

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Fundação Instituída nos termos da Lei nº 5.152 de 21/10/1966
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

ALFREDO JOSE BARRETO SAMPAIO JUNIOR

**AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DO USO DO EXTRATO
DA *Arrabidaea chica Verlot* EM MODELO EXPERIMENTAL DE
OSTEOARTRITE EM RATOS**

SÃO LUÍS

2016

ALFREDO JOSE BARRETO SAMPAIO JUNIOR

**AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DO USO DO EXTRATO
DA *Arrabidaea chica Verlot* EM MODELO EXPERIMENTAL DE
OSTEOARTRITE EM RATOS**

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

Orientador: Prof.Dr. João Batista Santos
Garcia

SÃO LUÍS

2016

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Sampaio Júnior, Alfredo José Barreto.

AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DO USO DO
EXTRATO DA Arrabidea chica Verlot EM MODELO EXPERIMENTAL
DE OSTEOARTRITE EM RATOS / Alfredo José Barreto Sampaio
Júnior. - 2016.

36 f.

Orientador(a): João Batista Santos Garcia.

Monografia (Graduação) - Curso de Medicina,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

1. Arrabidee chica Verlot. 2. Dor Crônica. 3.
Inflamação. 4. Osteoartrite. I. Garcia, João Batista
Santos. II. Título.

ALFREDO JOSE BARRETO SAMPAIO JUNIOR

**AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DO USO DO EXTRATO
DA *Arrabidea chica Verlot* EM MODELO EXPERIMENTAL DE
OSTEOARTRITE EM RATOS**

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

Orientador: Prof. Dr. João Batista Santos
Garcia

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Batista Santos Garcia – Orientador

Profa. Ms. Elizabeth Teixeira Noguera Servín – Examinador 1

Profa. Ms. Lyvia Maria Rodrigues de Sousa Gomes – Examinador 2

Ms. Rayanne Luiza Tajra Mualem Araújo – Examinador 3

Aos meus pais Gilza Cunha e Alfredo Sampaio e minhas irmãs, Clarice e Camila, pelo amor, incentivo e auxílio de extrema valia para realização desse trabalho.

À Marina Pereira, pelo incentivo constante e por todo o amor, compreensão e dedicação manifestados sempre nas situações mais necessárias, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Gilza Cunha, por todo o carinho, dedicação, paciência, preocupação, sacrifício, desgaste físico e emocional e por tantas outras coisas realizadas que apesar de não saber, tenho a certeza que sempre foi pensando no melhor pra mim, à ela minha eterna gratidão.

Ao meu pai, Alfredo Sampaio, pelo seu exemplo de pessoa e de caráter, por todo amor, compreensão e sacrifício. Em ensinar que na vida nem tudo pode ser perfeito, mas que pode ser consertado com humildade e paciência.

Às minhas irmãs, Clarice Sampaio e Camila Sampaio, pela confiança e companheirismo. Por todos os momentos juntos, e por nos apoiarmos nas dificuldades encontradas.

À minha namorada, Marina Pereira, pela compreensão, apoio, carinho e suporte na confecção do trabalho. Obrigado pelo amor dedicado a cada dia.

Aos meus tios Gildo Cunha, Gésia Cunha, Maria Cunha, Gilda Cunha, Robério Cunha e Afrânio Sampaio, pela ajuda e suporte em todos os momentos de dificuldades durante a realização deste curso.

À minha prima Caroline Cunha (in memoriam), por mostrar que o melhor da vida está por vir, que a família é base do homem e o amor é o que lhe fortalece.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Batista Santos Garcia, um exemplo de profissional e pessoa, por todos os ensinamentos e principalmente pelo tempo e paciência dedicados durante a realização desse trabalho e por todos esses anos como seu aluno.

À Prof^aDr^a. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes, uma amiga, um exemplo de professora, a quem tenho tanta admiração e agradeço a Deus por tê-la conhecido, pois foi fundamental na minha formação e peça chave nesse estudo, serei eternamente teu sobrinho, muito obrigado.

Ao amigo Rennan Santos, companheiro fiel, pessoa que tive a honra em encontrar em minha vida e o qual tenho orgulho em chamar de amigo. Obrigado por me proporcionar a realização desse trabalho, pelo seu apoio, dedicação e paciência comigo durante todos esses anos de curso.

Aos amigos Nathalia Lima, Rosa Helena Silva, Melissa Pinho, Bruna Rocha, Prof. João Batista, Prof^a Socorro Cartagenes, Prof^a Lyvia Gomes, Prof^a Elizabeth Servin, Prof^a. Tereza Melo, por todo apoio, dedicação à pesquisa experimental em dor. Obrigado pelos ensinamentos e amizade.

Aos amigos da Medicina, à minha querida Turma 93, ao grupo Sexta 13, ao Álcoon, pela amizade sincera, companheirismo, pelos momentos de alegria e descontração. Todos sabemos das dificuldades que passamos nesses 6 anos, ter vocês ao meu lado deixou tudo mais divertido.

À amiga Natalia Nunes, pela amizade, disponibilidade e apoio incondicional, na realização deste trabalho.

Às famílias Pereira, Santos e Beckman, que me acolheram no Maranhão como a um filho, obrigado por tudo, jamais serei capaz de retribuir todo o carinho, amor e atenção oferecidos. Vocês sempre terão um lugar no meu coração.

A todos os colaboradores do Laboratório de Estudo Experimental em Dor (LEED) da Universidade Federal do Maranhão por todo apoio oferecido a pesquisa.

