

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO - UFMA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA – DEFAR
CURSO DE FARMÁCIA

JACQUELINE RIBEIRO DE OLIVEIRA

AÇÃO DO TRATAMENTO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (Mastruz) EM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM CAMUNDONGOS FÊMEAS

SÃO LUÍS - MA

2019

JACQUELINE RIBEIRO DE OLIVEIRA

AÇÃO DO TRATAMENTO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (Mastruz) EM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM CAMUNDONGOS FÊMEAS

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão-UFMA, Campus Dom Delgado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em farmácia Generalista.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Silva Pereira

Coorientador: Arthur André Castro da Costa

SÃO LUÍS - MA

2019

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

Oliveira, Jacqueline Ribeiro de.

Ação do tratamento da fração acetato de etila de
Dysphania ambrosioides L. Mosyakin & Clemants mastruz em
modelo experimental de osteoartrite em camundongos fêmeas
/ Jacqueline Ribeiro de Oliveira. - 2019.
55 f.

Coorientador(a): Arthur André Castro da Costa.

Orientador(a): Wanderson Silva Pereira.

Monografia (Graduação) - Curso de Farmácia,
Universidade Federal do Maranhão, Campus Dom Delgado,
2019.

1. Avaliação locomotora. 2. Inflamação crônica. 3.
Monoiodoacetato de sódio. I. Costa, Arthur André Castro
da. II. Pereira, Wanderson Silva. III. Título.

JACQUELINE RIBEIRO DE OLIVEIRA

Ação do tratamento da fração acetato de etila de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (mastruz) em modelo experimental de osteoartrite em camundongos fêmeas

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão-UFMA, Campus Dom Delgado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em farmácia Generalista.

APROVADO EM: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wanderson Silva Pereira (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dra. Crisálida Machado Vilanova (Avaliador 1)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva (Avaliador 2)
Universidade Federal do Maranhão

DEDICATÓRIA

Aos meus pais (Waruick Correia de Oliveira e Valderice Ribeiro de Oliveira) por sempre me apoiarem nos meus sonhos e me incentivarem nos estudos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus por tudo, pela minha vida!

Ao meu pai por me guiar no caminho dos estudos, por me ensinar valores éticos, morais!

À minha mãe por me ensinar a não desistir dos meus sonhos e por sempre cuidar de mim!

À minha irmã por sempre me escutar e por me dar sua opinião quando precisei!

Ao meu orientador Wanderson Pereira por me ajudar e incentivar nos caminhos da pesquisa científica!

Aos meus colegas do laboratório de pesquisa (LIF-Laboratório de Imunofisiologia), por sempre me ajudarem quando eu precisei ao longo desses três anos: Arthur André, Lucas André, Alda Karen, Danrley, Felipe Lima, Luís Douglas, Caroline Martins, Jefferson Brito, Andressa, Luanna, Laís Lima, Sulainy, André Vale, Jhonny Ramos, Jaianna, Emanuel Veras, Gustavo, Paula Sibely, Suzana, Dayanne, Alex, dona Joana, Carlene.

A minha dupla de pesquisa, Lucas André por sempre me apoiar e falar que no final iria dar certo!

Ao meu primo científico Arthur André por sempre me ajudar na execução das minhas atividades científicas, por sempre ter me ajudado!

Às minhas amigas, Laura Helena e Suellen Lima, por estarem ao meu lado durante minhas batalhas da graduação desde o início!

Ao corredor formado por: Isaias Figueiredo, Juliana Melo, Rafaela Goés, Welláine Jéssica, Yasmim Vale, Ana Clara Coutinho, Ana Paula Mesquita, Anderson Assis, Carla Milena Sá, Deane Caroline, Laura Helena, Luzimar Araújo, Raíssa Pereira, Rosemary Silva e Tassiano Ribeiro!

Às minhas amigas Ingrid Naiany e Jéssica Freitas por sempre me apoiarem!

Às minhas primas Suzane Almeida e Bruna Sousa!

