

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA**

RENNAN ABUD PINHEIRO SANTOS

**EFEITOS DO EXTRATO DE *Arrabidaea chica* Verlot EM MODELO
EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE INDUZIDA EM RATOS**

**São Luís
2014**

RENNAN ABUD PINHEIRO SANTOS

**EFEITOS DO EXTRATO DE *Arrabidaea chica* Verlot EM MODELO
EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE INDUZIDA EM RATOS**

Artigo apresentado ao curso de Medicina da
Universidade Federal do Maranhão como
requisito à obtenção do Grau de Médico

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria do Socorro de
Sousa Cartágenes.

São Luís

2014

Santos, Rennan Abud Pinheiro

Efeitos do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot em modelo Experimental de osteoartrite induzida em ratos. / Rennan Abud Pinheiro Santos.- São Luis, 2014.

34f.

Orientadora: Profª Drª Maria do Socorro de Sousa Cartágenes
Artigo (Graduação) Curso de Medicina, Universidade Federal do Maranhão, 2014

1. Arrabidaea chica Verlot 2. Osteoartrite. 3.Inflamação 4. Dor Crônica I.Cartágenes, Maria do Socorro de Sousa (Orient.). II.Título

CDU 616.8-009.7:582.951.8

RENNAN ABUD PINHEIRO SANTOS

**EFEITOS DO EXTRATO DE *Arrabidaea chica* Verlot EM MODELO
EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE INDUZIDA EM RATOS**

Artigo apresentado ao Curso de Medicina da
Universidade Federal do Maranhão como
requisito à obtenção do Grau de Médico

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria do Socorro de
Sousa Cartágenes

Aprovado em:/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes – Orientadora
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. João Batista Santos Garcia – Examinador 1
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Ms. Lyvia Maria Rodrigues de Sousa Gomes – Examinador 2
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Ms. Elizabeth Teixeira Nogueira Servin – Examinador 3
Universidade Federal do Maranhão

A Deus, por permitir a minha sabedoria e o dom da fé, guiando-me e fortalecendo meus passos nessa caminhada

Aos meus bens mais valiosos, meus pais Orlando Santos e Nádia Santos e meu irmão, Rayan Santos, pelo amor incondicional e suporte emocional. Sem vocês, nada nesse mundo teria o seu real valor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Orlando Santos, por todo o carinho, dedicação, paciência e orientação pessoal, sendo minha maior referência e meu orgulho não só no exercício da medicina, mas pelo seu caráter humano único.

À minha mãe e maior exemplo de pessoa, Nádía Cristina, por todo amor, preocupação e apoio nas horas mais difíceis da minha vida. Pela capacidade especial de agir ora com rigidez e ora com delicadeza nas situações da vida À minha grande fortaleza, minha eterna gratidão.

Ao meu irmão, Rayan Santos, por toda amizade, companheirismo, confiança e suporte na confecção do trabalho. Por todos os conselhos e bondade que me fazem crescer cada dia mais.

À minha querida namorada e melhor amiga, Dayana França, pela compreensão nos momentos de ausência e preocupação em cada passo da minha vida. Obrigado por todo amor nessa caminhada.

Aos meus primos, Leon Hassan e Euler Sauaia, por me acompanharem desde o nascimento, sempre com uma paz de espírito e alegria contagiante.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes, uma verdadeira mãe na pesquisa científica, por todos os ensinamentos e paciência despendida na execução do trabalho.

Aos meus grandes amigos, Eugênio Neto e Pedro Pedro, por todos os conselhos e disponibilidade, principalmente pela oportunidade cedida de participar nessa linha de pesquisa que levarei o aprendizado para toda a vida.

Aos amigos José Antônio Fortes, Elton Cavalcanti, André de Queiroz, Camila de Mello, Gustavo Calado, Luiza Muallem, Prof^a Socorro Cartagenes, Prof^a Lyvia Gomes, Prof^a Elizabeth Servin, Prof. Sebastião Morais, Dona Rosa, Tia Dica e

Carmélia por se dedicarem tanto ao crescimento desta linha de pesquisa com forte entrosamento e amor.

Aos meus amigos, Prof^a. Tereza Melo, Prof^a. Flávia Nascimento, Prof. Marcus Paes, Prof. João Batista, Prof^a. Anamada Carvalho por todos os ensinamentos, carinho, amizade e admiração que levarei para toda vida. Agradeço enormemente por ter tido a oportunidade de aprender como aluno e pessoa.

A todos os funcionários e colaboradores do Laboratório Experimental de Estudo da Dor (LEED) da Universidade Federal do Maranhão por todo o suporte oferecido ao grupo de pesquisa.

Aos laboratórios de Imunologia, Fisiologia e Farmacologia, sempre solícitos quando necessário e por me mostrar o quão grandioso pode ser um trabalho em equipe.

À Liga Acadêmica de Dor do Maranhão (LAD) por todos os anos de aprendizado e oportunidade de crescimento pessoal e intelectual.

À Liga Acadêmica de Cirurgia Experimental (LACEMA) do Maranhão, por ser minha segunda família em grande parte da minha formação acadêmica, sempre me mostrando como lidar com pensamentos diferentes e despertando a paixão pela cirurgia experimental.

Aos amigos que fiz no curso de Medicina, em especial a todos da turma 93 pela grande ajuda, amizade, companheirismo e por fazerem essa caminhada cada dia mais divertida e gratificante. Cada um dentro daquela sala sabe sua importância na minha vida, mas todos contribuem de alguma forma com meu crescimento pessoal. Espero sempre conviver ao lado de vocês.

À Universidade Federal do Maranhão, pelo ambiente de trabalho e profissionalismo.

MUITO OBRIGADO

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito... Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas graças a Deus, não somos o que éramos”.

Martin Luther

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema Ilustrativo do Protocolo Experimental	17
Figura 2. Avaliação da dembulação forçada em ratos tratados com o extrato da <i>Arrabidaea chica</i> Verlot	19
Figura 3. Avaliação da alodinia mecânica em ratos tratados com o extrato da <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.....	20
Figura 4. Avaliação da incapacitação articular estática em ratos tratados com o extrato da <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.....	21
Figura 5. Avaliação da hiperalgesia mecânica em ratos tratados com o extrato da <i>Arrabidaea chica</i> Verlot.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escore de Marcha.....	17
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IA	Intra-articular
MIA	Monoiodoacetato de sódio
OA	Osteoartrite
ACV	<i>Arrabidaea chica</i> Verlot
LEED	Laboratório Experimental de Estudo da Dor
PPA	Peso da pata afetada
PPC	Peso da pata contralateral
LNRP	Limiar nociceptivo de retirada da pata
LNRPA	Limiar nociceptivo de retirada da pata afetada
LNRPC	Limiar nociceptivo de retirada da pata contralateral
MMPs	Metaloproteinases
COX	Ciclooxigenase
VO	Via oral
ROS	Espécies reativas de oxigênio
iNOS	Oxido nítrico sintetase induzida
5-LOX	Lipoxigenase cinco

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	IX
ARTIGO A SER SUBMETIDO	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. MATERIAL E MÉTODO	15
2.1 Animais	15
2.2 Coleta da espécie vegetal e identificação botânica	15
2.3 Preparo do extrato hidroalcoólico.....	15
2.4 Protocolo Experimental.....	16
2.5 Avaliação Clínica.....	17
2.5.1 Avaliação da Atividade Motora - Deambulação Forçada (Teste de Incapacitância dinâmica).....	17
2.5.2 Avaliação da Alodinia Mecânica (<i>Von Frey Test</i>)	17
2.5.3 Teste de Incapacitância Estática (<i>Weight Bearing</i>) - Distribuição do peso nas patas posteriores.....	18
2.5.4 Avaliação da Hiperalgisia Mecânica (<i>Randall Sellito</i>).....	18
2.6 Análises Estatísticas	19
3. RESULTADOS	19
3.1 Efeito do extrato de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot na Deambulação Forçada.....	19
3.2 Efeito do extrato de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot na Alodinia Mecânica.....	20
3.3 Efeito do extrato de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot na Distribuição do Peso das Patas Posteriores.....	20
3.4 Efeito do extrato de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot na Hiperalgisia Mecânica	21
4. DISCUSSÃO.....	22
REFERÊNCIAS	25
ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	28
ANEXO 2 - NORMAS DA PAIN® - The Journal of the International Association for the Study of Pain	29

ARTIGO A SER SUBMETIDO**EFEITOS DO EXTRATO DE *Arrabidaea chica* Verlot EM MODELO
EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE INDUZIDA EM RATOS**

Effect of *Arrabidaea chica* Verlot extract in a model of osteoarthritis induced in
rats

(PAIN® - The Journal of the International Association for the Study of Pain)

Rennan Abud Pinheiro Santos¹
Maria do Socorro de Sousa Cartágenes²

Trabalho realizado no Laboratório Experimental de Estudo da Dor (LEED) da Universidade Federal do Maranhão, em São Luís, Brasil. Curso de Medicina.