À Liga Acadêmica de Dor do Maranhão (LAD) pelo aprendizado, pelos amigos, pelos pacientes, por me proporcionar oportunidades de crescimento pessoal e profissional, por ser um marco na minha vida.

À Universidade Federal do Maranhão, pelo apoio na realização do trabalho e profissionalismo.

OBRIGADO!

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que
ninguém viu, mas pensar o que ninguém
ainda pensou sobre aquele que todo
mundo vê”.*

Arthur Schopenhauer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema Ilustrativo do Protocolo Experimental	20
Figura 2.	(A) Grau do comprometimento articular em ratos tratados com o extrato da <i>Arrabidaea chica</i> 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 segundo classificação proposta por Kellgren-Lawrence Krenn. Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Sem diferença estatística entre OA-Fitoterápico e OA-Salina. (B) Histograma com distribuição da frequência do escore de Kellgren-Lawrence em porcentagem (%)	23
Figura 3.	Radiografias de joelho na projeção Antero-Posterior, em modelo experimental de osteoartrite induzida por MIA	24
Figura 4.	(A) Grau de inflamação da membrana sinovial em ratos tratados com o extrato da <i>Arrabidaea chica</i> 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 Krenn. Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Sem diferença estatística entre OA-Fitoterápico e OA-Salina (B) Histograma com distribuição da frequência do escore de Krenn em porcentagem (%)	25
Figura 5.	Fotomicrografia da membrana sinovial em H&E, em modelo experimental de osteoartrite induzida por MIA	26

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Classificação de Kellgren-Lawrence	21
Quadro 2.	Avaliação histopatológica de Kreen para sinovite crônica ..	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OA	Osteoartrite
MMPs	Metaloproteases
ACV	<i>Arrabiadaea chica</i> (Humb. & Bonpl.) Verlot
K&L	Kellgren-Lawrence
H&E	Hematoxilina-Eosina
LEED	Laboratório Experimental do Estudo da Dor
MIA	Monoiodoacetato de sódio
NF- κ B	Fator nuclear- κ B
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
COX-2	Ciclo oxigenase 2
5-LOX	5-lipoxigenase
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SUS	Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	Ix
LISTA DE QUADROS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	Xi
ARTIGO A SER SUBMETIDO	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. MATERIAIS E MÉTODOS	17
2.1 Animais	18
2.2 Coleta da espécie vegetal e identificação botânica	18
2.3 Preparo do extrato etanólico	18
2.4 Protocolo Experimental	19
2.5 Análise Radiológica	20
2.6 Análise Histopatológica	21
2.7 Análise Estatística	22
3. RESULTADOS	22
3.1 Avaliação dos parâmetros radiológicos no efeito do extrato de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot no tratamento da Osteoartrite em ratos	23
3.2 Efeito do extrato de <i>Arrabidaea chica</i> Verlot na inflamação da membrana sinovial	24
4. DISCUSSÃO	26
REFERÊNCIAS	29
ANEXO 1 - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	31
ANEXO 2 - NORMAS DA PAIN®	32

ARTIGO A SER SUBMETIDO**AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DO USO DO EXTRATO
DA *Arrabidaea chica* Verlot EM MODELO EXPERIMENTAL DE
OSTEOARTRITE EM RATOS**

Radiological and histopathological evaluation of the use of *Arrabidaea
chica* Verlot extract in experimental model of osteoarthritis in rats.

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

Alfredo José Barreto Sampaio Junior¹

Rennan Abud Pinheiro Santos¹

João Batista Santos Garcia²

Maria do Socorro de Sousa Cartágenes²

Gyl Eanes Barros Silva ³

Trabalho realizado no Laboratório de Estudos Experimentais em Dor da Universidade Federal do Maranhão, em São Luís, Brasil. Curso de Medicina.

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

2- Professor Adjunto Doutor da Universidade Federal do Maranhão

3- Doutor em Patologia da Universidade de São Paulo

Autor responsável: Alfredo José Barreto Sampaio Junior – alfredojrxx@gmail.com

RESUMO

Objetivo: No presente estudo, avaliou-se o efeito do extrato etanólico de folhas da *Arrabidaea chica* Verlot (ACV) por via oral, em modelo experimental de osteoartrite (OA) em ratos. **Material e Métodos:** 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 28º dia, enquanto o grupo OA-Salina recebeu mesmo volume de NaCl à 0,9%. Ao fim do experimento Os animais foram mortos com dose letal de anestésico para realização da análise radiológica e extração da membrana sinovial para análise histopatológica. **Resultados:** A injeção do MIA conseguiu induzir alterações radiológicas e histológicas na articulação, entretanto não houve diferença estatística entre o grupo OA-salina e o grupo OA-Fitoterápico. Apesar disso observou-se em uma análise descritiva que o grupo OA-Fitoterápico apresentou uma predominância maior de casos de sinovite de baixo grau quando comparados ao grupo OA-salina. **Conclusão:** O extrato etanólico de ACV não foi capaz de alterar ou impedir as alterações radiológicas e histopatológicas mais frequentes na OA.

Palavras-chave: Osteoartrite; *Arrabidaea chica* Verlot; Inflamação; Dor Crônica.