Aos meus professores em especial Crisálida Machado Vilanova, Flávia Raquel Nascimento, Rosimary de Jesus Gomes Turri, Márcia Maciel, Mayara Cristina, Terezinha Rêgo, Thiare Fortes, Éder Fialho, Paulo Vitor, Lucilene Amorin e Raimundo Oliveira

À Yasmim Vale por todas as caronas e por sempre me escutar!

Aos meus colegas da extensão de fitoterapia Fernanda Teixeira, Antônio Felipe, Tasso Ramon, Tassio Luz, Antônio Leite, Marcus Barros, Ana Beatriz, Mariele Ferreira, Mauricio Borralho, Samara, Rafael, Franklin Muniz, Bianca Noelle e Camila Aguiar

Aos meus colegas da liga acadêmica de Imunofarmacogenética Caroline Malheiros, Rafael, Ivana Sousa, Stella Diniz e Daniella Silveira;

Aos meus amigos Yan Fernandes, Flávio Prazeres, Paulo Diniz;

Aos meus colegas Cássio Leite, Marcos Martins e Larissa Marques

A todos os meus professores do curso de Farmácia que me ajudaram ao longo da minha caminhada acadêmica com seus ensinamentos!

“A persistência é o caminho do êxito”
Charles Chaplin

RESUMO

A osteoartrite (OA) é uma condição crônica e gradativa gerada pela perda da cartilagem articular. É a forma mais comum de artrite, caracterizada pela presença de dor e incapacidade funcional. Em modelos experimentais de indução de OA tem-se utilizado o monoiodoacetato de sódio (MIA) - um composto modificante de resíduos de proteína capaz de ocasionar a degradação da cartilagem articular dos animais, com o intuito de avaliar o efeito de tratamentos alternativos frente a essa doença. *Dysphania ambrosioides* conhecida popularmente como mastruz, apresenta um grande potencial anti-inflamatório e imunomodulador e na literatura tem descrito que a fração de acetato de etila (FAcOET) de *D. ambrosioides* desempenha o efeito anti-inflamatório em modelos inflamatórios. Deste modo, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do tratamento da fração acetato de etila frente ao modelo experimental de osteoartrite em *Swiss* fêmeas. Para isso os animais foram divididos em 4 grupos: o controle, grupo dexametasona, grupo FAcOEt na dose de 1mg/kg e o grupo FacEOt na dose 5mg/kg. Os quatros grupos foram submetidos a indução de OA por injeção de 10µL de MIA (dose 8 mg/kg do peso do animal) no ligamento do joelho direito. A avaliação locomotora foi verificada através da atividade de subida de escada, cronometrados e avaliados nos dias 1, 11, 21, e 31, e a circunferência do joelho do animal foi medido através de fita milimétrica. No 31º dia, ocorreu a eutanásia dos animais e foram coletados o linfonodo inguinal e o baço, os quais foram pesados e macerados, respectivamente, em 1ml e 5ml de PBS 1x; a contagem total de células foi realizada em câmara de Neubauer. Por fim, a pata direita dos animais foi removida para análises histopatológicas da cartilagem. Com a indução da OA, o grupos apresentaram pico inflamatório no primeiro dia de indução, e aos grupos tratados com a fração acetato de etila de *D.ambrosioides* na dose 1mg/kg e 5 mg/kg mostraram diminuição do tempo de atividade locomotora, quando verificado em relação a circunferência articular, observou-se diferença significativa nas duas doses trabalhas. Quando comparado o peso dos órgãos linfoides do grupo Controle com os grupos que foram administrados as frações não houve diferença significativa. Em relação aos cortes histopatológicos, foi observado diferença significativa em relação a necrose, infiltrado inflamatório, extensão da lesão e edema entre as frações trabalhadas nas duas doses, principalmente na FacOET5 em relação ao grupo controle. Percebeu-se melhora dos animais tratados com dose oral de *D. ambrosioides* tanto na dose de 1mg/kg quanto na dose de 5mg/kg, principalmente em relação a inflamação da região articular quanto na manutenção da arquitetura óssea e cartilaginosa.