1- Graduando do Curso de Medicina da Universidade Federal do Maranhão

2- Professora Adjunta Doutora da Universidade Federal do Maranhão

RESUMO

Objetivo: No presente estudo, avaliou-se o efeito do extrato hidroalcoólico de folhas da *Arrabidaea chica* Verlot (ACV) por via oral, em modelo experimental de osteoartrite (OA) em ratos. **Material e Método:** Os animais foram distribuídos em três grupos com seis animais (n=18). Em dois grupos (OA-Salina e OA-Fitoterápico) foi induzida OA com uma única injeção intra-articular (IA) de monoiodoacetato de sódio (MIA) no joelho direito, e no terceiro grupo (Sem OA) não foi induzida OA. Os animais do grupo OA-Fitoterápico receberam tratamento (50 mg/kg VO) a partir do 7º dia após a indução até o final do experimento (28º dia), enquanto o grupo OA-Salina recebeu mesmo volume de NaCl à 0,9%. Os animais foram avaliados quanto aos sinais comportamentais de dor crônica nos dias zero, cinco, 14, 21, 28 após a indução da OA nos testes de alodinia mecânica (*Von Frey*), hiperalgesia mecânica (*Randall Sellito*), distribuição dos pesos das patas posteriores (*Weight Bearing*) e deambulação forçada (Teste de incapacitância articular dinâmica). **Resultados:** A injeção de MIA causou a osteoartrite com os sinais clássicos de alodinia e hiperalgesia mecânica significativamente. O tratamento dos animais com o extrato de ACV (50 mg/Kg) reduziu a intensidade destes sinais a partir do 14º dia até o final do período de observação em 39% quanto a alodinia e 12% quanto a hiperalgesia mecânica. Além disso, a partir do 14º de experimento, a ACV atenuou o déficit em 53% na distribuição do peso das patas posteriores dos animais de forma significativa e melhorou parcialmente a deambulação forçada. **Conclusão:** Conclui-se que o extrato de ACV melhorou os comportamentos de dor crônica no modelo experimental de OA em ratos.

Palavras-chave: *Arrabidaea chica* Verlot, Osteoartrite, Inflamação, Dor crônica

ABSTRACT

Aim: In the present study, it was evaluated the effect of leaves of *Arrabidaea chica* Verlot (ACV) extract utilized by oral form in an experimental model of osteoarthritis (OA) in rats. **Method:** The animals were distributed into three groups of six animals (n=18). Into two groups (OA-Salina and OA-Fitoterápico) it was induced the OA with a single intra-articular (IA) injection of monossodium iodoacetato (MIA) in the right knee, and the third group (No OA) was not induced OA. The animals of the OA-Fitoterápico group received treatment (50 mg / kg orally) from the 7th day after the induction until the end of the experiment (day 28) as OA-saline group received the same volume of 0.9% NaCl. The animals were evaluated for behavioral signs of chronic pain on days zero, five, 14, 21, 28 after induction of OA on mechanical allodynia test (Von Frey), mechanical hyperalgesia (Randall Sellito), weight distribution of the hind limbs (Weight Bearing) and forced ambulation (Dinamic Incapacitance Test). **Results:** The MIA injection induced osteoarthritis with the classic signs of allodynia and hyperalgesia mechanics. Treatment of animals with ACV extract (50 mg / kg) reduced the intensity of these signals from the 14th day to the end of this study by 39% as allodynia and 12% for mechanical hyperalgesia. Furthermore, from the experiment 14th day, the ACV attenuated the impairment in 53% of the weight distribution of the hind paws of the animals and significantly improved partially forced ambulation. **Conclusion:** We conclude that the ACV extract improved the behavior of chronic pain in the experimental model of OA in rats.

Keywords: *Arrabidaea chica* Verlot, Osteoarthritis, Inflammation, Chronic Pain

1. INTRODUÇÃO

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstram que 15% a 20% da população mundial é afetada pela osteoartrite ou osteoartrose (OA) e cerca de 70% da população com mais de 65 anos possui a doença. Ela é considerada a doença musculoesquelética mais frequente e sua prevalência é crescente com o aumento da expectativa de vida da população [11]. Acomete principalmente as articulações dos joelhos, quadris, mãos e coluna vertebral [10].

No Brasil, a prevalência da osteoartrite é cerca de 16,2%, sendo que aos 75 anos, 85 % das pessoas apresentarão evidências clínicas ou radiológicas da doença. Ela é uma afecção de progressão lenta, caracterizada por degeneração progressiva da cartilagem que leva à dor, rigidez e perda da função articular [23].

Ainda hoje, existe um paradoxo quanto à terminologia da doença levando em consideração seu processo etiopatogênico: uma patologia essencialmente degenerativa (osteoartrose) ou inflamatória (osteoartrite) [3]. Na verdade, existe um desequilíbrio entre a condroformação e a condrodegeneração dos condrócitos, mediado por citocinas e fatores de crescimento que levam a um estado de hiperatividade funcional celular culminando em uma sinovite persistente [33].

Os mecanismos de dor na OA ainda não estão esclarecidos, mas acredita-se que o quadro algico seja mediado e mantido pela sensibilização central e periférica, principalmente devido à presença de nociceptores em vários locais articulares, tais como membrana sinovial, osso subcondral, tendão, ligamentos e periósteo, uma vez que identificou-se terminações nervosas livres na sinovia de ratos e humanos [1; 6].

Avanços no entendimento da fisiopatologia da OA permitiram com que houvesse aumento considerável nos alvos terapêuticos e algumas medicações têm sido associadas à diminuição da progressão das lesões cartilaginosas, com redução da remodelação óssea subcondral [32].

No processo de descoberta e desenvolvimento de novos compostos farmacologicamente ativos, os recursos naturais, especialmente de origem vegetal, representam importante fonte de drogas [26].

Com a aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde, o Ministério da Saúde está buscando incorporar e implementar a Fitoterapia como recurso terapêutico na perspectiva de prevenir agravos e promover a recuperação da saúde; contribuindo no acesso e o uso seguro, eficiente, eficaz e com qualidade dessa prática complementar [28].

A *Arrabidaea chica* Verlot é encontrada da Amazônia e utilizada desde tempos imemoriais pelos índios para a pintura de corpos e utensílios [26], cunhada pelos nativos como “crajiú”, é uma espécie vegetal conhecida popularmente por suas propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes e imunomoduladoras [15; 35]. Seus compostos isolados como as antocianinas, flavonoides e esteroides têm sido alvo de estudo devido suas ações como anti-inflamatórios [31], antioxidantes [18] e vasodilatadores, além de outras propriedades biológicas. A via de administração influencia na ação do extrato de ACV, sendo que sua aplicabilidade mais frequente

seria quando administrada por via subcutânea e intraperitoneal, necessitando de mais relatos quanto ao uso da por via oral [22].

Diante desse comprovado efeito anti-inflamatório do extrato das folhas de ACV e do papel da inflamação na fisiopatologia da osteoartrite, nos motivou a investigar o efeito deste extrato, quando administrado por via oral, na evolução da patologia induzida em ratos através parâmetros clínicos.

2. MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi realizado no Laboratório Experimental de Estudo da Dor (LEED), localizado no campus do Bacanga da Universidade Federal do Maranhão, no ano de 2014. Foi submetido à análise e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal do Maranhão sob protocolo de número 23115006307/2010-(ANEXO 1). Os equipamentos necessários para a realização dos experimentos estão disponíveis no LEED.

2.1 Animais

Foram utilizados 18 *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, pesando aproximadamente 200g-250g, machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, Brasil. Os animais foram confinados em gaiolas (n=3/gaiola) no Biotério Setorial do Laboratório Experimental de Estudo da Dor (LEED) mantidos sob ciclo claro-escuro de 12 horas, em um ambiente com temperatura controlada ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com fornecimento de água e ração *ad libitum*. Uma semana antes de iniciar o protocolo experimental, os animais foram submetidos aos testes comportamentais diariamente para adaptação nos aparelhos.

2.2 Coleta da espécie vegetal e identificação botânica

Foram coletadas folhas adultas de *Arrabidaea chica* Verlot em habitat natural [28] nos períodos de seca e chuva, em atendimento as determinações estabelecidas na literatura especializada [8]. A planta foi identificada no Setor de Botânica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão (Herbário Ático Seabra) e uma exsicata do material botânico encontra-se depositada sob o número de registro 1067.

2.3 Preparo do extrato hidroalcoólico

O material vegetal coletado foi seco a 40°C em estufa com circulação de ar e em seguida pulverizado em moinho elétrico para obtenção do pó, que foi embebido em álcool etílico a 92% na proporção de 1:4 (v/v) e posto em maceração, sob agitação manual diária. A extração alcoólica do macerado foi realizada mediante três trocas sucessivas a cada 72 horas, com a renovação do solvente. Ao final deste processo, o extrato foi reunido e filtrado com gaze. O filtrado foi concentrado em rotaevaporador (MARCON), à pressão reduzida e à temperatura de 44°C . Deste processo foi obtido o extrato hidroalcoólico, que foi acondicionado em frasco âmbar e conservado sob refrigeração (5°C).

