direita.

Sendo o veículo do ACF de composição oleosa, na pata esquerda (pata controle) de cada rato foi realizada a injeção de óleo mineral de grau farmacêutico em mesmo volume, conforme também realizado nos estudos de Oliveira e colaboradores (2007) e Lussier, De Médicis & Tétréault (1981). O óleo mineral é responsável por produzir um edema persistente enquanto que a injeção da suspensão do bacilo em salina, induz uma resposta inflamatória rápida seguida de um decréscimo também rápido do edema (LUSSIER, DE MÉDICIS & TÉTREAULT, 1981). A opção pelo veículo oleoso, neste estudo, se deu pela necessidade de obtermos um processo mais crônico, a fim de verificarmos melhor os efeitos da substância teste.

Em sua investigação, Ben e colaboradores (2017) avaliaram o efeito do extrato vegetal de *Trichilia monadelfa* utilizando o modelo de indução de artrite animal por injeção de ACF e de óleo mineral na pata controle de ratos da linhagem *Sprague-Dawley*. Os autores observaram a presença do edema em ambas as patas traseiras, o que se relaciona à resposta bifásica apresentada pela injeção de ACF em suspensão oleosa. Na fase aguda, observou-se o edema apenas na pata injetada (direita) enquanto que na fase subsequente, a fase crônica, constatou-se o edema também na pata contralateral (pata controle). Em consonância com estes autores, nos animais do nosso estudo, a pata não injetada com ACF (pata esquerda) também apresentou ligeiro edema nas fases mais tardias do experimento (dados não apresentados).

No presente estudo os animais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre as médias de suas massas corporais conforme o decorrer do tempo. Este fato sugere a manutenção da saúde geral destes animais, mesmo na presença de uma inflamação crônica induzida. Aos animais foram oferecidos água e ração especial para roedores *ad libitum*, ou seja, não houve controle sobre a ingestão de alimentos e água. Este achado contradiz o estudo desenvolvido por Francischi, Pereira & Castro (1997), no qual induziram a condição de artrite experimental por meio da injeção do ACF na veia da cauda de ratas da linhagem *Holtzman*, com intuito de avaliar o efeito inibitório da ciclosporina no SNC. Estes autores observaram perda de massa corporal nos animais, resultado da diminuição do apetite e dos sinais patognomônicos da doença. Além disso, van Eden, Wagenaar-Hilbers & Waben (2001), que também utilizaram o modelo de artrite experimental em ratos da linhagem *Lewis* observaram que os animais doentes

apresentaram um declínio na massa corporal, que foi relacionado com o desenvolvimento da artrite, enquanto os animais do grupo controle mantiveram o ganho de peso normalmente. Estes resultados corroboram a característica da curva da média da massa corporal do presente estudo, a qual apresenta comportamento normal de ganho de massa corporal dos animais injetados com ACF, sugerindo assim o não desenvolvimento de artrite induzida. No entanto, nestes dois estudos, os animais apresentaram ganho de peso a partir do 30º dia experimental, período este que não foi avaliado no nosso estudo.

A utilização de corticoesteróides, segundo Millward e colaboradores (1976) é responsável pela diminuição na síntese protéica. Num estudo desenvolvido por Blaauw e colaboradores (2004) a perda de massa corporal de ratos da linhagem *Wistar* foi associada à utilização da triancinolona, devido ao efluxo de proteína/ aminoácidos dos músculos destes animais. No presente estudo, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre as massas corporais dos animais dos diferentes grupos, percebe-se uma menor massa corporal em todo o período experimental no grupo tratado com triancinolona, quando comparado aos demais grupos.

Embora os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) e os corticosteróides continuem a serem os principais tratamentos anti-inflamatórios para várias doenças, seus benefícios são comprometidos pelos efeitos colaterais (PRICE *et al.*, 1996). O uso crônico de AINEs é restrito devido as suas toxicidades gastrointestinais relacionadas (LENZER, 2005). Os corticosteróides proporcionam alívio efetivo para um amplo espectro de sintomas inflamatórios, mas seu uso em longo prazo deve ser evitado devido à imunossupressão, entre outros efeitos colaterais (SAAG *et al.*, 1994). A aplicação tópica é uma via alternativa para a administração de AINE's sem que haja efeitos colaterais sistêmicos, no entanto, esta via é prejudicada pela baixa disponibilidade da droga nos locais da inflamação (SUBRAMANIAN *et al.*, 2005). Contudo, no presente estudo, foi observado um efeito significativo dos tratamentos tópicos sobre o processo inflamatório, inclusive no tratamento com o Oxyflower®, sugerindo a resolução do processo inflamatório dentro dos 14 dias experimentais, tendo em vista que os medicamentos não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quando comparados ao tempo 0 (*baseline*) do grupo controle.

O Oxyflower® é composto por essências florais de rosa canina, *Wedelia paludosa* e *Viola*. Separadamente estes compostos apresentaram diversas atividades observadas na experimentação *in vivo*. À rosa canina (família Rosaceae), foram atribuídos efeito neuroprotetor (prevenção dos mecanismos que conduzem à morte neuronal)

(Daneshmand *et al.*, 2016) e anti-inflamatório (Lattanzio *et al.*, 2011). Efeitos hepatoprotetores (Meotti *et al.*, 2006), nociceptivos (Block *et al.*, 1998) e hipoglicêmicos (Meotti *et al.*, 2006; Bresciani *et al.*, 2004) foram atribuídos à *Wedelia paludosa*. Já a Viola (família Violaceae), apresentou atividades anti-hipertensivas (Siddiqi *et al.*, 2012) e também anti-inflamatórias (Drozdova & Bubenchikov, 2005).

No presente estudo foi possível observar uma redução clínica (dados não apresentados) e estatisticamente significativas da espessura e do volume das patas dos animais tratados com o Oxyflower®, quando comparados ao grupo tratado com somente com o veículo do Oxyflower® ou o grupo controle (não tratado). Sendo o Oxyflower® composto de essências de várias flores, ainda não é possível sugerir com precisão um mecanismo terapêutico específico de ação. Além disso, na composição do Oxyflower® existe a presença do polímetro carboxivinílico (Carbopol), um espessante comumente utilizado em formulações tópicas. Um estudo *in vitro* realizado por Gartlan e colaboradores (2016) demonstrou que este polímero poliônico desencadeou um recrutamento rápido e robusto de leucócitos e citocinas pró-inflamatórias, principalmente em monócitos. Este achado sugere uma exarcebação benéfica na resposta inflamatória, o que pode aumentar as chances de recuperação do tecido inflamado. Os resultados do nosso estudo demonstram que tanto o grupo tratado com o Oxyflower® quanto o grupo tratado somente com o veículo do Oxyflower® apresentaram redução no volume e na espessura da pata. Neste sentido poderíamos sugerir a possível ocorrência de um efeito sinérgico envolvendo as essências florais e o veículo do gel Oxyflower® como responsáveis pela redução do edema.