Palavras-chave :Inflamação crônica, Monoiodoacetato de sódio, Avaliação locomotora.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a chronic and gradual condition caused by loss of joint cartilage. It is the most common form of arthritis, characterized by the presence of pain and functional disability. In experimental models of OA induction, sodium monoiodoacetate (MIA), a protein-modifying compound capable of causing degradation of the articular cartilage of animals, has been used to evaluate the effect of alternative treatments against this disease. *Dysphania ambrosioides* popularly known as mastruz, has a great anti-inflammatory and immunomodulatory potential and in the literature has described that the ethyl acetate fraction (FAcOET) of *D. ambrosioides* plays the anti-inflammatory effect in inflammatory models. This work aims to evaluate the effect of the treatment of the ethyl acetate fraction against the experimental model of osteoarthritis in female mice. For this, the animals were divided into 4 groups: the control, the dexamethasone group, the FAcOEt group at a dose of 1mg / kg and the FAcEOt group at a dose of 5mg / kg. All four groups underwent OA induction by injection of 10 μ L MIA (dose 8 mg / kg body weight) into the right knee ligament. The locomotor evaluation was verified by climbing ladder activity, timed and evaluated on days 1, 11, 21, and 31, and the knee circumference of the animal was measured by means of a millimeter tape. On the 31st day, animals were euthanized and the inguinal lymph node and spleen were collected, which were weighed and macerated, respectively, in 1ml and 5ml of 1x PBS; the total cell count was performed on a Neubauer camera. Finally, the right paw of the animals were removed for histopathological analysis of the cartilage. With the induction of OA, the groups showed an inflammatory peak on the first day of induction, and the groups treated with the ethyl acetate fraction of *D.ambrosioides* at the dose 1 mg / kg and 5 mg / kg showed a decrease in the time of locomotor activity, when verified in relation to the joint circumference, a significant difference was observed in the two working doses. When we compared the weight of the lymphoid organs of the control group with the groups that were administered the fractions there was no significant difference. In relation to histopathological sections, a significant difference was observed in relation to necrosis, inflammatory infiltrate, lesion extension and edema between the fractions worked in the two doses, mainly in FAcOET5 in relation to the control group. Improvement of the animals treated with oral dose of *D. ambrosioides* was observed both at 1mg / kg and at 5mg / kg, mainly in relation to inflammation of the articulate region and in the maintenance of bone and cartilaginous architecture.

Keywords: chronic inflammation, Monoiodoacetate sodium, Locomotor evaluation

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: <i>Dysphania ambrosioides</i> (A), exsicata (B) e folhas (C).....	26
FIGURA 2 :Avaliação do desenvolvimento da Osteoartrite	34
FIGURA 3:Fórmula para calcular a circunferência articular	34
FIGURA 4:Avaliação locomotora.....	34
FIGURA 5:Fórmula para calcular a avaliação locomotora.....	34
FIGURA 6 :Efeito do tratamento da fração acetato de etila de <i>D. ambrosioides</i> sobre o desenvolvimento da Osteoartrite em camundongos.....	37
FIGURA 7: Efeito do tratamento da fração acetato de etila de <i>D. ambrosioides</i> sobre a atividade locomotora em camundongos com Osteoartrite	39
FIGURA 8: Efeito do tratamento da fração acetato de etila de <i>D. ambrosioides</i> sobre o peso dos órgãos linfoides de camundongos com Osteoartrite	40
FIGURA 9: Efeito do tratamento da fração acetato de etila de <i>D. ambrosioides</i> sobre a contagem celular de camundongos com Osteoartrite	41
FIGURA 10: Cortes histopatológicos do ensaio experimental em modelo de osteoartrite em camundongos fêmeas.....	