Na determinação do peso seco foram utilizadas três alíquotas de 0,5 mL do extrato hidroalcoólico em béqueres secos previamente tarados. As alíquotas tiveram seu solvente evaporado sob corrente de ar quente e os béqueres após resfriamento, pesados em balança analítica (SARTORIUS) para determinação do peso seco dos resíduos. Esta operação foi repetida sucessivas vezes até obtenção de pesos constantes. Para cálculo do rendimento (%) utilizou-se o peso total do pó, o peso seco obtido e o volume final total do extrato concentrado.

Quando necessárias, pequenas alíquotas, determinadas previamente em função do peso seco do extrato e do peso dos animais, foram pipetadas em béqueres, o solvente foi evaporado sob corrente de ar quente e em seguida o volume foi completado para concentração desejada com água destilada ou solução fisiológica, conforme a via de administração a ser utilizada.

2.4 Protocolo Experimental

Neste estudo, utilizou-se um modelo experimental de osteoartrite com monoiodoacetato de sódio (MIA), pois a indução com esta substância possui características específicas que se aproximam das alterações importantes que ocorrem na OA, tais como esclerose do osso subcondral, formação de osteófitos, lesão da cartilagem e alterações de biomarcadores como glicosaminoglicanos e metaloproteinases [7; 12].

Os animais foram anestesiados através de isoflurano à 1%. Após certificação do plano anestésico, realizou-se a tricotomia da pata posterior direita, posteriormente antissepsia local com solução tópica de polivinilpirrolidona iodo 10%. A lesão articular foi induzida por uma única injeção intra-articular de 3 mg de MIA neste joelho, diluídos em um volume máximo de 50 µL de solução. Com a perna flexionada, na altura do joelho, em um ângulo de aproximadamente 90°, a solução de MIA foi injetada através do ligamento patelar utilizando uma agulha 26GX3/8, no espaço intra-articular entre tíbia e fêmur [9].

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos (Sem OA, OA-Salina, OA-Fitoterápico) com seis animais cada (n=18). Nos animais dos grupos OA-Salina e OA-Fitoterápico foram induzidos osteoartrite com monoiodoacetato de sódio (MIA) no joelho direito. Durante o experimento os animais foram avaliados periodicamente quanto à atividade motora (Deambulação Forçada – Teste de incapacitância dinâmica), distribuição dos pesos nas patas posteriores (*Weight Bearing*), avaliação da alodinia mecânica através do aparelho de *Von Frey* digital, avaliação da hiperalgesia mecânica (*Randal Sellito*). Os animais foram avaliados no dia zero, cinco, 14, 21 e 28 utilizando a metodologia citada acima. A partir do 7º dia após a indução da osteoartrite, o grupo OA-Fitoterápico recebeu tratamento oral com o extrato de *Arrabidaea chica* Verlot (50mg/kg), o grupo OA-Salina, soro fisiológico à 0,9% no mesmo volume e o grupo Sem OA permaneceu sem tratamento. Os animais foram mortos com dose letal do anestésico (Figura 1).

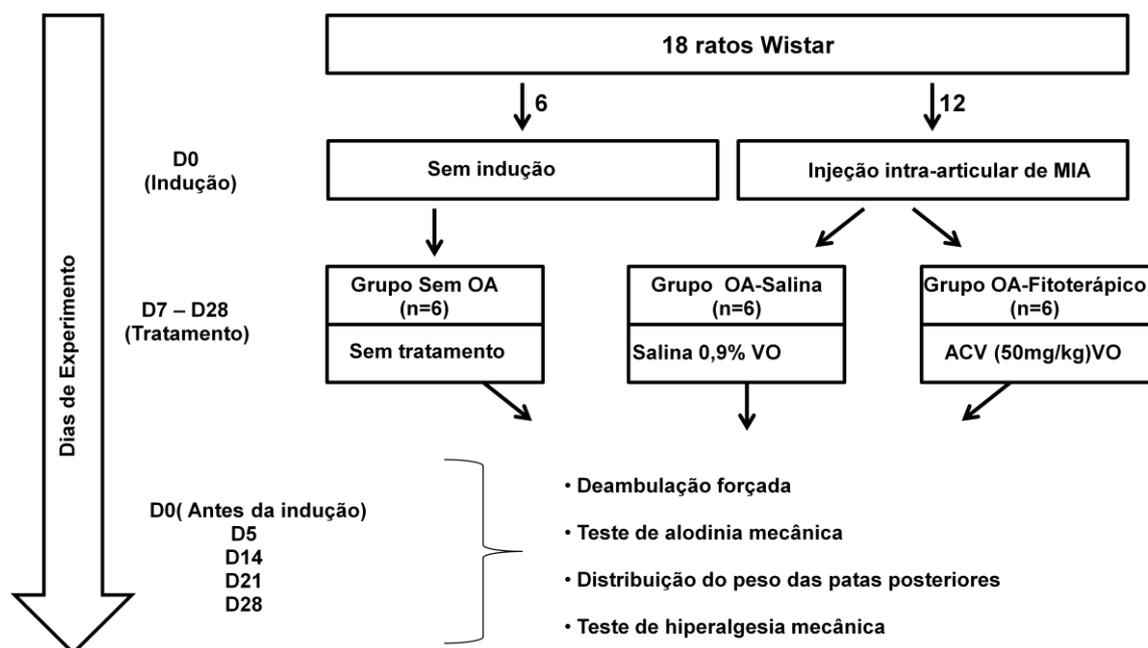


Figura 1. Esquema Ilustrativo do Protocolo Experimental

2.5 Avaliação Clínica

2.5.1 Avaliação da Atividade Motora - Deambulação Forçada (Teste de Incapacitância dinâmica)

Os animais foram colocados em um *Rotarod* (modelo IITC Life Science, Califórnia, Estados Unidos) na velocidade de 16 rpm por um período de tempo de 5 minutos. A utilização do membro afetado foi avaliada pela deambulação forçada. O uso da pata foi graduado em uma escala numérica que varia de 5 a 1 [16] (Tabela 1).

Tabela 1. Escore de Marcha

5	Uso Normal do Membro
4	Claudicação leve
3	Claudicação grave
2	Intermitente desuso da pata afetada
1	Completo desuso da pata afetada

2.5.2 Avaliação da Alodinia Mecânica (*Von Frey Test*)

A alodinia, resposta dolorosa a um estímulo que normalmente é indolor, foi avaliada pelo teste de *Von Frey*, por meio da utilização de um analgesímetro digital (Modelo Insight São Paulo, Brasil), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O aparelho é calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g

até a força de 80 g. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, medindo 12x20x17cm, cujo assoalho consiste em um rede de malha igual a 5mm², constituída de arame não maleável de 1mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento. O experimentador aplicou, por entre as malhas da rede e por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0.5mm de diâmetro, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do rato até o animal produzir uma resposta caracterizada como sacudida (“*flinch*”) da pata estimulada. Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, até o animal apresentar três medidas similares com uma clara resposta de “*flinch*” após a retirada da pata [16].

A fórmula utilizada para avaliação da alodinia foi:

$$\text{LNRP}(\%) = \frac{\text{LNRPA}}{\text{LNRPA} + \text{LNRPC}} \times 100$$

em que LNRP é o limiar nociceptivo de retirada da pata, LNRPA é o limiar nociceptivo de retirada da pata afetada e LNRPC, limiar nociceptivo da pata contralateral.

2.5.3 Teste de Incapacitância Estática (*Weight Bearing*) - Distribuição do peso nas patas posteriores

Utilizou-se um teste de Incapacitância Estática “*Weight Bearing*” (modelo IITC Life Science, Califórnia, Estados Unidos) que determina a distribuição do peso do animal nas patas posteriores. Os animais foram colocados em uma câmara de acrílico angulada, posicionados, de modo que, cada pata posterior repousasse sobre plataformas diferentes. O peso exercido sobre cada pata posterior (mensurado em gramas) foi avaliado em um período de cinco segundos. A aferição final da distribuição do peso foi dada por uma média de três aferições. As alterações na distribuição do peso nas patas posteriores foram calculadas da seguinte maneira:

$$\text{Distribuição de peso}(\%) = \frac{\text{PPA}}{(\text{PPA} + \text{PPC})} \times 100$$

em que PPA é o peso da pata afetada e PPC o peso da pata contralateral [5].

2.5.4 Avaliação da Hiperalgisia Mecânica (*Randall Sellito*)

A hiperalgisia mecânica foi avaliada através do teste comportamental de *Randall & Sellito*, medindo os limiares de retirada da pata a um estímulo crescente de pressão colocada na região plantar da pata posterior usando um analgesímetro, empregando uma probe em formato de cunha (área 1.75mm²) e um corte de 250g. Realizaram-se três aferições nas patas ipsilaterais e contralaterais, antes e após a indução de osteoartrite em intervalos regulares. Os dados foram expressos com limiares de retirada em gramas de força exercida, e os efeitos das drogas como a reversão dos percentuais de hiperalgisia [25].