Com o intuito de investigar o efeito anti-inflamatório do óleo das sementes de soja, Jayshree, Pandit, & Bhagyashree (2011) utilizaram o modelo experimental de injeção de ACF em ratos da linhagem *Wistar* comparando o efeito do óleo das sementes com o diclofenaco dietilamônio. Estes autores observaram que o óleo da semente apresentou eficácia semelhante ao diclofenaco no 12º dia, enquanto que, no 21º dia de experimento, o óleo foi significativamente mais efetivo ($p < 0,05$) que o diclofenaco. Sendo assim, concluíram que o diclofenaco atuava com maior eficácia na fase aguda da inflamação induzida. Segundo Narendhirakannan, Subramanian & Kandaswamy (2007), Henson & Brunson (1970) e Pearson & Wood (1963), aproximadamente 12 dias após a injeção de ACF, a inflamação torna-se crônica.

No presente estudo, observamos que o fármaco diclofenaco dietilamônio apresentou menor eficácia em reduzir o edema ao final dos 14 dias experimentais, quando comparado com o Oxyflower® e com o seu veículo. O fato de o diclofenaco não apresentar um efeito antiedematogênico na fase aguda, pode ser explicado pelo aumento da expressão da COX-2, após a administração deste AINE (HSUEH *et al.*, 2004). O efeito antiedematogênico deste fármaco na fase crônica pode ser atribuído principalmente à inibição da vasodilatação e exsudação mediada pela ação das prostaglandinas (KU, WASVARY & CASH, 1975). Outra possível ação do diclofenaco na redução do edema da pata é a supressão das citocinas TNF- α e IL-1 β (ZAKI *et al.*, 2011).

Um estudo realizado por Lewis, Bishop & Aspinall (1995) teve o intuito de determinar os efeitos de drogas anti-inflamatórias e anti-reumáticas em edema de pata de ratos, durante a inflamação aguda e crônica induzidas por ACF. Utilizaram como anti-inflamatórios esteroidais, a prednisolona, a triancinolona, dexametasona e hidrocortisona. A prednisolona e a triancinolona apresentaram redução significativa do edema até o 6º dia. Este achado corrobora os resultados do presente estudo. Foi observado ainda que a triancinolona apresentou efeito mesmo após os 14 dias experimentais (dados não apresentados). Em comparação com o efeito dos outros fármacos, inferia-se que este AIE resolveria o processo antes dos outros fármacos. O segundo pico de edema observado por volta do 7º dia, possivelmente se deve ao recrutamento de citocinas, conforme observado por Lewis, Bishop & Aspinall (1995).

O modelo de inflamação induzida por ACF é mediado na fase aguda principalmente por neutrófilos e no estágio crônico, por linfócitos T, sendo que em ambos os casos, monócitos/macrófagos participam ativamente (ROMAS *et al.*, 2002; FRANCH, CASTELLOTE, & CASTELL, 1994; BUTLER *et al.*, 1992;). A ativação de macrófagos conduz ao aumento dos níveis de enzimas lisossomais, produção de citocinas como TNF α e IL-1 β , fatores de crescimento entre outros mediadores da inflamação. Além disso, o TNF α induz a síntese de Óxido Nítrico (NO) através da ativação de sua isoforma (iNOS), o que aumenta a resposta dos neutrófilos ao estímulo inflamatório. (KUMAR *et al.*, 2010).

No presente estudo, foi observado as taxas de neutrófilos circulantes no sangue periférico dos animais (diclofenaco > triancinolona > controle > veículo > Oxyflower®, $p > 0,05$ em todos os grupos). Este achado está em consonância com o estudo realizado por Mo e colaboradores (2013), no qual avaliaram o efeito anti-inflamatório da aplicação tópica de extrato de romã, comparando-o com triancinolona e diclofenaco em modelo de

injeção de ACF. Neste estudo, os autores observaram que o extrato de romã apresentou uma forte inibição da infiltração de neutrófilos. Na presente investigação, a taxa de neutrófilos dos animais tratados com Oxyflower® foi a que mais se aproximou ao número de neutrófilos correspondentes a um animal saudável (*naive*). Pode-se inferir que algum mecanismo do Oxyflower® interceda na supressão da produção da citocina TNF α e conseqüentemente, na resposta dos neutrófilos e mais indiretamente, na produção de mieloperoxidase (MPO).

O acúmulo de neutrófilos no local da lesão permite a produção acentuada de substâncias tóxicas como os radicais livres que levam à ativação de enzimas proteolíticas causando danos no tecido de granulação incipiente, inibindo fatores de crescimento e dificultando o processo de reparação (GRAGNANI *et al.*, 2013; HORTON, 2003;). Neste contexto, apesar de o diclofenaco suprimir a ação de TNF- α e IL-1 β e conseqüentemente, a proliferação de neutrófilos (ZAKI *et al.*, 2011), em nosso estudo foi observado grande número de neutrófilos circulantes no grupo tratado com diclofenaco. Este achado contradiz os resultados apresentados por Macedo e colaboradores (2016), onde estes autores avaliaram o efeito anti-inflamatório sinérgico da associação de terpinoleno e diclofenaco em um modelo de inflamação crônica com ACF. No presente estudo, é possível observar uma supressão na migração de monócitos, sendo esta uma característica inerente ao uso de glicocorticoides, como a triancinolona, conforme descrito por Klippel e colaboradores (2001).

Nesta investigação, percebeu-se uma tendência à diminuição da porcentagem de linfócitos e monócitos no sangue periférico dos animais, quando comparado com o animal saudável (*naive*) embora não estatisticamente significativa ($p > 0,05$). O que sugere que ocorra maior migração dessas células sanguíneas para o tecido inflamado.

A análise histopatológica foi realizada em ambas as patas traseiras dos animais. Observou-se uma inflamação crônica granulomatosa na derme e em região subcutânea presente em todos os grupos. Após 28 dias de experimento, um infiltrado denso de neutrófilos, margeando as áreas necróticas e formação de granulomas pode ser observada nas análises dos tecidos da pata injetada de todos os grupos. Além disso, é possível perceber nos tecidos a presença de macrófagos espumosos e de substância oleosa de corpo estranho, presentes nos vacúolos lipídicos, rodeados por macrófagos, linfócitos e fibroblastos. Esta descrição corrobora os achados do estudo de Wiedemann e colaboradores (1991) e confirma a eficácia do modelo que utilizamos. Entre os grupos

foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) para os diferentes escores relacionados à análise quantitativa realizada. A histogênese de um granuloma é dependente de vários tipos de células. A composição típica é um centro de macrófagos / histiócitos com linfócitos em sua margem. A sequência de eventos que conduzem à formação de granulomas é regulada por vários tipos de células e citocinas: enquanto os mecanismos associados ao Th1 promovem o desenvolvimento de granulomas, parece que as células T reguladoras, bem como os macrófagos M2 juntamente com IL -10 e IL-13 promovem a sua degeneração e a cicatrização do tecido. As doenças inflamatórias crônicas baseiam-se principalmente na baixa modulação dos processos inflamatórios que conduzem e mantêm a formação destes granulomas (von STEBUT, 2017).