LISTA DE TABELA

TABELA 1:Organização dos grupos experimentais.....	34
TABELA 2. Escore clínico relacionado aos cortes histológicos.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AINES- Anti-inflamatórios não esteroides
- AH- Ácido hialurônico
- $\text{CH}_3(\text{CO})_2$ - Anidrido Acético
- CCl_2H_2 – Diclorometano
- CH_4 – Metano
- $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ - Álcool etílico
- $\text{C}_4\text{H}_9\text{O}$ - Butanol
- C_6H_{14} -Hexano
- COX 1 –Ciclo-oxigenase-1
- COX-2-Ciclo-oxigenase-2
- DEXA- Dexametasona
- EBH- Extrato bruto hidroalcolico
- EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético
- DMDOA-medicamentos modificadores da doença osteoartrite
- FACoET1- Fração acetato de etila de *D. ambrosioides* 1 mg/kg
- FACoET5- Fração acetato de etila de *D. ambrosioides* 5 mg/kg
- H_2O - Água destilada
- IBGE –Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IL-1 β - Interleucina 1 β
- IL-8- Interleucina 8
- IL-6- Interleucina 6
- IL-1RA- antagonista do receptor da interleucina
- MIA- Monoiodoacetato de sódio
- (m/v) -Massa /volume
- MTT- (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina)
- MMPs- Metaloproteinases
- NO- Óxido nítrico
- OA- Osteoartrite
- OC- Osteocalcina
- ON- Osteonectina
- P.A- Para Analise

PBS- Solução salina tamponada de fosfato

PDGF- fator de crescimento derivado de plaquetas

PRP-Plasma rico em plaquetas

PGE2- Prostaglandina E2

RENISUS- Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

RENAME- Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

SUS-Sistema Único de Saúde

TNF-RI- Receptores solúveis do fator de necrose tumoral alfa

TGF-B- Fator de crescimento transformador beta

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

(V/V) -Volume

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1-OSTEOARTRITE	19
2.2-TRATAMENTO DA OSTEOARTRITE	21
2.2.1 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO E NÃO FARMACOLÓGICO.....	21
2.2.2 TRATAMENTO ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO	22
2.2.3 TRATAMENTO COM MODIFICADORES DA DOENÇA OSTEOARTRITE	22
2.2.4 TERAPIA GÊNICA	24
2.2.5 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)	25
2.3- PRODUTOS NATURAIS.....	25
2.4- DYSPHANIA AMBROSIOIDES	26
2.4.1- PROPRIEDADE MEDICINAL.....	27
2.4.1.2-ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA.....	27
2.4.1.3-ATIVIDADE ANALGÉSICA	28
2.4.1.4-ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	28
2.4.1.5-ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	28
2.4.1.6-ATIVIDADE BACTERIOSTÁTICA	28
2.4.1.7-ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E ANTITUMORAL	29
2.4.1.8-ATIVIDADE CICATRIZANTE.....	29
2.4.1.9-ATIVIDADE IMUNOMODULADORA	29
2.4.1.10-ATIVIDADE ANTIOXIDANDE	29
2.4.1.11-ATIVIDADE INSETICIDA	30
3. JUSTIFICATIVA	30
4.OBJETIVOS.....	31

4.1 GERAL	31
4.2 ESPECÍFICOS	31
5. MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1- MATERIAL BOTÂNICO E PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	32
5.2-ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	33
5.3 ANIMAIS	33
5.4 MODELO DE OSTEOARTRITE INDUZIDA POR MONOIODOACETATO DE SÓDIO	33
5.5 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA OSTEOARTRITE.....	33
5.6 AVALIAÇÃO LOCOMOTORA	34
5.7-PESO E NÚMERO DE CÉLULAS DOS ÓRGÃOS LINFOIDES	35
5.8- ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS	35
5.9- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	35
5.10- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
6.RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	37
7.CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAIS	47

1.INTRODUÇÃO

A Osteoartrite (OA) é uma doença articular que acomete principalmente idosos e é responsável por ocasionar grande incapacidade locomotora e perda de qualidade de vida. Afeta quadris, mãos e pés, mas principalmente joelhos (BIJLSMA et al.,2011; REZENDE et al.,2013).