A fórmula utilizada para avaliação da hiperalgisia mecânica foi:

$$\text{LNRP}(\%) = \frac{\text{LNRPA}}{\text{LNRPA} + \text{LNRPC}} \times 100$$

em que LNRP é o limiar nociceptivo de retirada da pata, LNRPA é o limiar nociceptivo de retirada da pata afetada e LNRPC, limiar nociceptivo da pata contralateral.

2.6 Análises Estatísticas

A comparação das médias de diferentes grupos experimentais foi realizada através do Teste de Kruskal-Wallis para as variáveis qualitativas ordinais e com análise de variância univariada (One-way ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para as variáveis numéricas. O valor de $P < 0,05$ foi considerado como indicativo de significância e os dados obtidos foram analisados utilizando-se o software Graphpad Prism 5® (GraphPad software, San Diego, CA).

3. RESULTADOS

3.1 Efeito do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot na Deambulação Forçada

Cinco dias após a injeção de MIA, os ratos apresentaram uma diminuição no escore de marcha de deambulação forçada, sendo esta diminuição estatisticamente significativa nos grupos OA-Fitoterápico e OA-Salina em relação ao grupo Sem OA. Com o tratamento oral do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot, os animais apresentaram uma melhora na marcha, notando-se que no 14º dia após a indução de osteoartrite, o grupo OA-Fitoterápico mostrou uma melhora em relação ao grupo OA-Salina, se aproximando da normalidade do grupo Sem OA, entretanto o grupo OA-Salina e Sem OA manteve a diferença estatisticamente significativa. No 21º dia de OA, todos os grupos apresentavam marcha semelhante (Figura 2).

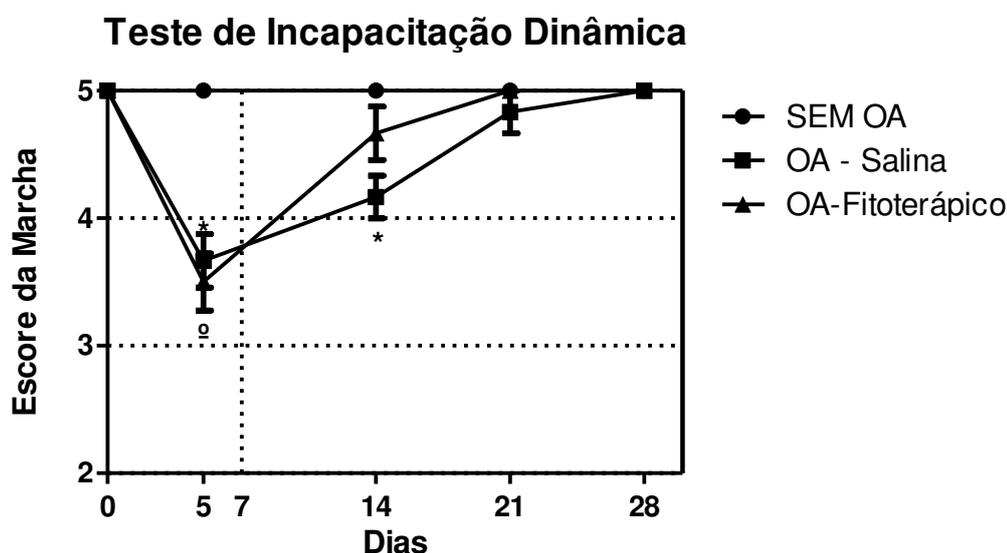


Figura 2. Avaliação da deambulação forçada em ratos tratados com o extrato da *Arrabidaea chica* Verlot (50 mg/kg, VO) e Salina (NaCl 0,9%) administrados a partir do 7º dia após a indução de OA. Os dados estão representados pelo escore de marcha. Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). A linha vertical tracejada indica o início do tratamento. * Indica diferença estatisticamente significativa do grupo OA- Salina e SEM OA. ° Indica diferença estatisticamente significativa do grupo OA – Fitoterápico em relação ao grupo Sem OA.

3.2 Efeito do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot na Alodinia Mecânica

A injeção de MIA induziu alodinia mecânica nos animais, conforme demonstrou o limiar nociceptivo de retirada da pata dos animais através do teste de *Von Frey* digital, mostrando uma diminuição estatisticamente significativa nos grupos OA-Fitoterápico e OA-Salina em relação ao grupo Sem OA. O tratamento com o extrato de *Arrabidaea chica* Verlot reduziu a intensidade de alodinia a partir de sua administração (7º dia) até o final do experimento (28º dia) em 39%, com diferença estatisticamente significativa a partir do 14º dia entre os grupos OA- Salina e OA-Fitoterápico. Nota-se um resultado semelhante entre os grupos de Sem OA e OA-Fitoterápico a no 28º dia do experimento (Figura 3).

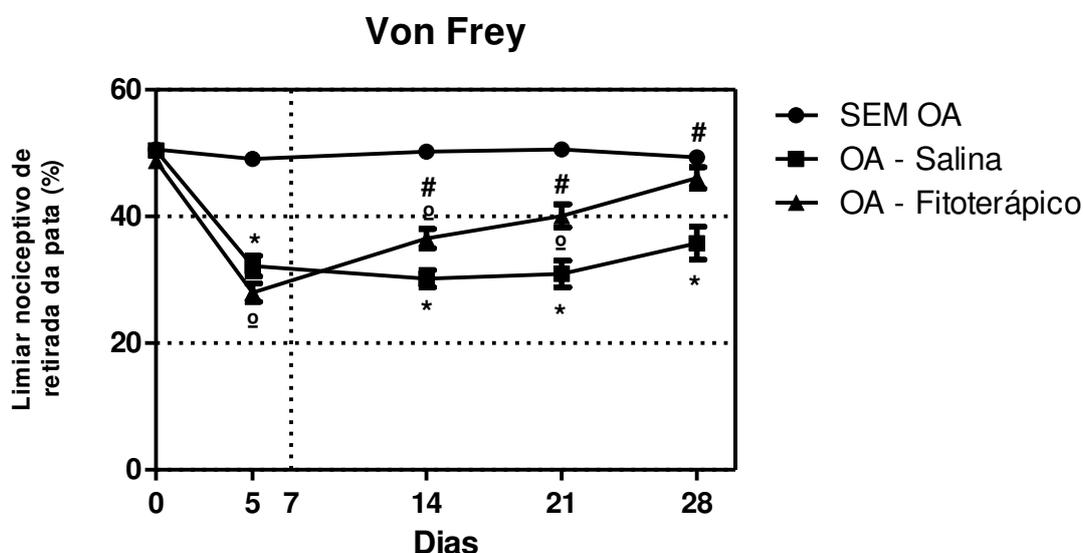


Figura 3. Avaliação da alodinia mecânica em ratos tratados com o extrato da *Arrabidaea chica* Verlot (50 mg/kg, VO) e Salina (NaCl 0,9%) administrados a partir do 7º dia após a indução de OA. Os símbolos e linhas verticais indicam a média \pm erro padrão das médias. ANOVA – Teste de Tukey ($p < 0,05$). A linha vertical tracejada indica o início do tratamento. * Indica diferença estatisticamente significativa do grupo OA- Salina e SEM OA. ° Indica diferença estatisticamente significativa do grupo OA – Fitoterápico em relação ao grupo ao grupo Sem OA. # Indica diferença estatisticamente significativa do grupo OA – Fitoterápico em relação ao grupo OA- Salina

3.3 Efeito do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot na Distribuição do Peso das Patas Posteriores

Após a injeção de MIA, os animais passaram a apresentar sinais de desconforto articular distribuindo o peso predominantemente na pata saudável, sendo esta diminuição estatisticamente significativa entre os três grupos analisados. O tratamento oral com o fitoterápico atenuou o déficit na distribuição do peso do animal de forma significativa a partir do 14º dia de indução de OA até o final do experimento (aproximadamente duas semanas) em 53%. No 28º dia de experimento, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo OA-Fitoterápico e Sem OA (Figura 4).