No presente estudo foi utilizada a termografia a fim de acompanhar a variação da temperatura da superfície das patas traseiras dos ratos, após a indução da inflamação pelo ACF. Percebeu-se que a variação da temperatura foi semelhante à variação da intensidade de formação do edema tecidual, nos diferentes tempos experimentais. Além disso, foi possível observar que o tratamento com os fármacos anti-inflamatórios padrão e também com o gel Oxyflower® reduziu a temperatura das patas dos ratos, paralelamente à redução do volume e da espessura (edema) dessas patas. Este fato nos leva a sugerir que a termografia poderá ser um método útil no acompanhamento da evolução do processo inflamatório tecidual, de forma não invasiva, neste modelo experimental.

O valor máximo de temperatura, registrado na pata dos ratos, no nosso estudo foi de 33°C, após 24 horas de indução da inflamação (dados não apresentados). Este registro está de acordo com o estudo de Phillippe e colaboradores (1997). Segundo Abbas (2015) nas respostas inflamatórias, pirógenos endógenos, como o TNF α e a IL-1, ou exógenos, como os lipopolissacarídeos derivados de microorganismos, agem no hipotálamo para induzir um aumento da temperatura corporal por meio do aumento da síntese de prostaglandinas nas células hipotalâmicas (ABBAS, 2015). Os inibidores da síntese de prostaglandinas como os AINEs, reduzem a febre pelo bloqueio da ação dessas citocinas.

Nossos resultados mostraram para todos os grupos experimentais, aumento significativo da temperatura da pata dos ratos, nos primeiros momentos após a indução da inflamação (30 minutos e 24 horas) com um pico máximo em 24 horas. Este fato condiz com uma variação exacerbada da temperatura durante a fase aguda da inflamação. Após esta fase aguda do processo inflamatório, foi observada uma tendência à redução progressiva da temperatura até os últimos tempos experimentais, quando ocorreu a

aproximação dos valores de temperatura com relação aos valores do momento antes da indução da inflamação (tempo 0). Contudo, essa tendência à redução da temperatura não ocorreu de forma linear, nos grupos tratados, pelo contrário, os grupos tratados demonstraram características oscilatórias na perda de temperatura que também foram relatadas em outros estudos como o de Phillipe e colaboradores (1997) e Calkosinski e colaboradores (2015). Curiosamente, no momento em que ocorreu o pico de temperatura em todos os grupos experimentais (24 horas) todos os grupos tratados demonstraram maiores picos de temperatura em relação ao grupo controle. Mas, com o passar do tempo, o efeito da redução da temperatura nos grupos tratados fica mais evidente em relação ao grupo controle (14 dias), com melhor atuação do gel Oxyflower®. Contudo esse caráter oscilatório da temperatura neste modelo experimental pode dificultar a análise da capacidade antitérmica das substâncias utilizadas no presente estudo.

Em estudo recente, Snekhalthath e colaboradores (2012) utilizaram a termografia infravermelha para avaliar a temperatura das patas de ratos da linhagem *Wistar*, após a injeção de 0,2 mL de ACF. As injeções foram realizadas em dois momentos, no primeiro dia e novamente no quinto dia de experimento. Contudo, foram avaliados somente dois tempos experimentais, antes da aplicação do ACF e após 30 dias da injeção. Além disso, não houve qualquer tipo de tratamento.

É importante ressaltar que na presente investigação a temperatura ambiente foi de 19°C ($\pm 0,7^\circ\text{C}$) e não variou significativamente durante o tempo experimental, sendo semelhante a outros estudos (SNEKHALATHA *et al.*, 2012), (CALCOSINSKI *et al.*, 2015).

7 CONCLUSÃO

O gel Oxyflower® apresentou atividade antiedematogênica semelhante aos fármacos padrão utilizados neste estudo (triancinolona e diclofenaco dietilamônio), com resolução do edema induzido na pata de ratos já no 14º dia experimental. Verificou-se, ainda, que a atividade antiedematogênica do gel Oxyflower® no 14º dia, foi um pouco mais eficaz do que a atividade dos fármacos padrão utilizados no presente estudo.

Apesar do efeito antiedematogênico verificado para o gel Oxyflower®, o qual pode estar associado a um efeito anti-inflamatório, os resultados do presente estudo não foram suficientes para confirmar o efeito anti-inflamatório dessa substância. Contudo, foram observadas alterações no comportamento das subpopulações leucocitárias do sangue dos animais tratados com o gel Oxyflower®, em especial na série de linfócitos e monócitos. Sabendo-se que estas células estão envolvidas na formação do granuloma tecidual, característica histológica marcante neste modelo experimental, estas alterações precisam ser mais bem investigadas.

O presente trabalho foi útil também, para corroborar outros estudos, sobre a utilização da termografia como método diagnóstico não invasivo em processos inflamatórios. Este método mostrou eficácia e aplicabilidade, que poderão ser exploradas em estudos futuros envolvendo o modelo de inflamação pela injeção do Adjuvante Completo de Freund.