ABSTRACT

Aim of investigation: In the present study, it was evaluated the effect of leaves of *Arrabidaea chica* Verlot (ACV) extract used by oral form in an experimental model of osteoarthritis (OA) in rats. **Methods:** 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 iodoacethato (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. At the end of the experiment, the animals were killed with a lethal dose of anesthetic, in order to make the radiographic analysis and the extraction of the synovial membrane for histopathological analysis. **Results:** The injection of MIA could induce radiological and histological changes in the joint; however, there was no statistic difference between the OA-Salina group and the OA-Fitoterápico group. Despite those results, it was observed in descriptive analysis that the OA-Fitoterápico group showed more cases of low-grade synovitis if compares to the OA-salina group. **Conclusion:** The ACV extract was not capable of diminish the changes of the most frequent radiological and histopathological OA alterations.

Keywords: Osteoarthritis; *Arrabidaea chica* Verlot; Inflammation; Chronic Pain.

1. INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é caracterizada por um conjunto heterogêneo de condições que induzem sinais e sintomas articulares associados a degeneração da cartilagem articular e tecido ósseo adjacentes. É a forma mais comum e frequente entre as doenças que acometem a articulação e afeta principalmente quadris, joelhos e mãos [14].

Há várias décadas a fisiopatogênese da OA vem sendo estudada e atualmente, admite-se que há um processo degenerativo e inflamatório na articulação, resultante do desequilíbrio entre a condroformação e a condrodegeneração naturais em cada célula condrocítica [24]. Estas células produzem níveis elevados de citocinas inflamatórias que reduzem a síntese de colágenos e promovem aumento de mediadores catabólicos – como metaloproteases (MMPs) – e outras substâncias inflamatórias. Essas alterações intra-articulares decorrentes dos fenômenos de hiperatividade funcional celular provocam uma sinovite persistente [19].

Nas doenças articulares degenerativas e inflamatórias a radiografia ajuda a avaliar o grau de comprometimento e orientar alternativas possíveis de tratamento. Os achados radiológicos mais importantes na OA de joelho são a presença de cistos e escleroses subcondrais, osteófitos marginais e diminuição do espaço articular [20; 21].

Radiografias de alta qualidade possuem elevada acurácia na identificação de mudanças estruturais resultantes da OA, porém o diagnóstico pode se tornar difícil nos estágios iniciais da doença. Neste sentido, avaliações histológicas são usadas, em muitos estudos, como o “padrão ouro” no acompanhamento da progressão da doença [4].

Apesar da existência de exames complementares, sabe-se que em grupos de alto risco, o diagnóstico de OA pode ser realizado com base nos sinais e sintomas típicos da doença, sem qualquer recurso radiográfico ou laboratorial [1]. A dor geralmente é o principal sintoma na OA, sendo muitas vezes exacerbada pelo uso extensivo da articulação [15]. Entende-se a dor na OA

como resultado de uma combinação de fatores mecânicos localizados, sistêmico-inflamatórios e até neurológicos centrais [24].

O tratamento geral da OA visa combater a dor, preservar e melhorar a função articular, reduzir a incapacidade funcional e bloquear os fatores de piora do prognóstico [5]. Dentre as opções terapêuticas os anti-inflamatórios não-hormonais apresentam uma resposta expressiva principalmente nas fases de sintomas dolorosos agudizados. Esses medicamentos reduzem, mas não eliminam totalmente a inflamação, sendo considerados, portanto, como fármacos de ação sintomática [24].

As plantas medicinais são fontes de ampla variedade de compostos biologicamente ativos e comprovadamente apresentam atividade analgésica e anti-inflamatória [16]. Dentre as plantas medicinais comumente utilizadas encontra-se a espécie vegetal *Arrabiadaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot, natural da região amazônica [17] – popularmente conhecida como crajiru, carajiru ou pariri – é utilizada por populações indígenas para pintura de corpos e utensílios, sendo conhecida também por suas propriedades anti-inflamatórias e cicatrizantes [2].

Uma ampla revisão da bibliografia indicou que vários efeitos biológicos e farmacológicos têm sido relatados para diferentes extratos e frações preparados a partir das folhas de *Arrabidea chica* Verlot (ACV), entre os quais: hepatoprotetor; antimicrobianos; cicatrização de feridas de pele e tendão; anti-inflamatórios e antioxidante [22].

Baseado nessa ação anti-inflamatória, bem como no próprio papel da inflamação na fisiopatogenia da OA, motivou-se a investigação do efeito deste extrato, quando administrado por via oral, na evolução da OA induzida em ratos, através da avaliação de parâmetros histológicos e radiológicos.

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).

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 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.

2.2 Coleta da espécie vegetal e identificação botânica

Foram realizadas coletas de folhas adultas de *Arrabidaea chica* Verlot em habitat natural [18] nos períodos de seca e chuva, em atendimento as determinações estabelecidas na literatura especializada [7]. 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 no herbário deste departamento sob o número de registro 1067.

2.3 Preparo do extrato etanólico

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, os extratos foram reunidos e filtrados com gaze. O filtrado foi concentrado em rotaevaporador, 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 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

Utilizou-se 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 [6; 11].

Os animais foram anestesiados através de isoflurano 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. 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/dia), o grupo OA-Salina, soro fisiológico à 0,9% e o grupo Sem OA permaneceu sem tratamento. Os animais foram mortos com dose letal de tiopental (150mg) por via intraperitoneal no 28º dia do experimento (Figura 1).