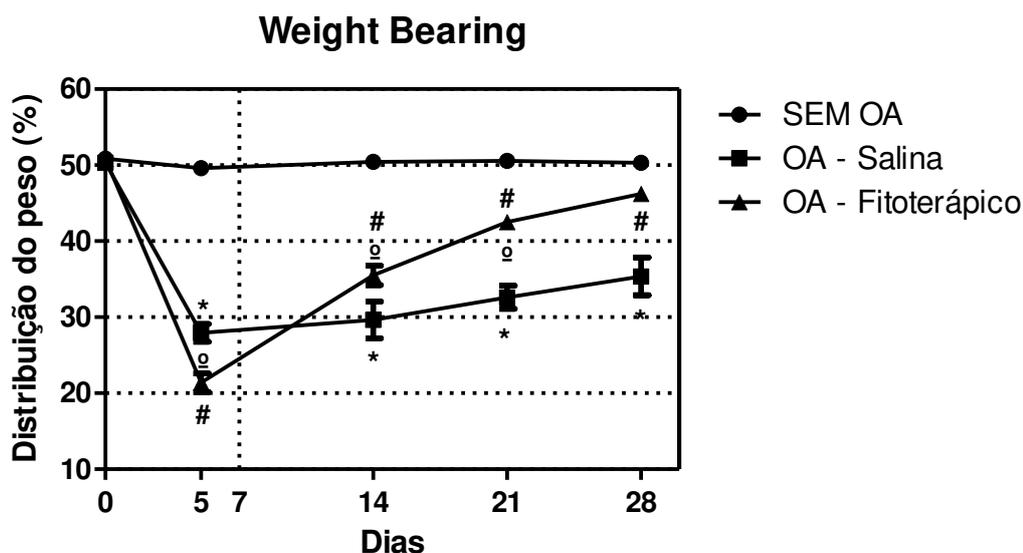


Figura 4. Avaliação da incapacitação articular em ratos tratados com o extrato da *Arrabidaea chica* Verlot (50 mg/kg, VO) e Salina (NaCl 0,9%) administrados a partir do 7º dia após a indução de OA. Os símbolos e linhas verticais indicam a média \pm erro padrão das médias. ANOVA – Teste de Tukey ($p < 0,05$). A linha vertical tracejada indica o início do tratamento. * Indica diferença estatisticamente significativa do grupo OA- Salina e SEM OA. ° Indica diferença estatisticamente significativa do grupo OA – Fitoterápico em relação ao grupo ao grupo Sem OA. # Indica diferença estatisticamente significativa do grupo OA – Fitoterápico em relação ao grupo OA- Salina

3.4 Efeito do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot na Hiperálgia Mecânica

O MIA induziu de forma significativa a hiperálgia mecânica nos grupos OA-Fitoterápico e OA-Salina relação ao grupo Sem OA no 5º dia após a sua injeção. O tratamento com o extrato de ACV melhorou a hiperálgia mecânica dos animais em 12%, onde o grupo OA-Fitoterápico mostrou uma diferença estatisticamente significativa em relação ao OA-Salina no 14º dia. Os animais apresentaram resultados semelhantes a partir do 21º dia do experimento. (Figura 5).

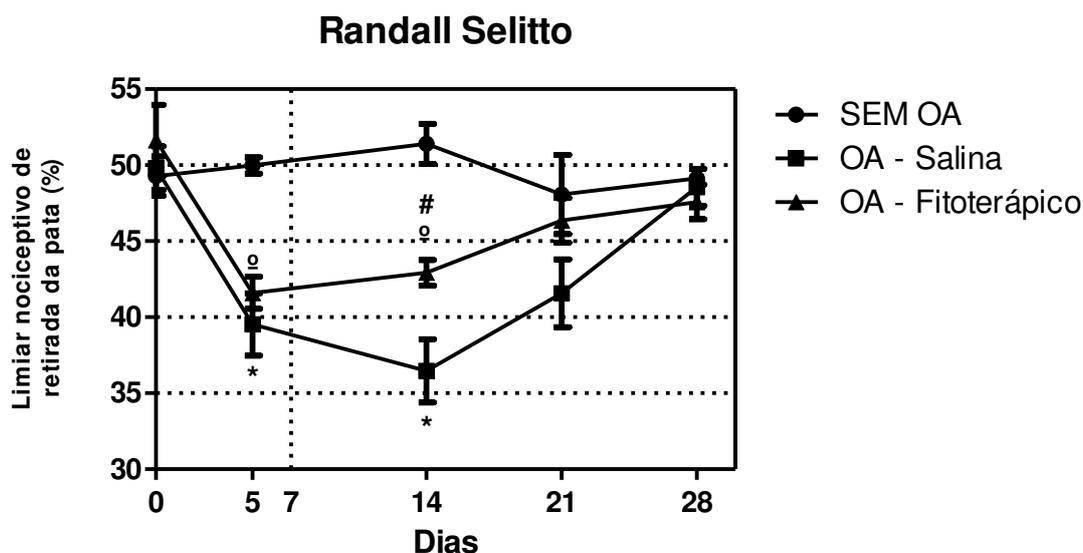


Figura 5. Avaliação da hiperalgesia mecânica em ratos tratados com o extrato da *Arrabidaea chica* Verlot (50 mg/kg, VO) e Salina (NaCl 0,9%) administrados a partir do 7º dia após a indução de OA. Os símbolos e linhas verticais indicam a média \pm erro padrão das médias. ANOVA – Teste de Tukey ($p < 0,05$). A linha vertical tracejada indica o início do tratamento. * Indica diferença estatisticamente significativa do grupo OA- Salina e SEM OA. ° Indica diferença estatisticamente significativa do grupo OA – Fitoterápico em relação ao grupo ao grupo Sem OA. # Indica diferença estatisticamente significativa do grupo OA – Fitoterápico em relação ao grupo OA- Salina

4. DISCUSSÃO

Os compostos naturais com diferentes mecanismos de ação podem ser usados para tratar doenças inflamatórias [29], especialmente a partir de plantas a serem utilizadas para tais finalidades. Muitas espécies utilizadas tradicionalmente têm mostrado sua aplicação terapêutica. O presente estudo demonstrou propriedades anti-inflamatórias e analgésicas do tratamento oral de *Arrabidaea chica* Verlot em um modelo de osteoartrite através de parâmetros clínicos.

A injeção intra-articular do MIA, como avaliado em outras pesquisas, provocou a degeneração dos condrócitos através da inibição do 3-fosfogliceraldeído, resultando em OA [9; 30]. Neste estudo, esse efeito levou a uma redução do escore de marcha dos animais induzidos, em que a utilização do extrato de ACV melhorou a deambulação forçada a partir da segunda semana. Com a progressão da OA, a dor torna-se contínua, difusa e basicamente mecânica, isto é protocinética. No entanto a utilização da ACV foi capaz de diminuir a síntese e ativação da MMP-9, estimular o colágeno total e a MMP-2, além de melhorar a recuperação da marcha em animais com lesão do tendão de Achilles [2]. Então, faz-se necessário uma avaliação mais objetiva para elucidar como o extrato seria capaz de atuar na marcha dos animais nas fases mais tardias da osteoartrite.

A sensibilização periférica faz parte da patogênese da OA devido a uma ação aumentada nos terminais de nociceptores, decorrentes do efeito de

neuromediadores inflamatórios, levando a chamada alodinia e hiperalgesia e conseqüentemente uma diminuição do limiar da dor, indução de descargas ectópicas e aumento dos canais de sódio [4; 13; 19]. O uso do MIA provocou uma diminuição do limiar doloroso nos teste de *Von Frey* e *Randall Sellito*, em que o extrato da ACV melhorou a alodinia a partir do 14º dia até o final do experimento e a hiperalgesia mecânica no 14º dia. É possível que haja uma ação periférica da *Arrabidaea chica*, assim como foi evidenciado em outra espécie do mesmo gênero (*Arrabidaea brachypoda*) devido a semelhança dos seus compostos ativos, onde a ultima mostrou efeito antinociceptivo periférico, além de mostrar uma atividade anti-inflamatória por inibir o recrutamento de leucócitos em um modelo de peritonite induzida por polissacarídeos [27].

Alterações na distribuição do peso entre as patas posteriores foram utilizadas como indicadores de desconforto articular e presença de inflamação e dor provocadas pela indução da osteoartrite [17]. A ação do MIA é dose e tempo dependente, ou seja, com três dias após administração, tem-se uma fase aguda inflamatória, seguida de uma fase crônica degenerativa em torno do 14º dia, com componente neuropático e alterações do osso subcondral [14; 24]. Neste estudo, o efeito da injeção intra-articular do MIA também se mostrou evidente na assimetria de peso entre as patas posteriores dos animais, onde o extrato hidroalcoólico conseguiu reduzir esse desconforto a partir da segunda semana até o final do experimento, não mostrando o comportamento doloroso bifásico, evidenciando uma possível ação não só no caráter inicial da patogênese da osteoartrite, mas também diminuindo a sensibilização central e conseqüentemente aliviando o desconforto articular do animal.

Apesar de não haver até o presente momento estudos com uma metodologia de avaliação clínica semelhante, os resultados encontrados nessa pesquisa poderiam ser explicados pela atividade anti-inflamatória do extrato da *Arrabidaea chica* Verlot, como demonstrado por Zorn em 2001, onde notou que o extrato era capaz de inibir o fator de transcrição nuclear kappa B, evitando com isso a formação de citocinas e enzimas inflamatórias como iNOS, COX-2, 5-LOX e fosfolipase A2 citosólica [35].

O estresse oxidativo do processo inflamatório implica em um estado de distúrbio celular, onde as espécies reativas de oxigênio (ROS), juntamente com as metaloproteinases (MMPs) degradam os componentes da matriz articular, oxidam fatores de transcrição e levam a morte celular. Os componentes ativos da ACV, mais precisamente os flavonoides e carotenoides, possuem uma ação antioxidante, atenuando dessa forma a degradação da cartilagem articular [20; 21; 34]

Outra provável explicação para melhora clínica dos animais avaliados seria a atividade das antocianinas no sentido de inibir a atividade da cicloxigenase I e II, bem como de suprimir a produção do óxido nítrico [31].