A OA comporta-se como uma doença inflamatória ocasionada devido respostas mediadas por condrócitos e sinoviócitos, gerando níveis séricos sinoviais de citocinas inflamatórias elevadas (PEARLE, et al., 2007; SOHN et al., 2012). Pode-se dizer também que é uma doença mecânica, pois está relacionada com movimento e força física, ou é causada por esses fatores. A ocorrência do aumento na força física em áreas localizadas na articulação leva à OA. Esse estresse mecânico muitas vezes é entendido como citocinas pelo organismo, o que pode ser interpretado por mecanorreceptores, ativando assim a cascata inflamatória (; PISCOYA, 2005; BRANDT et al., 2009; KAWAKITA, 2012;).

A importância nos estudos desta doença aumenta a cada ano, visto que se observa a tendência do envelhecimento da população Mundial. Logo, é de suma importância o entendimento da fisiopatologia da OA, além da percepção de que o processo de desenvolvimento da doença não é apenas mecânico e/ou de envelhecimento, e sim que é composta de inúmeros fatores que devem ser elucidados para um amplo entendimento da doença (REZENDE et al., 2013).

Em 1977 foi descrito pela primeira vez por Kalbhen e Blum a utilização de monoiodoacetato de sódio (MIA) em modelos experimentais de OA, esse composto modifica os resíduos de cisteína das proteínas e quando administrado na articulação de animais ocasiona alterações nas concentrações de proteoglicanas da cartilagem, interrompendo assim a glicólise, gerando a quebra no metabolismo dos condrócitos, tendo como consequência a degradação da articulação. Por consequência, ocorre uma retração na cartilagem levando ao processo de degradação, e por fim, às características histopatológicas semelhantes a OA de humanos (GOLDRING, 2000).

Essa aplicação intra-articular com MIA gera sinais de nocicepção, sendo aparentemente mais preditivo para o estudo da OA. Entretanto, no que diz respeito a dor, os modelos experimentais têm observado o fenômeno de hiperalgesia secundária, em detrimento da nocicepção no sítio primário de lesão, que seria o sintoma de real morbidez na clínica (MASCARIR, 2015).

Como forma de tratamento para essa doença são utilizados anti-inflamatórios como, meloxicam, cetoprofeno, celecoxibe, indometacina. Entretanto, esses medicamentos, geram benefícios e malefícios, e o uso prolongado de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) pode ocasionar distúrbios gastrointestinais, além de não serem indicados em pacientes com histórico de doenças hepáticas e renais (CRF-SP, 2013). Outras drogas utilizadas para o tratamento da OA são: ácido hialurônico, diacereína, glucosamina, condroitina, insaponificáveis do abacate e para dor intensa são utilizados opioides (REZENDE e GOBBI, 2009).

O uso de plantas medicinais tem um vasto registro histórico. Indícios que a sua utilização para tratamento de doenças vem antes de 4.000 a.C. Tendo como exemplo, o primeiro registro médico depositado no Museu da Pensilvânia que é datado de 2.100 a.C., no qual apresenta uma coleção de fórmulas de trinta diferentes tipos de drogas de origem vegetal, animal e mineral (DUARTE, 2006). Atualmente, essas plantas são muito utilizadas pela maioria da população, que busca como alternativa a cura de doenças e sintomas, proporcionando uma melhoria na qualidade de vida e oferecendo uma outra forma de tratamento, além dos medicamentos alopáticos utilizados (TAUFNER et al., 2006).

Uma destas plantas utilizadas é *Chenopodium ambrosioides* L., ou de acordo com o Trópicos® (TROPICOS.ORG, 2017), *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants . (nome atualmente mais aceito), conhecida popularmente como mastruz ou erva de Santa Maria. É amplamente distribuída no Brasil, pertence à família Amaranthaceae, erva perene, com até 1m de altura. É originária da América Central e do Sul (LORENZI e MATOS, 2008).