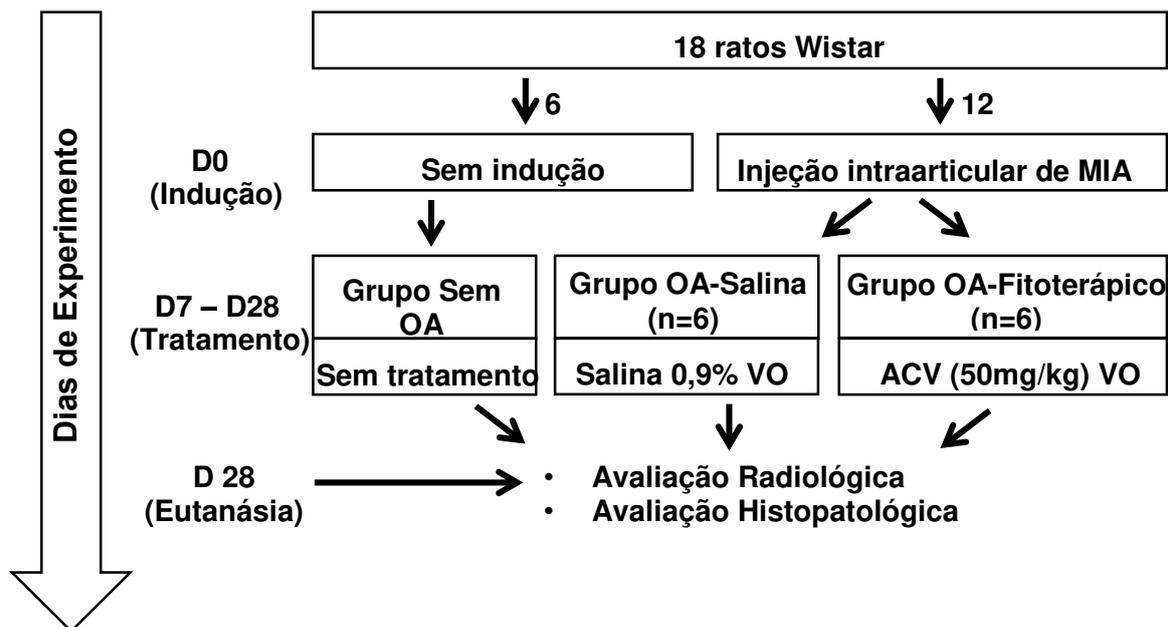


Figura 1. Esquema Ilustrativo do Protocolo Experimental

2.5 Análise Radiológica

Após a eutanásia, as patas traseiras direitas dos animais foram amputadas e submetidas a radiografias nas incidências anteroposterior e perfil, com objetivo de avaliar a diminuição do espaço articular, esclerose do osso subcondral e presença de osteófitos nos joelhos avaliados.

A incidência AP foi utilizada para classificar a osteoartrite pela classificação de Kellgren-Lawrence (K&L) [13], conforme Quadro 1.

Quadro 1 – Classificação de Kellgren-Lawrence

Grau 0	Sem artrose – Radiologia normal
Grau I	Artrose duvidosa – Estreitamento espaço articular duvidoso e possível osteófito na borda
Grau II	Mínima osteoartrose – Possível estreitamento articular osteófitos definidos
Grau III	Artrose moderada – Definido estreitamento articular, múltiplos osteófitos moderados, alguma esclerose subcontral e possível deformidade no contorno ósseo
Grau IV	Artrose severa – Notável estreitamento do espaço articular, severa esclerose subcontral, definida deformidade no contorno ósseo e grandes osteófitos

Fonte: Traduzido de Kellgren JH, e Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthrosis. Ann Rehum. Dis. 1957 16,494.

2.6 Análise Histopatológica

Após a eutanásia dos animais com dose letal do anestésico, as membranas sinoviais foram extraídas e fixadas em formol tamponado a 10%. As amostras foram desidratadas em séries de etanol e embebidas em parafina, sendo realizados cortes de 4µm, posteriormente corados com hematoxilina-eosina (H&E). Para avaliar o grau de inflamação sinovial foi utilizado o escore proposto por Krenn et al. [12], conforme Quadro 2. Todas as amostras foram avaliadas por um mesmo patologista, que desconhecia a que grupo pertenciam as lâminas.

Quadro 2 – Avaliação histopatológica de Kreen para sinovite crônica

Aumento do número de camada de células sinoviais	0 pontos – a linha de células forma uma camada
	1 pontos – a linha de células forma de 2-3 camadas
	2 pontos – a linha de células forma de 4-5 camadas
	3 pontos – a linha de células forma mais que 5 camadas, podendo estar ulcerada ou com presença de células multinucleadas
Densidade das células residuais	0 pontos – o estroma sinovial apresenta celularidade normal
	1 pontos – a celularidade está rapidamente aumentada
	2 pontos – a celularidade está moderadamente aumentada, podendo haver presença de células multinucleadas
	3 pontos – a celularidade está grandemente aumentada, com presença de grandes células multinucleadas, formação de pannus, podendo haver presença de granulomas reumatoides
Infiltrado infamatório	0 pontos – sem infiltrado inflamatório
	1 pontos – poucos linfócitos ou células do plasma, situados perivascular
	2 pontos – numerosos linfócitos ou células do plasma, algumas vezes formando agregados follicle-like
	3 pontos – densa banda de infiltrado inflamatório por vezes formando agregados follicle-like
Soma de 0-1	Sem sinovite
Soma de 2-4	Sinovite de baixo grau
Soma de 5-9	Sinovite de alto grau

Fonte: Krenn V, et al. Synovitis score: Discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. *Histopathology*. 2006;49(4):358–64T.