Dessa forma, novos estudos com a aplicação oral do extrato de *Arrabidaea chica* visando um possível efeito anti-inflamatório e analgésico podem ser realizados, objetivando ampliar o conhecimento e desfazer as possíveis divergências

que existem na literatura. E, apesar da melhora clínica apresentada pelos animais no estudo, sua metodologia não é capaz de definir de forma clara quais seriam os principais mecanismos de ação da ACV envolvidos.

Ao final desse estudo, podemos concluir que a utilização do extrato hidroalcoólico de *Arrabidaea chica* Verlot na dose de 50 mg/kg via oral a partir do 7º dia após a indução da osteoartrite, foi capaz de reduzir as alterações comportamentais (marcha, distribuição do peso nas patas posteriores, alodinia e hiperalgesia mecânica) e portanto melhorou o padrão clínico e reduziu a dor crônica em um modelo experimental de osteoartrite em ratos.

REFERÊNCIAS

- [1] Ahmed AS, Li J, Erlandsson-Harris H, Stark A, Bakalkin G, Ahmed M. Suppression of pain and joint destruction by inhibition of the proteasome system in experimental osteoarthritis. **Pain** 2012;153(1):18-26.
- [2] Aro AA, Simoes GF, Esquisatto MAM, Foglio MA, Carvalho JE, Oliveira ALR, Gomes L, Pimentel ER. Arrabidaea chica extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the Achilles tendon. **Injury-Int J Care Inj** 2013;44(7):884-892.
- [3] Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). **Osteoarthritis and Cartilage** 2013;21(1):16-21.
- [4] Bonnet CS, Walsh DA. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. **Rheumatology (Oxford)** 2005;44(1):7-16.
- [5] Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, Huber CM, Guzman RE, Juneau PL, Schrier DJ, Kilgore KS. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage** 2003;11(11):821-830.
- [6] Brandt KD. Neuromuscular aspects of osteoarthritis: a perspective. **Novartis Found Symp** 2004;260:49-58; discussion 58-63, 100-104, 277-109.
- [7] Combe R, Bramwell S, Field MJ. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: A model of chronic nociceptive pain in rats? **Neuroscience Letters** 2004;370(2-3):236-240.
- [8] Costa AF. **Farmacognosia**, Vol. 2. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.
- [9] Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, Fox A, Rediske J, Pellas T, Kidd B, Bevan S, Winter J. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. **Pain** 2004;112(1-2):83-93.
- [10] Figueiredo Neto EM, Queluz TT, Freire BFA. Physical activity and its association with quality of life in patients with osteoarthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia** 2011;51(6):544-549.
- [11] Fuller R. Osteoartrose. In: AC Lopes, editor. Tratado de Clínica Médica, Vol. 1. São Paulo: Roca, 2006. pp. 1721-1729.
- [12] Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Mono-Iodoacetate-Induced Histologic Changes in Subchondral Bone and Articular Cartilage of Rat Femorotibial Joints: An Animal Model of Osteoarthritis. **Toxicologic Pathology** 2003;31(6):619-624.
- [13] Im HJ, Kim JS, Li X, Kotwal N, Sumner DR, Davis FJ, Yan D, Levine B, Kroin JS, Van Wijnen AJ, Henry JL, Desevré J. Alteration of sensory neurons and spinal response to an experimental osteoarthritis pain model. **Arthritis and Rheumatism** 2010;62(10):2995-3005.
- [14] Ivanavicius SP, Ball AD, Heapy CG, Westwood FR, Murray F, Read SJ. Structural pathology in a rodent model of osteoarthritis is associated with neuropathic pain: Increased expression of ATF-3 and pharmacological characterisation. **Pain** 2007;128(3):272-282.

- [15] Jorge MP, Madjarof C, Ruiz ALTG, Fernandes AT, Rodrigues RAF, Sousa IMD, Foglio MA, Carvalho JE. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. **J Ethnopharmacol** 2008;118(3):361-366.
- [16] Kalff KM, El Mouedden M, van Egmond J, Veening J, Joosten L, Scheffer GJ, Meert T, Vissers K. Pre-treatment with capsaicin in a rat osteoarthritis model reduces the symptoms of pain and bone damage induced by monosodium iodoacetate. **European Journal of Pharmacology** 2010;641(2-3):108-113.
- [17] King T, Rao S, Vanderah T, Chen QM, Vardanyan A, Porreca F. Differential blockade of nerve injury- induced shift in weight bearing and thermal and tactile hypersensitivity by milnacipran. **J Pain** 2006;7(7):513-520.
- [18] Kähkönen MP, Heinonen M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. **Journal of agricultural and food chemistry** 2003;51(3):628-633.
- [19] Lorenz H, Richter W. Osteoarthritis: Cellular and molecular changes in degenerating cartilage. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry** 2006;40(3):135-163.
- [20] Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. **Journal of cellular physiology** 2002;192(1):1.
- [21] Moon SJ, Jeong JH, Jhun JY, Yang EJ, Min JK, Choi JY, Cho ML. Ursodeoxycholic Acid ameliorates pain severity and cartilage degeneration in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. **Immune network** 2014;14(1):45-53.
- [22] Oliveira DPC, Borrás MRL, Ferreira JCL, Lozano JLL. Anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. on the self-induced inflammatory process from venoms amazonians snakes. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 2009;19(2b):643-649.
- [23] Pecora JR, Hernandez AJ, Camanho GL. Artrose do joelho. São Paulo: Atheneu, 2010.
- [24] Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, Phillips S, Sellers R, Bunton T, Walker K. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. **Pain** 2005;114(3):339-346.
- [25] Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Arch Int Pharmacodyn Ther** 1957;111(4):409-419.
- [26] Rocha APM, Resende AC, Souza MAV, Carvalho LCRM, Sousa PJC, Tano T, Criddle DN, Porto LC, Valenca SS, Moura RS. Antihypertensive Effects and Antioxidant Action of a Hydro-Alcoholic Extract Obtained from Fruits of *Euterpe oleracea* Mart. **Journal of Pharmacology and Toxicology** 2008;3:435-448.
- [27] Rocha CQ, Vilela FC, Cavalcante GP, Santa-Cecilia FV, Santos-E-Silva L, Dos Santos MH, Giusti-Paiva A. Anti- inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. **J Ethnopharmacol** 2011;133(2):396-401.
- [28] Rêgo TJA. Fitogeografia das plantas medicinais no Maranhão. São Luís: EDUFMA, 1985.

- [29] Ríos JL, Recio MC, Escandell JM, Andújar I. Inhibition of transcription factors by plant- derived compounds and their implications in inflammation and cancer. **Current Pharmaceutical Design** 2009;15(11):1212-1237.
- [30] Schuelert N, McDougall JJ. Grading of monosodium iodoacetate- induced osteoarthritis reveals a concentration- dependent sensitization of nociceptors in the knee joint of the rat. **Neuroscience Letters** 2009;465(2):184-188.
- [31] Seeram NP, Momin RA, Nair MG, Bourquin LD. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. **Phytomedicine** 2001;8(5):362-369.
- [32] Tat SK, Lajeunesse D, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Targeting subchondral bone for treating osteoarthritis: what is the evidence? Best Practice and Research: **Clinical Rheumatology** 2010;24(1):51-70.
- [33] Teixeira MJ. Dor - princípios e prática. Porto Alegre, 2009.
- [34] Valko M, Moncol J, Mazur M, Leibfritz D, Cronin MTD, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology** 2007;39(1):44-84.
- [35] Zorn B, García-Pieres AJ, Castro V, Murillo R, Mora G, Merfort I. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. **Phytochemistry** 2001;56(8):831-835.

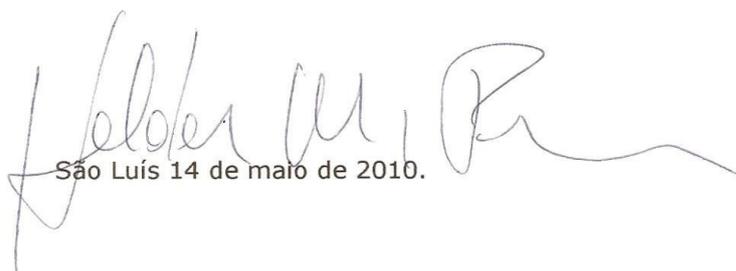
ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Fundação instituída nos termos da Lei nº 5.152 de 21/10/1966 São Luís – Maranhão
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o Protocolo de pesquisa nº. **23115-006307/2010-02**, referente à Pesquisa **“Avaliação dos efeitos de medicamentos alopáticos e fitoterápicos em modelo experimental de osteoartrite”** que tem como pesquisador responsável **Prof. Dr. Antônio Carlos Romão Borges** deu entrada neste **CEP** para análise no dia **14/05/2010**.