Sabendo que a formação do edema é um dos eventos associados à inflamação, estudos futuros poderão contribuir para a verificação dos mecanismos de atuação do gel Oxyflower® nas diferentes cascatas do processo inflamatório. Assim, análises biomoleculares, imunológicas e imunohistoquímicas poderão ajudar a elucidar os possíveis mecanismos antiedematogênicos relacionados ao gel Oxyflower®, bem como averiguar melhor um possível efeito antinflamatório para este gel.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS A. K.; LICHTMAN A.H; PILLAI S. **Imunologia celular e molecular**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- AZAB,A.; NASSAR, A.; AZAB, A.N. **Anti-Inflammatory Activity of Natural Products**. *Molecules*.1;21(10), 2016.
- BACCHI, S.; PALUMBO, P.; SPONTA, A.; COPPOLINO, M.F. **Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review**. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 11:52–64, 2012.
- BAUHMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. *Immunology Today*, v.15, n. 2, p. 74-80, 1994.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. **The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology**. *Physiol. Rev*. 87, 245-313, 2007.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. **The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology**. *Physiol. Rev*. 87, 245-313, 2007.
- BEM, I.O.; WOODE, E.; KOFFUOR, G.A.; BOAKYE-GYASI, E.; TITILOYE, N.A. **Effect of Trichilia monadelpha (Meliaceae) extracts on bone histomorphology in complete Freund's adjuvant-induced arthritis**. *J Intercult Ethnopharmacol*. 11;6(2):177-185, 2017.
- BENDELE, A. **Animal models of rheumatoid arthritis**. *J Musculoskelet Neuronal Interact*; 1:377–385, 2001.
- BERRY, R.J.; KENNEDY, A.D.; SCOTT, S.L.; KYLE, B.L.; SCHAEFER, A.L. **Daily variation in the udder surface temperature of dairy cows measured by infrared thermography: Potential for mastitis detection**. *Can. J. Anim. Sci.*, 83, 687–693, 2003.
- BHATT, K.R.; MEHTA, R.K.; SHRIVASTAVA, P.N. **A simple method for recording anti-inflammatory effect on rat paw edema**. *Indian J Physiol Pharmacol*. 21: 399–400, 1977.
- BLOCK, L.C., SCHEIDT, C., QUINTÃO, N.L., SANTOS, A.R., CECHINEL-FILHO, V. **Phytochemical and pharmacological analysis of different parts of *Wedelia paludosa* DC. (Compositae)**. *Pharmazie*. 1998 Oct;53(10):716-8;1998.
- BOAS, N.F. **Thermography in rheumatoid arthritis**. *Ann Newyork Academy Sci*.223–234, 2006.
- BUCKLEY, C.D.; GILROY, D.W.; SERHAN, C.N. **Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation**. *Immunity*.;40:315–327, 2014.
- CARLBERG, C.; ULVEN, S.M.; MOLNÁR, F. **Chronic inflammation and metabolic stress nutrigenomics**. Springer, Heidelberg, pp 121–137, 2016.

- CHANCELLOR, P.M. **Manual ilustrado dos remédios do Dr. Bach.** São Paulo: Pensamento; 1997.
- CHANG, J.; BLAZEK, E.; SKOWRONEK, M.; MARINARI, L.; CARLSON, R.P. **The antiinflammatory action of guanabenz is mediated through 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibition.** *Eur J Pharm.* 142: 197–205, 1987.
- COBOS, E.J.; GHASEMLOU, N.; ARALDI, D.; SEGAL, D.; DUONG, K.; WOOLF, C.J. **Inflammation induced decrease in voluntary wheel running in mice: A nonreflexive test for evaluating inflammatory pain and analgesia.** *Pain.* 153:876-884, 2012.
- COLAK, A.; POLAT, B.; OKUMUS, Z.; KAYA, M.; YANMAZ, L.E.; HAYIRLI, A. **Short communication: Early detection of mastitis using infrared thermography in dairy cows.** *J. Dairy Sci.*, 91, 4244–4248, 2008.
- COLGAN, S.P. **Neutrophils and inflammatory resolution in the mucosa.** *Semin Immunol.*;27:177–183, 2015.
- CONAGHAN, P.G. **A turbulent decade for NSAIDs: Update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity.** *Rheumatol Int*;32(6):1491–1502; 2012.
- CORVO, M.L.; JORGE, J.C.S, HOF, R.V et al. **Superoxide dismutase entrapped in long-circulating liposomes: formulation design and therapeutic activity in rat adjuvant arthritis.** *Biochim Biophys Acta*; 1564:227–236, 2000.
- CREAN, D.; GODSON, C. **Specialised lipid mediators and their targets.** *Semin Immunol.*;27:169–176,2015.
- CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JUNIOR, D.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, E.C. **Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória.** *Bras J Rheumatol*, v. 50, n. 4, p. 434-61, 2010.
- DAR, K.B.; BHAT, A.H.; AMIN, S.; MASOOD, A.; ZARGAR, M.A.; GANIE, S.A. **Inflammation: A Multidimensional Insight on Natural Anti-inflammatory Therapeutic Compounds.** *Curr Med Chem.* ;23(33):3775-3800, 2016.
- DAVIES, N.M.; GOOD, R.L.; ROUPE, K.A.; YÁÑEZ, J.A. **Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error?--Not as easy as 1, 2, 3.** *J Pharm Pharm Sci.*;7(2):217-26, 2004.
- DAWANE, J.S.; PANDIT, V.A.; RAJOPADHYE, B.D. **Experimental evaluation of anti-inflammatory effect of topical application of** DAY, R.O.; GRAHAM, G.G. **Non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs).** *BMJ* 2013, 346:f3195, 2013.
- DEHARO, E.; GINSBURG, H. **Analysis of additivity and synergism in the antiplasmodial effect of purified compounds from plant extracts.** *Malar. J.*, 10, 2011.
- DELVES, P. J.; ROITT, D. **The Immune System — First of two parts.** *N Engl J Med.*, v. 343, p. 37-50, 2000.

- DEROIDE, P. **As essências floridas francesas: harmonizadores da alma**. São Paulo: Aquariana; 1994.
- DeYOUNG, L.M. **The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid**. *J Invest Dermatol.* 82: 367–371, 1984.
- DIAKIDES, N.; BRONZINO, J. **Medical Infrared Imaging**, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2008.
- DOBZYNSKI, M.; CALKOSINSKI, K., et al. **Application of thermography in dentistry based on literature review and authors experimental studies**. *Polish Journal of Environmental Studies.* vol. 18, no. 1, pp. 556–561, 2009.
- DROZDOVA IL, BUBENCHIKOV RA. **Composition and Antiinflammatory Activity of Polysaccharide Complexes Extracted from Sweet Violet and Low Mallow**. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2005; 39: 197–200;. 2005
- DROZDOVA, I.; BUBENCHIKOV, R. **Composition and antiinflammatory activity of polysaccharide complexes extracted from sweet violet and low mallow**. *Pharm Chem.* 39:197–200, 2005.
- DROZDOVA, I.L.; BUBENCHIKOV, R.A. **Composition and Antiinflammatory Activity of Polysaccharide Complexes Extracted from Sweet Violet and Low Mallow**. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 39: 197–200, 2005.
- EDDY, A.L.; VAN HOOGMOED, L.M.; SNYDER, J.R. **The role of thermography in the management of equine lameness**. *Vet. J.*, 162, 172–181. 16, 2001.
- EMING, S.A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, T. **Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation**. *Sci. Transl. Med.* 6, 265, 2014.
- EMING, S.A.; WYNN, T.A.; MARTIN, P. **Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration**. *Science.* 356 (6342):1026-1030, 2017.
- entadaphaseoloides seeds as paste and ointment**. *N Am J Med Sci.* v;3(11):513-7, 2011.
- ERNST, E. **Bach flower remedies: a systematic review of randomised clinical trials**.
- FERREIRA, S.H. **A new method for measuring variations of rat paw volume**. *J Pharm Pharmacol.* 31(9):648, 1979.
- FOX, J.G.; ANDERSON, L.C.; LOEW, F.M.; QUIMBY, F.W. **Laboratory Animal Medicine**. 2nd ed. New York: Academic Press; 2002.
- FRANCESCHI, C.; CAMPISI, J. **Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases**. *J Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci* 69(Suppl 1):S4–S9, 2014.
- FRANCISCHI, J.N.; YOKORO, C.M.; POOLE, S.; TAFURI, W.L.; CUNHA, F.Q.; TEIXEIRA, M.M. **Anti-inflammatory and analgesic effects of the phosphodiesterase 4 inhibitor rolipram in a rat model of arthritis**. *Eur J Pharmacol.* 399(2-3):243-9, 2000.
- FREUND, J. **Some Aspects of Active Immunization**. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1, 291-308, 1947.