2.7 Análise Estatística

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 pós-teste de Dunns 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 Avaliação dos parâmetros radiológicos no efeito do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot no tratamento da Osteoartrite em ratos

A injeção do MIA induziu alterações radiológicas na avaliação do comprometimento articular, entretanto ao fim do experimento não foi observada diferença estatística entre o grupo OA-salina e o grupo OA-Fitoterápico (Figura 2A).

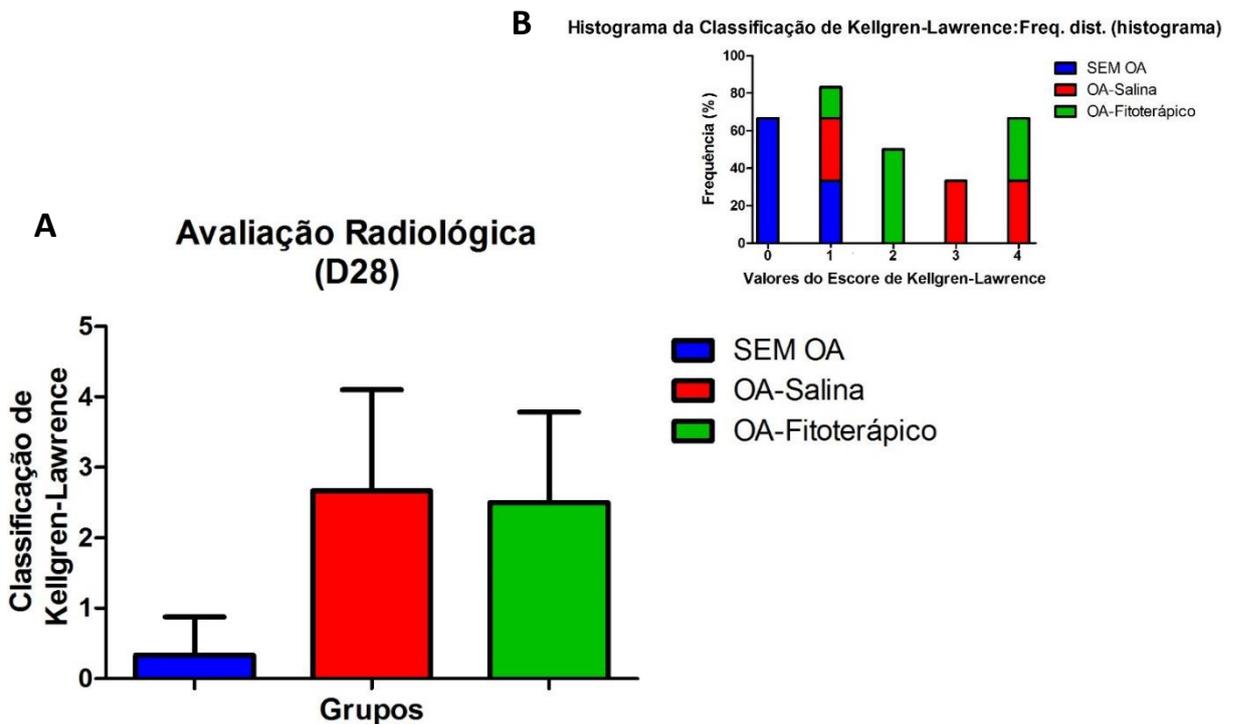


Figura 2. (A) Grau do comprometimento articular em ratos tratados com o extrato da *Arrabidaea chica* Verlot (50 mg/kg, VO) e Salina (NaCl 0,9%) administrados a partir do 7º dia após a indução de OA. Os dados estão representados segundo classificação proposta por Kellgren-Lawrence Krenn. Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Sem diferença estatística entre OA-Fitoterápico e OA-Salina. (B) Histograma com distribuição da frequência do escore de Kellgren-Lawrence em porcentagem (%).

Na figura 3, ilustra-se exemplos das radiografias de joelho na projeção Antero-Posterior dos grupos Sem OA (K&L Grau 0), OA-Salina (K&L Grau IV) e OA-Fitoterápico (K&L Grau II) do experimento.

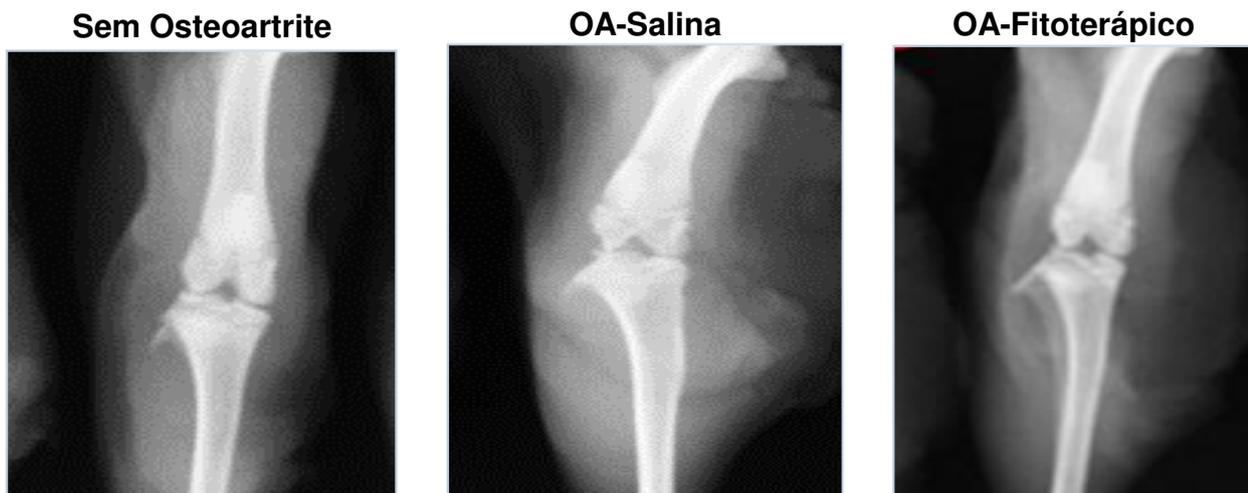


Figura 3. Radiografias de joelho na projeção Antero-Posterior, em modelo experimental de osteoartrite induzida por MIA.