São Luís 14 de maio de 2010.

Prof. Hélder Machado Passos
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMA

ANEXO 2 - NORMAS DA PAIN® - THE JOURNAL OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN

06/08/12

PAIN® - Elsevier



http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/506083/authorinstructions

PAIN®

The Journal of the International Association for the Study of Pain

Guide for Authors

PAIN® is the official publication of the International Association for the Study of Pain® (IASP®). PAIN® publishes original research on the nature, mechanisms and treatment of pain and provides a multidisciplinary forum for the dissemination of research in the basic and clinical sciences.

Editor-in-Chief: Prof. Allan I. Basbaum, Editor-in-Chief, PAIN®, Department of Anatomy and W.M. Keck Foundation Center for Integrative Neuroscience, University of California, San Francisco, CA, USA.
Editorial Office: PAIN Editors, 111 Queen Anne Ave N., Suite 501, Seattle, WA 98109-4955, USA.

Types of Papers:

- *Clinical/Basic Science Research Reports* (for word limitations, see below).
- *Clinical Notes* (brief reports on clinical cases).
- *Reviews and e-Pain* (clinical topics with photos, video, or audio content).
- *Letters to the Editor*
- *Topical Reviews* (articles that summarize recent findings and highlight issues in clinical research. These are usually solicited, but presubmission inquiries are welcome.)

The reviewing process for **all** articles will be handled by the Editor-in-Chief, Allan I. Basbaum and the Section Editors:

- *Clinical Psychology*: Chris Eccleston, Bath, UK
- *Clinical Science, Epidemiology and Clinical Notes*: Jörgen Dahl, Copenhagen, Denmark; Jane Ballantyne, Seattle, USA; Henry McQuay, Oxford, UK
- *Reviews and e-Pain*: Michael C. Rowbotham, San Francisco, CA, USA
- *Pain Measurement and Imaging*: Karen Davis, Toronto, Canada
- *Neurobiology*: Jeffrey S. Mogil, Canada; Rolf-Detlef Treede, Germany
- *Pharmacology*: Anthony Dickenson, London, UK.
- *Articles that are chosen for Pain Clinical Updates*, which is edited by Jane Ballantyne, Boston, MA, USA will be published by IASP and are available on the IASP website: www.iasp-pain.org under 'publications'.

Announcements will not be published in the journal. (See below for advertising information.) For possible inclusion of announcements in the IASP Newsletter, please contact Executive Officer IASP, 111 Queen Anne Ave N., Suite 501, Seattle, WA 98109-4955, USA. (fax: +1 206 283 9403; e-mail: iaspdesk@iasp-pain.org; www.iasp-pain.org).

Cover Material. Suggestions for cover photographs or diagrams of clinical or basic research data are invited. The illustration may be from a manuscript submitted for publication, a previous paper published in PAIN®, or material not published previously. Photographs of historical interest are also welcome.

Online Access to PAIN® for members (only) can be found on: www.iasp-pain.org/PAIN

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

1. General

Cover letter: A letter accompanying the manuscript should include a statement of any financial or other relationships that might lead to a conflict of interest and the names of four potential reviewers with complete contact details. As our objective is to obtain independent reviews that are free from bias, please do NOT suggest people with whom you have worked or published in recent years and no one who works at your institution. There is no assurance that reviewers will be chosen from the list you provide. PAIN® does not publish open label trials, with the possible exception of the Clinical Notes section.

Submission of a paper to PAIN® is understood to imply that it has not previously been published (except in abstract form) and that it is not being considered for publication elsewhere.

Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed on the assumption that (1) all authors listed concur with the submitted version of the manuscript and with the listing of the authors; (2) authorship credit is based on important contributions in one or more of the following areas: conception and design, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript or making intellectual contributions to its content; (3) the final manuscript has been tacitly or explicitly approved by the responsible authorities in the laboratory or institution where the work was carried out.

If illustrations or other small parts of articles or books already published elsewhere are used in papers submitted to PAIN®, the written permission of author and publisher concerned must be included with the manuscript. The original source(s) must be indicated in the legend of the illustration in these cases, or as appropriate as a footnote to the text.

Articles should be written in English and should be complete in all respects. As only limited editing is provided by the Publisher, prior to submission we ask that your article be edited by a person experienced writing manuscripts in English. The layout, style and length of article should adhere strictly to the instructions given under "Organization of the Article" and, in particular, to the reference style of PAIN®.

Manuscripts that evaluate clinical interventions must be randomized. Results that are derived from studies that are not randomized may be appropriate for the Clinical Notes section. In addition, studies should have high methodological quality and as large a representative sample as possible. If the paper is an epidemiological study it should address a new population that will help the reader to understand the impact of cultural and socio-economic factors on chronic pain.

The Editors of PAIN® endorse and strongly encourage authors of reports of clinical trials to use the CONSORT checklist, as well as the QUORUM statement used for systematic reviews found at www.thelancet.com under Vol. 354, November 1999, D.Moher et al., "Improving the quality of reports of meta-analysis of randomized controlled trials: the QUORUM statement (both used with permission)".

The Consort E-Flowchart and a checklist of items to be included when reporting a randomized trial can both be found on www.consort-statement.org. If you are submitting a manuscript of a **clinical trial** to Pain®, you are required to submit a flowchart of your research showing the steps found in the Consort E-Flowchart. This should be submitted as a figure. As the flowchart will only be published in the online version of PAIN®, please supply a couple of summary sentences in your text referring to the flowchart. These sentences will appear in the paper issue of the journal.

No revisions or updates will be incorporated after the article has been accepted and sent to the Publisher (unless approved by the Editors).

For all types of papers **submission to PAIN® proceeds totally online, via the WWW** using EES, the Elsevier Editorial System, at website: <http://ees.elsevier.com/pain>.

For assistance with on-line submission, please contact PAIN® at: painjournal@iasp-pain.org.

2. Preparing electronic manuscripts

Keep text and graphics (and any other items) as separate files - **do not import the figures into the text file**. Name your files using the correct extension, e.g. text.doc, fig1a.eps, fig1.tif, tbl1-6.xls, etc. Please provide a summary of one or two sentences (25 words max.) stating the conclusions of your study. This summary will be used in the Table of Contents. When writing the synopsis, please avoid use of the first person. Please also refrain from using statements that begin with, "This study..." Do not merely rephrase the title of the paper, but rather provide some information that will inform readers of the objective, methods, results and/or conclusions.

Text files should be supplied in one of the following formats: Microsoft Word or WordPerfect, Windows or Macintosh formatted. The native format is preferred over ASCII text or Rich Text Format (RTF). Please do not import a file already in a .pdf form from your files - use source files such as Word, LaTeX etc.

Ensure that the letter "l" and the digit "1" (also letter "O" and digit "0") are used properly, and format your article (tabs, indents, etc.) consistently. Characters not available on your word processor (Greek letters, mathematical symbols, etc.) should not be left open, but inserted using the EES code inserting tool, or else indicated by a unique code (e.g. galpha, @, #, etc. for the Greek letter alpha). Such codes should be used consistently throughout the entire text. Please make a list of such codes and provide a key.

As most formatting codes will be removed or replaced during the publication process, do not use excessive layout styling. Also, do not use automatic word breaking, justified layout, double columns or automatic paragraph numbering (especially for numbered references). However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. for scientific nomenclature.

Figures and Tables are to be submitted as separate files and on separate pages.

When preparing tables, if you are using a table grid, please use only one grid for each separate table and not a grid for each row. If no grid is being used, use tabs to align columns, not spaces.

Topical Reviews are strictly limited to 2,000 words, do not have an abstract, and can contain no more than 2 tables or figures; 30 references are suggested with an upper limit of 40. Supplementary online material, such as video or additional tables are handled on a case-by-case basis.

Graphic files: See Elsevier's website for guidelines for preparing electronic artwork www.elsevier.com/artworkinstructions.

The following are preferred formats: native formats of Adobe® Photoshop® and Adobe® Illustrator®. If this is not possible, the graphic files may also be supplied in either TIFF, EPS, JPEG, GIF or PPT format.

All graphic files supplied as bitmap format (not vector format) in native Adobe Photoshop®, TIFF, JPEG, GIF or PPT must be submitted in sufficiently high resolution (240-300 dpi for gray-scale or colour images and 600-1000 dpi for line art) to allow for printing. Submission of figures you have already saved on your computer as .pdf files is to be avoided.

3. Submission of manuscripts

Full instructions for uploading data and files etc. are given on EES at the website: <http://ees.elsevier.com/pain>

Do not type directly into EES; copy and paste previously typed material.

Electronic submission via EES requires at least one original word processing file; if there are any associated data files (figures, etc.), these should be included separately. It is the responsibility of the authors to create the proper files. The editorial office cannot make conversions beyond the supported file types. Do not send hardcopy manuscripts or illustrations to the Editors unless specifically requested.