FREUND, J. **The mode of action of immunologic adjuvants.** Adv.Tuberc. Res. 7, 130–148,1956.

FREUND, J. **The mode of action of immunologic adjuvants.** Bibl Tuberc.(10):130-48, 1956.

FREUND, J.; MCDERMOTT, K. **Sensitization to Horse Serum by Means of Adjuvants.** Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 49, 548-553, 1942.

GALLIN, J.I; GOLDSTEIN, I.M; SNYDERMAN, R., et al. **Inflammation. Basic principles and clinical correlates.** ed 2, New York, Raven Press, 1992.

GARTLAN, K.H., et al. **Sterile inflammation induced by Carbopol elicits robust adaptive immune responses in the absence of pathogen-associated molecular patterns.** Vaccine. 27;34(19):2188-96, 2016.

GILROY, D.; De MAEYER, R. **New insights into the resolution of inflammation.** Semin Immunol.;27:161–168, 2015.

GIMBRONE, M.A. Jr.; GARCÍA-CARDEÑA, G. **Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis.** Circ Res.;118:620–636, 2016.

GRAHAM, H.; VLAMIS, G. **Bach flower remedies for animals.** Forres (Scotland): Findhorn Press Ltd.; 1999.

GRANGER, D.N.; RODRIGUES, S.F.; YILDIRIM, A.; SENCHENKOVA, E.Y. **Microvascular responses to cardiovascular risk factors.** Microcirculation.;17:192–205, 2010.

GRIS, G.; MERLOS, M.; VELA, J.M.; ZAMANILLO, D.; PORTILLO-SALIDO, E. **S1RA, a selective sigma-1 receptor antagonist, inhibits inflammatory pain in the carrageenan and complete Freund's adjuvant models in mice.** Behav. Pharmacol. 25:226-235, 2014.

GUPTA, O.P.; SHARMA, N.; CHAND, D. **Application of papaya latex-induced rat paw inflammation: model for evaluation of slowly acting antiarthritic drugs.** J Pharmacol Toxicol Meth. 31: 95–98, 1994.

HALL, H.; LEACH, M.; BROSNAN, C.; COLLINS, M. **Nurses' attitudes towards complementary therapies: systematic review and meta-synthesis.** Int J Nurs Stud.;69:47-56, 2017.

HAMAGUCHI, S. **The instrument for thermography.** Masui.;63(7):728-36. 2014.

HANCOCK, R.E.; HANEY, E.F.; GILL, E.E. **The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity.** Nat Rev Immunol 16(5):321–334, 2016.

HARIRFOROOSH, S., ASGHAR, W.; JAMALI, F. **Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: An update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications.** J Pharm Pharm Sci;16(5):821–847;2013.

HARLAN, J.M. **Leukocyte-endothelial interactions.** Blood. 65, 513-525, 1985.

HAWORTH, O.; BUCKLEY, C.D. **Pathways involved in the resolution of inflammatory joint disease.** *Semin Immunol.*;27:194–199, 2015.

HAYASE, Y.; WAKASA, T.; UEMURA, M. et al. **Clinical Evaluation of thermography in the diagnosis of malignant tumours in the oral and maxilla-facial region.** *Oral Radiol* 8:11–17, 1992.

HEADLAND, S.E; NORLING, L.V. **The resolution of inflammation: principles and challenges.** *Semin Immunol.*;27:149–160, 2015.

HEDRICH,H. **The Laboratory Mouse.** 2nd ed. London: Academic Press; 2012.

HEIMANN, K; JERGUS, K; ABBAS, A.K., HEUSSEN, N.; LEONHARDT, S.; ORLIKOWSKY, T. **Infrared thermography for detailed registration of thermoregulation in premature infants.** *Journal of Perinatal Medicine*, vol. 41, no. 5, pp. 613–620, 2013.

HENSON, E.C.; BRUNSON, J.G. **Studies of adjuvant-induced arthritis in the albino rat.** *Ann Rheum Dis.* 29:185,1970.

IADAROLA, M.J., BRADY, L.S., DRAISCI, G., AND DUBNER, R. **Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation: Stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding.** *Pain* 35:313-326; 1988.

IADAROLA, M.J.; BRADY, L.S.; DRAISCI, G.; DUBNER, R. **Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation: Stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding.** *Pain.* 35:313-326, 1988.

JANEWAY, C.A.; MEDZHITOV, R. **Innate immunity recognition.** *Annu Rev Immunol.*, v. 20, p. 197-216, 2002.

JIANG, F.; ZHANG, Y., et al. **NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair.** *Pharmacol. Rev.* 63, 218-242, 2011.

JIANG, L.J.; NG, E. Y. K.; YEO, A. C. B., et al. **A perspective on medical infrared imaging.** *Journal of Medical Engineering and Technology*, vol. 29, no. 6, pp. 257–267, 2005.

KAMINSK, P. **Extending the legacy of Dr. Bach: flower essence therapy in the twenty-first century.** *Calix Inter J Flower Essence Ther.* 1:6-31,2004.

KHATAMI, M. **“Yin and Yang” in inflammation: Duality in innate immune cell function and tumorigenesis.** *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8, 1461–1472; 2008.

KHATAMI, M. **Developmental phases of inflammation-induced massive lymphoid hyperplasia and extensive changes in epithelium in an experimental model of allergy. Implications for a direct link between inflammation and carcinogenesis.** *American Journal of Therapeutics*, 12, 117–126, 2005.

KHATAMI, M. **Inflammation, aging, and cancer: tumoricidal versus tumorigenesis of immunity: a common denominator mapping chronic diseases.** *Cell Biochemistry and Biophysics*, 55, pp. 55-79, 2009.