3.2 Efeito do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot na inflamação da membrana sinovial

A análise histopatológica foi realizada com um número menor de lâminas nos grupos OA-Salina (perda de 2 animais neste grupo) e OA Fitoterápico (perda de um animal) devido a problemas técnicos na preparação das lâminas.

A injeção do MIA induziu alterações histopatológicas na membrana sinovial. Não houve diferença estatística entre os grupos OA-Salina e OA-Fitoterápico. Entretanto, o grupo OA-Fitoterápico apresentou escores de sinovite crônica de baixo grau enquanto no grupo OA-Salina foi de alto grau. É importante ressaltar que o grupo tratado com o extrato não teve dano histopatológico adicional (Figura 4).

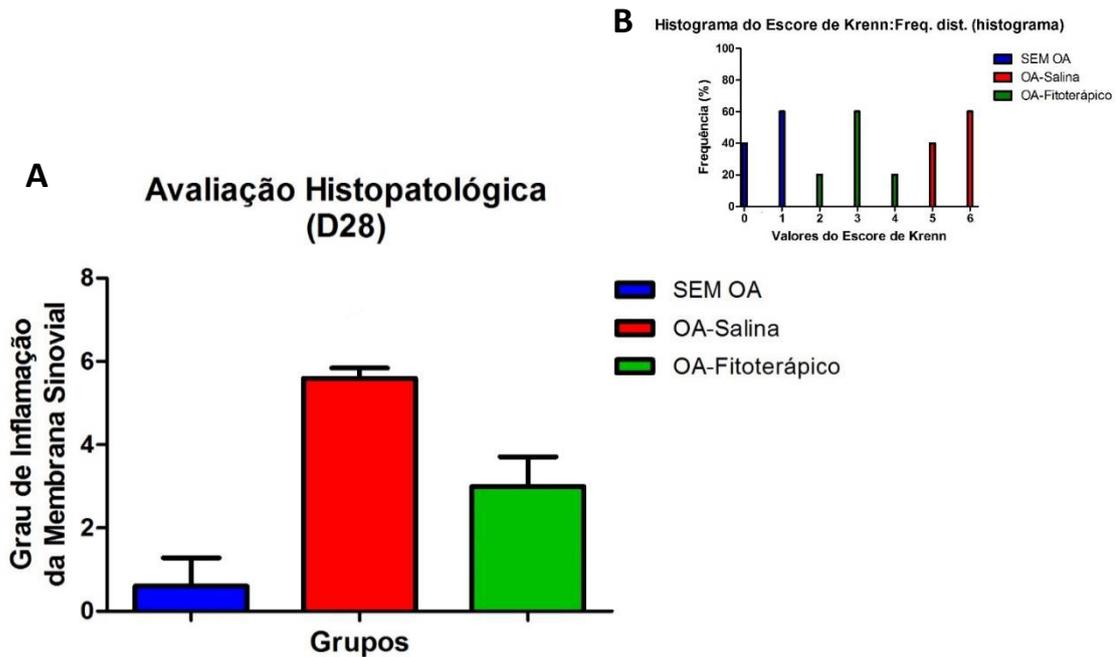


Figura 4. (A) Grau de inflamação da membrana sinovial em ratos tratados com o extrato da *Arrabidaea chica* Verlot (50 mg/kg, VO) e Salina (NaCl 0,9%) administrados a partir do 7º dia após a indução de OA. Os dados estão representados pelo escore Krenn. Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Sem diferença estatística entre OA-Fitoterápico e OA-Salina (B) Histograma com distribuição da frequência do escore de Krenn em porcentagem (%).

Na análise descritiva, não foi possível observar relação linear direta entre os piores escores histopatológicos e os piores radiológicos, de acordo com os histogramas nas figuras 2B e 4B.

A figura 5 apresenta exemplos da análise histopatológica das membranas sinoviais dos três grupos do estudo. A 5A (Sem OA), representa um corte da membrana sinovial intacta e saudável, enquanto a 5B (OA-Salina) nota-se proliferação de células sinoviais e tecido subsinovial, além de infiltrado de células inflamatórias, representando a sinovite de alto grau. Na figura 5C (OA-Fitoterápico) nota-se celularidade ligeiramente aumentada com poucos linfócitos situados perivascular.