Revisions: Only three versions of the paper may be permitted (i.e. the first submission and two revisions). If the concerns of the reviewers are not satisfactorily met by the second revision, it is at the discretion of PAIN whether or not to continue with the review process. If not, the paper will be rejected. In some cases in response to the original critique, the revision may include new information that reveals significant new concerns. This may generate new requirements for revision and indeed may also be grounds for rejection.

Please note that whenever the authors are given the opportunity to revise a submitted manuscript, there is no assurance that the manuscript will be accepted.

Only after "notification of acceptance" or "acceptance with minor revision" will authors be requested perhaps to send two sets of hardcopy illustrations to the Elsevier Editorial Office, for the purpose of checking the quality of the processed electronic files.

4. Organization of manuscripts

EES will guide authors through the submission steps, including: Abstract, up to 6 Keywords, and the Manuscript. The manuscript must contain an Introduction, Methods, Results, Discussion, Acknowledgements and Reference List.

Length of manuscript: If the manuscript exceeds this word count, authors will be required to revise the paper. Abstract: 250 words; Introduction: 500 words, Discussion: 1500; Methods and Results: no limit. Permission to exceed these guidelines must be obtained from the Editor-in-Chief. e-PAIN submissions have different word limits, see e-PAIN section below.

Title page. The title page should include the following: (i) complete title (preferably no chemical formulas or arbitrary abbreviations); (ii) full names of all authors; (iii) complete affiliations of all authors; (iv) the number of text pages of the entire manuscript (including figures and tables) and the number of figures and tables; (v) the author to whom correspondence should be sent and this author's complete address, telephone number, facsimile number and E-mail address, and, if available, URL address.

Reference list:

- Citation of literature references in the text should be cited using bracketed numbers that correspond to the alphabetized and numbered reference list as follows: "Pain is made worse if you hit the already injured site [15]". For multiple references in the text, please use the format [number,number] (with a comma and no spaces). For example [2,4,28,33].
- All references cited in the text must be listed at the end of the paper. They should be numbered, typed double-spaced, and arranged by the author **alphabetically**.
- All authors must be listed in the references; the use of et al. is not acceptable.

- References must be complete, including initial(s) of author(s) cited, title of paper, Journal, year of publication, volume and page numbers.
- For citations of books, the following uniform sequence should be maintained: author(s), title of article, editor(s), complete title of book, place of publication, publisher, year and page numbers.
- Journal titles should be abbreviated according to Index Medicus, National Library of Medicine, List of Journals Indexed, latest edition.
- Unpublished data, personal communications, and abstracts that cannot be retrieved by readers (e.g., some meeting abstracts), and other inaccessible materials should not be listed as references. Unpublished materials may be cited in parentheses within the text.
- For manuscripts containing citations that are in press, authors must have electronic copies immediately available in case reviewers/editors request these materials.
- URLs should be included for all references that are publicly accessible via the Internet.

Examples:

- [1] Adams CWM. Neurohstochemistry. Amsterdam: Elsevier, 1965.
- [2] Goldenberg DL. Psychiatric and psychological aspects of fibromyalgia syndrome. *Rheum Dis Clin N Am* 1989;15:105-115.
- [3] Goldenberg DL. Fibromyalgia and its relation to chronic fatigue syndrome, viral illness and immune abnormalities. *J Rheumatol* 1989;16:91-93.
- [4] Turner JA. Coping and chronic pain. In: Bond MR, Charlton JE, Woolf CJ, editors. *Pain research and clinical management. Proc. Vth World Congress on Pain, Vol. 4.* Amsterdam: Elsevier, 1991. pp. 219-227.

Summary: Please provide a synopsis of one or two sentences (about 25 words) stating the conclusions of your study. This will be used in the Table of Contents. When writing the synopsis please avoid use of the first person. Please also refrain from using statements that begin with "This study...". Do not merely rephrase the title of the paper, but rather provide some information that will inform readers of the objective, methods, results and/or conclusions.

Illustrations: Authors should consult Elsevier's website for guidelines for preparing (electronic) artwork www.elsevier.com/artworkinstructions.

Journal illustrations will appear either across a single column (=8.4 cm) or a whole page (=17.6 cm). The illustrations should be numbered in Arabic numerals according to the sequence of appearance in the text, where they are referred to as Fig. 1, Fig. 2, etc. Please do **not** submit illustrations as .pdf files.

After acceptance of an article the publisher may request that electronic files of the illustrations be accompanied by a hardcopy set of the final illustrations. Any hardcopy illustrations should bear the author's name, the orientation (top, bottom, etc.) and be numbered. Hardcopy colour figures should be submitted as separate prints and not be mounted on cardboard. Slides taken from labeled prints are also acceptable.

Colour reproduction. There are no colour charges. However, if the Editor-in-Chief concludes that the colour images were not necessary, colour charges will be imposed. In that case the charges will be EURO 300.00 for the first page involving colour, and EURO 200.00 per page for all subsequent pages involving colour in a given article (all prices include sales tax).

Figure legends. Provide each illustration with a title and an explanatory legend. The title should be part of the legend and not be reproduced on the figure itself. Legends should be numbered consecutively in Arabic numerals and should be placed on a separate page at the end of the manuscript and begin with the number of the illustration to which they refer. All symbols and abbreviations used in the figure must be explained.

Tables. Tables, with their captions and legends, should be intelligible with minimal reference to the text. Tables of numerical data should each be typed (with double-spacing) on a separate page, numbered in sequence in Arabic numerals (Table 1, 2, etc.), provided with a heading, and referred to in the text as Table 1, Table 2, etc. A detailed description of its contents and footnotes should be given below the body of the table.

Acknowledgments. Acknowledgments should be placed at the end of the text before the Reference List and should specify: (1) contributions that need acknowledging but do not justify authorship; (2) acknowledgments of technical help; (3) acknowledgments of financial and material support, specifying the nature of the support; (4) financial arrangements that may represent a possible conflict of interest.

This would also include any of the following arrangements, if any of the authors:

- have a financial relationship to the work;
- have received any government or company grants or research support;
- are employees of a company;
- are consultants for a company;
- are stock holders of the company;
- are members of a speakers bureau;
- have received any other form of financial support.

A **Conflict of Interest** statement **must** be included for all manuscripts within the Acknowledgements section.

If there are no conflicts of interest, please explicitly state this.

Ethics of Animal Experiments. Authors must acknowledge that their experiments adhered to the guidelines of the Committee for Research and Ethical Issues of IASP published in PAIN®, 16 (1983) 109-110. Authors should indicate if the experimental work was reviewed by an institutional animal care and use committee or its equivalent.

Ethics of Human Experiments. Authors reporting on experimental work on humans should, where relevant, submit evidence that the work has been approved by an institutional clinical research panel or its equivalent.

Proofs. One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding Author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download the latest version of Adobe® Reader® available free from <http://get.adobe.com/reader/>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. If you do not wish to use the PDF annotation function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting the line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail them, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with publication of your article if no response is received.

Page Charges. There will be no page charges for PAIN®.

Reprints. A total of 50 reprints of each paper will be provided free of charge to the corresponding author. Additional copies can be ordered at prices shown on the offprint order form, which will be sent to the author upon receipt of the accepted article at the Publisher.

Author inquiries: For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission), the status of accepted articles through our Online Article Status Information System, author Frequently Asked Questions and any other inquiries relating to Elsevier, please consult www.elsevier.com/authors

For specific inquiries on the preparation of electronic artwork, consult www.elsevier.com/artworkinstructions

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided by Elsevier when an article is accepted for publication.

e-PAIN Submissions. Authors submitting manuscripts for e-PAIN should follow all the above instructions for their submission, except for the word counts and illustration files (see below). The e-PAIN manuscript must be designated in EES as an e-PAIN type of submission (in the pull down menu on the submission page). Authors are advised to please contact the Editorial Office before attempting to submit any e-PAIN articles.

Printed summary: Each e-PAIN manuscript will have a summary that appears in the print version of PAIN®. The summary is limited to 1000 words, 1 figure or table, and 6 references. The electronic version of the manuscript has the same limits as other manuscripts: Abstract: 250 words; Introduction: 500 words, Discussion: 1500; Methods and Results: no limit.

Multimedia files: Please contact the Editorial Office at painjournal@iasp-pain.org before attempting to submit these files. The additional e-files that are submitted may include a variety of multimedia options, such as large figures, photographs, brief video clips, with or without audio content. Material submitted for publication on-line via e-PAIN must be of a high enough resolution to be viewable in a web page type format. These additional files should be uploaded only on the special page to which they will be directed during submission by EES. A maximum of 10 digital images, 2 video clips, and 2 audio files can be submitted for an e-PAIN manuscript. File limits for each figure or photograph is 1.5 mb, each video clip is limited to 3.0 mb, and separate audio content is limited to 1.0 mb.

Costs: There are no charges for material presented on-line including colour figures. If together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g. ScienceDirect), regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Each author will be provided with a .pdf version of the text and photographs contained in the full material (print and online material), and 50 copies of the summary of the article that appears in the print version of PAIN®. Authors will not receive a reprint that includes video and audio content.