- KIDD, B.L.; URBAN, L.A. **Mechanisms of inflammatory pain.** *Br J Anaesth.* 87:3–11, 2001.
- KIDD, J.R. **Alternative medicines for the geriatric veterinary patient.** *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*;42(4):809-22, 2012.
- KIM, S.W.; LEE, S.M.; JEONG, S.H. **Validation of thermography in the diagnosis of acute cervical sprain.** *J Korean Neurosurg Soc* 36:297–301, 2004.
- KNIGHT, B.; KATZ, D.R.; ISENBERG, D.A., et al. **Induction of adjuvant arthritis in mice.** *Clin Exp Immunol.*90:459–465, 1992.
- KOLACZKOWSKA, E; KUBES, P. **Neutrophil recruitment and function in health and inflammation.** *Nat Rev Immunol.*;13:159–175, 2013.
- KOO, S.T.; LEE, C.H.; CHOI, H., et al. **The effects of pressure on arthritic knees in a rat model of cfa-induced arthritis.** *Pain physician.*16:E95–E102, 2013.
- KRISHNASWAMY, K.; ORTMANN, R.A.; KIMPEL, D. **Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease.** *Pathophysiol.* 12:167–181, 2005.
- KUMAR, S.; BAJWA, B.S.; KULDEEP, S., et al. **AntiInflammatory activity of herbal plants: a review.** *Int. J. Adv. Pharm. Biol. Chem.* 2, 272-281, 2013.
- KUSUDA, R.; CADETTI, F.; RAVANELLI, M.I.; SOUSA, T.A.; ZANON, S.; DE LUCCA, F.L.; LUCAS, G. **Differential expression of microRNAs in mouse pain models.** *Mol. Pain* 7:17, 2011.
- LaTORRE, M.A. **Integrative perspectives: integrating Bach flower remedies into a therapeutic practice.** *Perspect Psychiatr Care.* 42(2): 140-3, 2006.
- LATTANZIO F, GRECO E, CARRETTA D, CERVELLATI R, GOVONI P, SPERONI E. **In vivo anti-inflammatory effect of Rosa canina L. extract.** *J Ethnopharmacol* 2011; 137: 880-885;. 2011.
- LATTANZIO, F.; GRECO, E.; CARRETTA, D.; CERVELLATI, R; GOVONI, P.; SPERONI, E. **In vivo anti-inflammatory effect of Rosa canina L. extract.** *J Ethnopharmacol.* 137: 880-885, 2011.
- Li J. W. H, Vederas J. C. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? *Science.* 2009;325:161–5
- LI, W.M; CUI, K.M.; LI, N.; GU, Q.B.; SCHWARZ, W.; DING G.H.; WU, G.C. **Analgesic effect of electroacupuncture on complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain in mice: a model of antipain treatment by acupuncture in mice.** *Jpn J Physiol.* v.55, n.6, p-339-44, 2005.
- LI, Z.; PROUD, D.; ZHANG, C.; WIEHLER, S.; MCDUGALL, J.J. **Chronic arthritis down-regulates peripheral mu-opioid receptor expression with concomitant loss of endomorphin 1 antinociception.** *Arthritis Rheum.* 52:3210–3219, 2006.
- LO, D.; FENG, L.; LI, L., et al. **Integrating innate and adaptive immunity in the whole animal.** *Immunol Rev* 169(1):225–239; 1999.

- LUSSIER, A.; DE MÉDICIS, R.; TÉTREAULT, L. **Adjuvant arthritis: influence of the adjuvant volume and composition on the non-specific inflammation.** *Int J Tissue React.*3(1):11-5, 1981.
- MEDZHITOV, R. **Inflammation 2010: new adventures of an old flame.** *Cell*, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.
- MEDZHITOV, R. **Origin and physiological roles of inflammation.** *Nature*, v. 454, n. 24, p. 428-435, 2008.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Jr. **Innate immunity.** *N Engl J Med.*, v. 343, p. 338-44, 2000.
- MEOTTI, F.C., et al. **Protective effect of crude extract from *Wedelia paludosa* (Asteraceae) on the hepatotoxicity induced by paracetamol in mice.** *J Pharm Pharmacol.* 58(1):137-42, 2006.
- MERLA, A.; ROMANI, G.L. **Functional infrared imaging in medicine: a quantitative diagnostic approach**, in Proceedings of the 28th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBS '06), pp. 224–227, 2006.
- MESTAS, J.; HUGHES, C.C. **Of mice and not men: differences between mouse and human immunology.** *J Immunol.* 1;172(5):2731-8, 2004.
- MILLWARD, D.J.; GARLICK, P.J.; NNANYELUGO, D.O.; WATERLOW, J.C. **The relative importance of muscle protein synthesis and breakdown in the regulation of muscle mass.** *Biochem J.* 156:185–8, 1976.
- MONTERO-MELENDZ T. **ACTH: the forgotten therapy.** *Semin Immunol.*;27:216–226, 2015.
- MORAIS, J. M.; PAPADIMITRAKOPOULOS, F; BURGESS, D. J. **Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response.** *AAPS J.*, v. 12, n. 2, p. 188-196, 2010.
- MULEY, M.M.; KRUSTEV, E.; McDOUGALL, J.J. **Preclinical Assessment of Inflammatory Pain.** *CNS Neurosci Ther.*;22(2):88-101, 2016.
- MURAYAMA, M.; MORI, T.; BANDO, H.; AMIYA, T. **Studies on the constituents of *Aconitum* species: IX. The pharmacological properties of the pyro-type aconitine alkaloids, components of processed aconite powder *Kako-bushi-matsu*': analgesic, anti-inflammatory and toxic activities.** *J Ethnopharmacol.* 35:159–164, 1991.
- MURPHY, K.; WEAVER, C. **Janeway's immunobiology.** Garland Science, 9th edn, pp 1–924, 2016.
- NARENDHIRAKANNAN, R.T.; SUBRAMANIAN, S.; KANDASWAMY, M. **Anti-inflammatory and lysosomal stability actions of *Cleome gynandra* L. studied in adjuvant induced arthritic rats.** *Food Chem Toxicol.*45:1001–1012, 2007.
- NATHAN, C. **Points of control in inflammation.** *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 846-852, 2002.
- NEGRI, L.; LATTANZI, R.; GIANNINI, E., et al. **Impaired nociception and inflammatory pain sensation in mice lacking the prokineticin receptor PKR1: Focus on interaction between PKR1 and the capsaicin receptor TRPV1 in pain behavior.** *J Neurosci.* 26:6716–6727, 2006.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. **The influence of natural products upon drug discovery.** Nat. Prod. Rep. 17, 215-234,2000.

NG, E.Y.K. **A review of thermography as promising non invasive detection modality for breast tumor.** Int J Therm Sci 48:849–859, 2009.