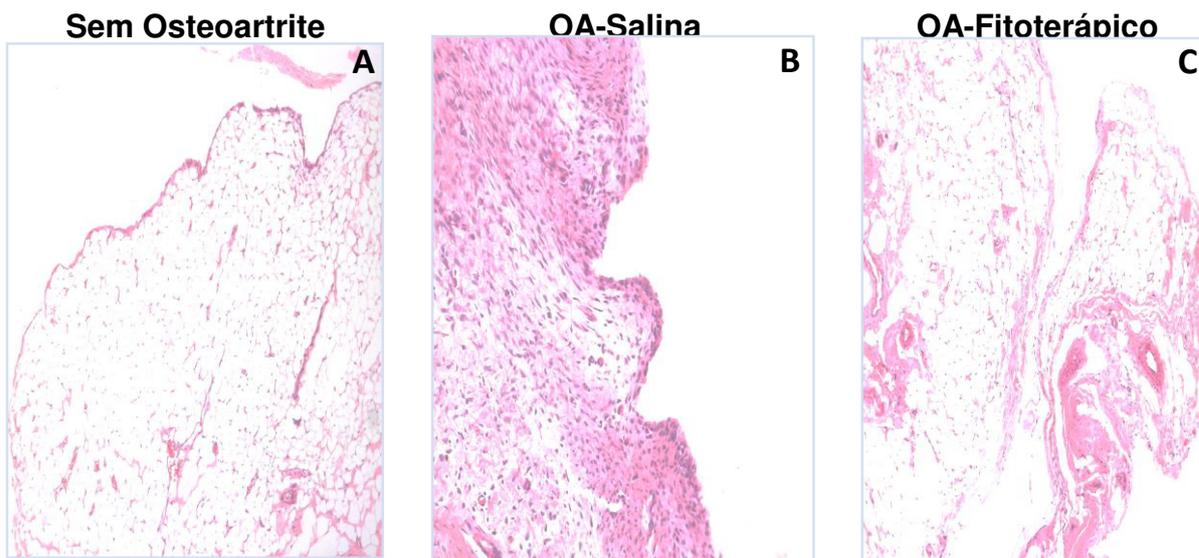


Figura 5. Fotomicrografia da membrana sinovial em H&E, em modelo experimental de osteoartrite induzida por MIA. (A) Grupo Sem OA, (B) Grupo OA-Salina e (C) Grupo OA-Fitoterápico.

4. DISCUSSÃO

A evolução do mercado farmacêutico e o reconhecimento dos centros de pesquisas a respeito das plantas usadas na medicina popular auxiliam o desenvolvimento de novos medicamentos. Contudo, este estudo demonstrou através de parâmetros histológicos e radiológicos que o uso por via oral do extrato hidroalcoólico de *Arrabidaea chica* Verlot em um modelo de osteoartrite não apresentou vantagem no tratamento, porém observou-se sinovite crônica de menor grau nos animais tratados. Todos os animais do presente trabalho apresentaram OA após a indução da doença com MIA.

Assim como em outros estudos, a injeção intra-articular de MIA provocou a degeneração de condrócitos característica da OA [9; 11]. Este efeito foi evidenciado pelo aumento do escore no grau de inflamação da membrana sinovial ocorrido tanto no grupo OA-Fisioterápico, quanto no OA-Salina. Já o grupo Sem OA, que não sofreu indução da doença, essa degeneração condrocítica não foi observada, no período estudado.

Na análise histopatológica o fato do resultado não ter apresentado significância estatística pode estar relacionado às perdas ocorridas no experimento, que gerou um número menor de amostras. Aliado a isso, a não

uniformidade dos valores e a faixa de variação relativamente ampla dos intervalos para avaliação de “sem sinovite”, “sinovite de baixo grau” ou “sinovite de alto grau” presente no escore utilizado, dificulta a adequada caracterização do tipo de inflamação presente.

A análise descritiva, com base no histograma de distribuição de frequência da avaliação histopatológica, entretanto, mostra que o grupo OA-Fitoterápico apresentou mais casos sinovite de baixo grau quando comparados ao grupo OA-salina, em que a de alto grau foi observado em todas as amostras. Este fato pode estar atribuído ao efeito anti-inflamatório do extrato da *A. chica*, descrito por Zorn et al. (2001), relacionado à inibição do fator nuclear- κ B (NF- κ B). Este é um mediador central da resposta imune em seres humanos, que regula a transcrição de genes que codificam várias citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas inflamatórias, como iNOS, COX-2, 5-LOX e fosfolipase A2 citosólica [25]. Além disso, o NF- κ B está envolvido na regulação da transcrição de metaloproteases da matriz óssea e de enzimas angiogênicas [8], ambas substâncias presentes no processo degenerativo da OA. Por outro lado, esperava-se que os flavonoides e carotenoides, componentes ativos da *A. chica*, que possuem ação anti-inflamatória e antioxidante [17], atenuassem a degradação da membrana sinovial, pois o estresse oxidativo do processo inflamatório ocasiona um estado de distúrbio celular que leva as metaloproteinases e espécies reativas de oxigênio (ROS) a degradar os componentes da matriz articular [23].

Sabe-se que os achados radiográficos podem ter pouca relação com os sintomas apresentados pelos portadores de doença das articulações. Além disso, as alterações na largura do espaço articular, osteófitos e degenerações subcondrais podem ocorrer independentemente da presença da OA [10]. Entretanto, os resultados do presente estudo mostram que, após a indução da doença nos modelos experimentais, são encontrados escleroses subcondrais, osteófitos marginais e diminuição do espaço articular nos joelhos avaliados.

É importante ressaltar que nem sempre os parâmetros radiológicos estão associados à clínica ou aos resultados histológicos associados. Também não foi possível encontrar associação entre piores achados histológicos e radiografias, entre os grupos estudados. Observou-se, somente, que os valores

do grupo OA-Fitoterápico e do OA-Salina possuem distribuição variada nos diferentes graus da classificação de Kellgren-Lawrence. Esse resultado difere do estudo de Garrido et al. (2011) que encontraram discordância entre classificação radiológica, alterações macroscópicas e resultados histológicos, principalmente, em situações que indicavam uma osteodegeneração menos avançada. Quando o espaço articular não está totalmente obliterado ou as extremidades femoral e tibial estão próximas à linha articular, é difícil determinar se houve ou não destruição óssea, resultando, portanto, em escolha incorreta entre os graus mais leves [10].