Na medicina popular brasileira é tida como estomática, antirreumática e anti-helmíntica (LORENZI e MATOS, 2008), além de ser muito utilizada para tratamentos de gripe (SÁ, 2013). Cientificamente, já foi comprovada sua ação cicatrizante (PINHEIRO NETO et al., 2005), imunomoduladora (CRUZ et al., 2007), antitumoral (NASCIMENTO et al., 2006), anti-inflamatória (PEREIRA, 2009; 2014), apresenta efeito - na diminuição da nocicepção (GRASSI, 2011), e apresenta também atividade citotóxica contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (REIS et al., 2012). Os estudos farmacológicos demonstram uma ampla propriedade terapêutica, e aliado ao reconhecido do uso popular, esta espécie possui grande potencial para se tornar um fitoterápico (SÁ, 2013).

D. ambrosioides é umas das 71 plantas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), nesta lista, constam as plantas medicinais que apresentam potencial para a geração de produtos para o SUS, que tem como finalidade orientar estudos e pesquisas que possam auxiliar a elaboração de fitoterápicos para uso da população, com

segurança e eficácia para o tratamento de inúmeras doenças (BRASIL, 2009). Atualmente a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME (2013), conta com dois fitoterápicos para o tratamento coadjuvante nos casos de osteoartrite (OA) e artrite, como a garra-do-diabo (*Harpagophytum procumbens*) e unha-de-gato (*Uncaria tomentosa*).

Tendo em vista, a importância no desenvolvimento de novos fitoterápicos e também nas necessidades de cuidados com inúmeras doenças, principalmente aquelas que afetam a população idosa, que segundo dados do IBGE (2008) mostram que, em 40 anos, a população idosa irá triplicar no país. E em 2030, o número de idosos com 60 anos ou mais de idade irá ultrapassar o de crianças de 0 a 14 anos, e essa crescente população carece de inúmeros cuidados, principalmente na saúde, que devem ser adequados (IBGE, 2008).

Não há dados na literatura sobre o efeito da fração acetato de etila do extrato das folhas de *D. ambrosioides* sobre os mecanismos envolvidos com a resposta imune e fisiológica frente ao desenvolvimento da OA em camundongos fêmeas. Sabe-se que esta espécie tem potencial imunomodulador e possui constituintes químicos como ácidos orgânicos, alcaloides, compostos fenólicos, saponinas, taninos condensados e flavononas (NEIVA et al., 2011). Assim, pretendeu-se avaliar o efeito do tratamento oral da fração acetato de etila do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *D. ambrosioides* sobre o desenvolvimento da OA.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1-OSTEOARTRITE

A osteoartrite é uma doença articular crônico-degenerativa caracterizada pelo desgaste da cartilagem articular, pode ocorrer em vários locais articulares no corpo, geralmente as articulações de sustentação de peso (SANTOS et al., 2011). Segundo estudos recentes, comporta-se como uma doença mecânica, pois o movimento e a força física em áreas localizadas da articulação podem gerar OA (SOHN et al., 2012). Mas também é considerada inflamatória devido as respostas mediadas por condrócitos e sinoviócitos (BRANDT et al., 2009).

A OA afeta principalmente quadris, joelhos, pequenas articulações das mãos e pés, além de áreas inferiores da coluna levando a grande incapacidade e perda de qualidade de vida (BIJLSMA et al.,2011; REZENDE et al.,2013). Os principais sintomas da OA são dores nas articulares de duração e intensidade variáveis de acordo com o estado da doença, rigidez matinal de curta duração, crepitação óssea, disfunção física, edema, frouxidão dos ligamentos, diminuição ou perda do movimento, contraturas capsulares e fraqueza muscular (OKUMURA et al., 2009).

O diagnóstico é realizado através da história clínica, caracterizada por dor, inchaço nas juntas e deformidades, além dos achados ao exame físico. Os exames de imagem, como a radiografia, auxiliam no diagnóstico e, em situações especiais, pode-se necessitar de exames adicionais, como a tomografia computadorizada ou a ressonância nuclear magnética. Mas, em geral, a história clínica e a radiografia fecham o diagnóstico (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2011).