NISAR, A.; AKHTER, N.; SINGH, G., et al. **Modulation of the helper cytokines and inflammatory mediators by *Atropa accuminata*. Royle in adjuvant induced arthritic tissues.** J Ethnopharmacol;162:215–224, 2015.

NORLING, L. V.; SERHAN, C. N. **Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination.** J.Intern.Med., v. 268, n. 1, p. 15-24, 2010.

NORLING, L. V.; SERHAN, C. N. **Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination.**J.Intern.Med., v. 268, n. 1, p. 15-24, 2010.

OBLINGER, W.; ENGEL, J.M; FRANKE, M. **Thermographic diagnosis of arthritis in peripheral joints.** Z Rheumatol 44:77–81, 1985.

OLIVEIRA, P.G.; BRENOL, C.V.; EDELWEISS, M.I.; MEURER, L.; BRENOL, J.C.; XAVIER, R.M. **Subcutaneous inflammation (panniculitis) in tibio-tarsal joint of rats inoculated with complete Freund's adjuvant.** Clin Exp Med. 7(4):184-7, 2007.

OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; NAKAYAMA, Y.; YAMAMOTO, H.; KAWAMATA, M.; NAMIKI, A. **Effects of a novel selective agonist for prostaglandin receptor subtype EP4 on hyperalgesia and inflammation in monoarthritic model.** Anesthesiology. 97(1):170-6, 2002.

PARVATHY, S.S.; MASOCHA, W. **Gait analysis of c57bl/6 mice with complete Freund's adjuvant-induced arthritis using the catwalk system.** BMC Musculoskelet Disord.14:14; 2013.

PATRIGNANI, P.; PATRONO, C. **Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs.** Biochim Biophys Acta;1851(4):422–432; 2015.

PEARSON, C.M.; WOOD, F.D. **Studies of arthritis and other lesions induced in rats by the injection of mycobacterial adjuvant-VII; Pathological details of arthritis and spondylitis.** Am J Pathol.42:73–95, 1963.

PERRETTI, M. **The resolution of inflammation: new mechanisms in pathophysiology open opportunities for pharmacology.** Semin Immunol. ;27:145–148, 2015.

PETTITI, F.S. **Medicina energética: cura – uma dádiva dos reinos da natureza, Essências Florais e marinhas do Pacífico.** São Paulo: Triom; 1999.

POON, I.K.; LUCAS, C.D.; ROSSI, A.G.; RAVICHANDRAN, K.S. **Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential.** Nat Rev Immunol.;14:166, 2014

PRICE, D.D.; MAO, J.; LU, J.; CARUSO, F.S.; FRENK, H.; MAYER, D.J. **Effects of the combined oral administration of NSAIDs and dextromethorphan on behavioral symptoms indicative of arthritic pain in rats.** Pain 68, 119–127, 1996.

REST, R.F.; SPITZNAGEL, J.K. **Subcellular distribution of superoxide dismutases in human neutrophils. Influence of myeloperoxidase on the measurement of superoxide dismutase activity.** *Biochem. J.* 166 , 145-153, 1977.

RISHTON G., M. **Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: Past successes and present day issues.** *Am J Cardiol.* 2008;101:43D–9,D. 2008

ROHANI, M.G.; PARKS, W.C. **Matrix remodeling by MMPs during wound repair.** *Matrix Biol* 44:113–121, 2015.

SAAG, K.G.; KOEHNKE, R.; CALDWELL, J.R.; BRASINGTON, R.; BURMEISTER, L.F.; ZIMMERMAN, B.; KOHLER, J.A.; FURST, D.E. **Low dose long-term corticosteroid therapy in rheumatoid arthritis: an analysis of serious adverse events.** *American Journal of Medicine* 96, 115–123, 1994.

SCHIMMER, B. P.; FUNDER, J. W. **Pharmacokinetics and pharmacodynamics. The dynamics of drugs absorption, distribution, action, and elimination.** In: BRUNTON L.L.; CHABNER B.A.; KNOLLMANN B.C. (Eds.). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.* 12th ed. New York: McGraw-Hill. chap. 42, p. 1209-1235;2013..

SCHMIDT, B. et al, Ribnicky D. M, Poulev A, Logendra S, Cefalu W. T, Raskin I. **A natural history of botanical therapeutics.** *Metabolism.* 2008;57:9S3–9;2008.

SCHÖNHÖFER, P. **Eine kritische bemerkung zur vergleich- barkeit der wirkung entzündungshemmender pharmaka auf die glucosamin-6-phosphat-synthese in vitro und am rattenpfotenödem in vivo.** *Med Pharmacol Exp.* 16: 66–74, 1967.

SERHAN, C. N.; BRAIN, S. D.; BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; HASLETT, C.; O'NEILL, L. A.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G.; WALLACE, J. L. **Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms.** *FASEB J.*, v. 21, n. 2, p. 325-332, 2007.

SERHAN, C.N.; CHIANG, N; DALLI, J. **The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution.** *Semin Immunol.*;27:200–215. 2015.

SERHAN, C.N.; OLIW, E. **Unorthodox routes to prostanoid formation: new twists in cyclooxygenase-initiated pathways.** *J Clin Invest.*;107(12):1481-9, 2001.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. **Resolution of inflammation: the beginning programs the end.** *Nature Immunology*, v. 6, p. 1199-1205, 2005.

SERHAN, C.N; BRAIN, S.D; BUCKLEY, C.D., et al. **Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms.** *FASEB J.*;21:325–332, 2007.

SERHAN, C.N; SAVILL, J. **Resolution of inflammation: the beginning programs the end.** *Nat. Immunol.* 6, 1191-1197, 2005.

SHEJAWAL, N.; MENON, S.; SHAILAJAN, S. **A simple, sensitive and accurate method for rat paw volume measurement and its expediency in preclinical animal studies.** *Hum Exp Toxicol.* 33(2):123-9, 2014.

SIDDIQI, H.S.; MEHMOOD, M.H.; REHMAN, N.U.; GILANI, A.H. **Studies on the antihypertensive and antidyslipidemic activities of Viola odorata leaves extract.** *Lipids Health Dis.* 10;11:6, 2012.