Conclui-se que o extrato etanólico de *Arrabidaea chica* na dose de 50 mg/kg/dia, por via oral, não foi capaz de alterar ou impedir as alterações radiológicas mais frequentes que ocorrem na OA, entretanto nos animais tratados com o fitoterápico, observou-se sinovite crônica de menor grau. Sabe-se que as plantas medicinais são fontes de ampla variedade de princípios ativos. Torná-las acessíveis aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) pode proporcionar ampliação das opções terapêuticas, além de promover inclusão social e melhoria da atenção à saúde [3]. Sugere-se a realização de novos estudos mais aprofundados, que incluam número maior de modelos experimentais, para proporcionar melhor compreensão dos mecanismos de ação do fitoterápico, de forma a desfazer as possíveis divergências que existem na literatura.

5. REFERÊNCIAS

- [1] Abhishek A, Doherty M. Diagnosis and clinical presentation of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2013;39(1):45-66.
- [2] Alves MSM, Mendes PC, Vieira JG de P, Ozela EF, Barbosa WLR, Silva Júnior JOC. Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt. Bignoniaceae. *Brazilian J Pharmacogn.* 2010;20(2):215–21.
- [3] Brasil. 2009 - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Brasília, DF: Ministério da Saúde [acesso em 15 de fevereiro de 2014]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>
- [4] Campos WNS, Souza MA, Ruiz T, Peres TP, Néspoli PB, Marques ATC, Colodel EM, Souza RL. Experimental osteoarthritis in rabbits: lesion progression. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2013, 33(3), 279-285
- [5] Coimbra IB, Pastor EH, Greve JMD, Puccinelli MLC, Fuller R, Cavalcanti FS, Maciel FMB, Honda E. Consenso brasileiro para o tratamento de osteoartrite. *Rev Bras Reumatol*, 2002; 42(6).
- [6] 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
- [7] Costa AF. *Farmacognosia*, Vol. 2. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994
- [8] Ding, M.; Feng, R.; Wang, S.W.; Bowman, L.; Lu, Y.; Qian, Y.; Castranova, V.; Jiang, B.H.; Shi, X. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *J. Biol. Chem.*, v. 281, n.25, p.17359-17368, 2006.
- [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] Garrido CA, Sampaio TCFVS, De Souza Ferreira F. Estudo comparativo entre a classificação radiológica e análise macro e microscópica das lesões na osteoartrose do joelho. *Rev Bras Ortop.* 2011;46(2):155-9.
- [11] 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.
- [12] Krenn V, Morawietz L, Burmester GR, Kinne RW, Mueller-Ladner U, Muller B, et al. Synovitis score: Discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. *Histopathology.* 2006;49(4):358–64.
- [13] Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthrosis. *Ann Rheum Dis.* 1957;16(4):494-502
- [14] Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015;23(8): 1233–1241.
- [15] Islam MJ, Yusuf MA, Hossain MS, Ahmed M. Updated Management of Osteoarthritis: A Review. *J Sci Found*, 2013;11(2):49-55

- [16] Marmitt DJ, Rempel C, Goettert MI, Silva AC. Medicinal plants of renisus with analgesic activity review article. *Ver Fitos*, 2015 Vol. 9(2): 73-144
- [17] Michel AF, Melo MM, Campos PP, Oliveira MS, Oliveira FA, Cassali GD, Ferraz VP, Cota BB, Andrade SP, Souza-Fagundes EM. Evaluation of anti-inflammatory, antiangiogenic and antiproliferative activities of *Arrabidaea chica* crude extracts. *J Ethnopharmacol*. 2015;165:29-38.
- [18] Rêgo TJA. *Fitogeografia das plantas medicinais no Maranhão*. São Luís: EDUFMA, 1985.
- [19] Rezende MU De, Campos GC, Pailo AF. Conceitos atuais em osteoartrite. *Acta Ortopédica Bras*. 2013;21(2):120–2.
- [20] Rezende MU De, Campos GC. A osteoartrite: uma doença mecânica ou inflamatória? *Rev Bras Ortop*. 2013;48(6):471–4.
- [21] Rodrigues AA, Karam FC, Scorsatto C, Martins C. Análise da reprodutibilidade da classificação de Kellgren e Lawrence para osteoartrose de joelho. *Revista da AMRIGS*, 2012; 56(2):107-110
- [22] Taffarello D, Jorge MP, Sousa IMO, Duarte MCT, Figueira GM, Queiroz NCA, Rodrigues RAF, Carvalho, JE, Goes ALTR, Foglio MA, Riveros JM, Eberlin MN, Cabral EC. Atividade de extratos de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot obtidos por processos biotecnológicos sobre a proliferação de fibroblastos e células tumorais humanas. *Química Nova*, 36(3), 431-436.
- [23] 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
- [24] Ximenes AC, Melo AMP, Custodio DMEJ. Dor Osteoarticular. In: ALVES NETO, O (Org.) et al. *Dor: Princípios e Prática*. Porto Alegre: Artmed, 2009. Cap. 40, p. 486-490.
- [25] Zorn B, García-Pierres 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 E 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/locate/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*: Jørgen 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. Neurohistochemistry. 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. VIth 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.