- SIMJEE, S.U.; JAWED, H.; QUADRI, J.; SAEED, S.A. **Quantitative gait analysis as a method to assess mechanical hyperalgesia modulated by disease-modifying antirheumatoid drugs in the adjuvant-induced arthritic rat.** *Arthritis Res Ther.* 9:R91, 2007.
- SIMMONS, D.L.; BOTTING, R.M.; HLA, T. **Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition.** *Pharmacol Ver.* 56:387–437, 2004.
- SINGER, A.J.; CLARK, R.A. **Cutaneous wound healing.** *N. Engl. J. Med.* 341, 738–746, 1999.
- SINGH, H.; GHOSH, M.N. **Modified plethysmometer for measuring foot volume of unanesthetized rats.** *J. Pharm. Pharmacol.* 20:316–317, 1968.
- SOROKO, M.; DUDEK, K.; HOWELL, K.; JODKOWSKA, E.; HENKLEWSKI, R., **Thermographic evaluation of racehorse performance.** *Journal of Equine Veterinary Science*, vol. 34, no. 9, pp.1076–1083, 2014.
- SOSTRES, C.; GARGALLO, C.J.; LANAS, A. **Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and upper and lower gastrointestinal mucosal damage.** *Arthritis Res Ther.*15(Suppl 3):S3; 2013.
- STEIN, C., MILLAN, M.J.; HERZ, A. **Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: Alterations in behavior and nociceptive thresholds.** *Pharmacol. Biochem. Behav.* 31:445–451, 1988.
- SUNDBERG, J.P.; HOGENESCH, H.; NIKITIN, A.Y.; TREUTING, P.M.; WARD, J.M. **Training mouse pathologists: ten years of workshops on the Pathology of Mouse Models of Human Disease.** *Toxicol Pathol.*40(5):823–5, 2012.
- SWEETMAN S. MARTINDALE. **The Complete Drug Reference.** London: Pharmaceutical Press, 2011.
- Swiss Med Wkly.* 2010 Aug 24;140:w13079; 2010. doi: [10.4414/smw.2010.13079](https://doi.org/10.4414/smw.2010.13079).
- TAKEUCHI, O. **Posttranscriptional regulation of cytokine mrna controls the initiation and resolution of inflammation chronic inflammation.** Springer, Heidelberg, pp 319–332, 2016.
- TASAKA, A.C. Antiinflamatórios não-esteroidais. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p.256–285, 2006.
- TEDGUI, M.; MALLAT, Z. **Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall.** *Circul. Res.*, v.88, p. 877–887, 2001.
- TONELLI, G.; THIBAUT, L.; RINGLER, I. **A bio-assay for the concomitant assessment of the antiphlogistic and thy- molytic activities.** *Endocrinology.* 77: 625–630, 1965.
- TSUMURI, K.; KYUKI, K.; NIWA, M.; KOKUBA, S.; FUJIMURA, H. **Pharmacological investigations of the new anti-inflammatory agent 2-(10, 11-dihydro-10-oxodi- benzo(b,f)thiepin-2-yl) propionic acid.** *Arzneim Forsch/Drug Res.* 36: 1796–1800, 1986.

UMAMAHESWARI, A.; SHREEVIDYA, R.; NUNI, A. **In vitro antibacterial Activity of Bougainvillea spectabilis leaves extracts.** Adv. Biol. Res., 2, 1-5. 2008.

UMAR, M.I.; ASMAWI, M.Z.; SADIKUN, A., et al. **Multi-constituent synergism is responsible for anti-inflammatory effect of *Azadirachta indica* leaf extract.** Pharm. Biol. 52, 1411–1422, 2014.

van EDEN, W.; WAGENAAR-HILBERS, J.P; WAUBEN, M.H. **Adjuvant arthritis in the rat.** Curr Protoc Immunol. Chapter 15:Unit 15.4, 2001.

VIOLA, J.; SOEHNLEIN, O. **Atherosclerosis-A matter of unresolved inflammation.** Semin Immunol.;27:184–193, 2015.

VIRCHOW, R. **Cellular Pathology as based upon Physiological and Pathological History.** Published by J.B. Lippincott, Philadelphia, 1863.

VISHWANADHAM, Y., SUNITHA, D., RAMESH. **Phytochemical Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Different Solvents Extracts of *Ixora javanica* Flowers.** Nat Prod Chem Res. 4: 219, 2016.

WALDER, R.Y.; WATTIEZ, A.S.; WHITE, S.R.; MARQUEZ DE PRADO, B.; HAMITY, M.V.; HAMMOND, D.L. **Validation of four reference genes for quantitative mRNA expression studies in a rat model of inflammatory injury.** Mol. Pain. 10:55, 2014.

WALLACE, J.L.; IANARO, A.; FLANNIGAN, K.L; CIRINO, G. **Gaseous mediators in resolution of inflammation.** Semin Immunol.;27:227–233,2015.

WATANABE, M.; ENDO, Y.; KIMOTO, K., et al. **Inhibition of adjuvant-induced inflammatory hyperalgesia in rats by local injection of neurotrophin-3.** Neurosci Lett. 282:61–64, 2000.

WILCOX, C.M.; CRYER, B.; TRIADAFILOPOULOS, G. **Patterns of use and public perception of over-the-counter pain relievers: focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs.** J Rheumatol. 32:2218–2224, 2005.

WIN B VAN DEN BERG. **Lessons from Animal Models of Arthritis over past decade.** Arthritis Res Ther. 11:250, 2009.

ZHAO, X.H.; ZHANG, T.; LI, Y.Q. **The upregulation of spinal Toll-like receptor 4 in rats with inflammatory pain induced by complete Freund's adjuvant.** Brain Res. Bull. 111:97-103, 2015.

9 ANEXO A (PARECER – CEUA/UFVJM)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Diamantina, 26 de Outubro de 2016.

Certificamos que a proposta intitulada " Avaliação do Potencial Antiinflamatório, Antiedematogênico e Antinociceptivo do Gel Oxyflower® em Modelo de Edema de Pata Quimicamente Induzido ", registrada com o nº 50/2016 sob a responsabilidade de WAGNER DE FÁTIMA PEREIRA - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFVJM) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, em reunião de 26/10/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	19/12/2016 - 18/11/2018
Espécie/linhagem/raça	Rattus norvegicus da linhagem Holtzman
Nº de animais	65
Peso/Idade	6 semanas / 180 – 220 g.
Sexo	Macho
Origem	Biotério UFMG

Com o recebimento deste parecer, o responsável compromete-se a entregar o relatório final da proposta até 60 dias após o término. Em caso de planos de aula, a cada seis meses estes deverão ser revalidados.

Ressaltamos que, conforme a Resolução Normativa 1, de 9 de Julho de 2010, qualquer alteração no protocolo previamente aprovado, na equipe técnica, bem como acidentes envolvendo os animais, competem ao responsável a comunicação a CEUA/UFVJM.


Flavio de Castro Magalhães

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais / UFVJM

Recebido em
03/11/2016
dosmouca

Campus JK
Comissão de Ética no Uso de Animais / UFVJM
Prédio da Renoma-PRPPG - Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 50006 - Alto da Jacuba -
Diamantina/MG - CEP 39100-000 Telefone: +55 (38) 3533-1200

CEUA Comissão de Ética
no Uso de Animais