A OA é considerada a doença mais comum do aparelho locomotor e a maior causa de incapacidade, tanto em países desenvolvidos quanto nos chamados países emergentes. Os principais fatores de risco associados à OA estão relacionados com a idade, gênero (mais frequente em mulheres), obesidade, doenças metabólicas ou endócrinas, trauma ou sobrecarga articular, além dos fatores genéticos (ROYAL COLLEGE OF PHYSIANS, 2008; PORTAL SAÚDE, 2011).

Cerca de 40% dos idosos com idade acima de 70 anos apresentam OA de joelhos, e 80% dos que apresentam a doença têm algum tipo de limitação de movimento (SHARMA e KAPOOR et at., 2006). Nos Estados Unidos, por exemplo, estima-se que 36,4% dos

indivíduos com mais de 60 anos apresentem OA de joelhos (DILLON et al., 2006). No Brasil, o número de indivíduos com mais de 60 anos aumentou de 7,2 milhões em 1980 para 19,2 milhões em 2010 e provavelmente chegará a 64 milhões em 2050 (IBGE, 2008).

O considerável aumento de OA em mulheres pode ocorrer também devido ao desequilíbrio hormonal (GOMES, 2007), após a menopausa à presença de receptores de estrogênio em tecidos articulares sugere ligação entre a OA e a perda da função ovariana (SOWERS e KARVONEN, 2010). Segundo WHO (2017), estima-se que 9,6% dos homens com idade acima de 60 anos apresentavam OA sintomática; para mulheres este índice praticamente duplica, chegando a aproximadamente 18,0%.

Fatores de risco como a obesidade geram sobrecarga nos joelhos e quadris, principalmente em indivíduos com OA, o que ocasiona um padrão de dor e dificuldades funcionais, especialmente na locomoção (VASCONCELOS et al., 2010). Essas alterações biomecânicas da articulação, levam à gênese do processo inflamatório na cartilagem, o que culmina no desenvolvimento e progressão da doença (JIANG et al., 2011).

Além disso, o estresse mecânico, tanto por compressão estática quanto por dinâmica, aumenta a produção de óxido nítrico (NO) pelos condrócitos, assim como a expressão de óxido nítrico sintetase (NOS) (FITZGERALD e GRODZINSKY, 2006). Os agentes oxidantes, entre eles o NO, promovem apoptose de condrócitos, processos catabólicos e degeneração da matriz. Sendo assim, são causadores de dois importantes eventos patogênicos característicos dos condrócitos osteoartríticos: senescência prematura e apoptose (LOESER, 2009). Estudos recentes associaram a presença de citocinas ao tecido adiposo, incluindo adiponectina, leptina e resistina, que podem influenciar a OA através da degradação direta da articulação ou pelo controle de processos inflamatórios locais (SOWERS e KARVONEN, 2010).

O processo fisiopatológico da OA envolve a perda da homeostase metabólica com o surgimento de sinalizadores de degradação, estimulados por cascatas de citocinas, e a produção de mediadores inflamatórios na região articular. Em pacientes com OA, os condrócitos, assim como as células sinoviais, produzem níveis aumentados de citocinas inflamatórias, como a interleucina 1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que por sua vez, diminuem a síntese de colágeno e aumentam mediadores catabólicos, como metaloproteinases (MMPs) e outras substâncias inflamatórias como interleucina 8 (IL-8), interleucina 6 (IL-6), prostaglandina E2 (PGE2) e óxido nítrico (NO) (PELLETIER, 2001). Resultando em numa reparação tecidual deficiente (SILVA, 2009).

2.2-TRATAMENTO DA OSTEOARTRITE

A abordagem do tratamento da OA envolve alguns seguimentos, em linhas gerais está relacionado com a educação do paciente sobre a doença, controle da dor, melhora da função e diminuição da deficiência, alteração do processo de doença e suas consequências. Os planos de tratamento nunca devem ser rigidamente definidos de acordo com a aparência radiográfica da articulação, mas devem manter-se flexíveis, de modo que possam ser alterados de acordo com as respostas funcionais e sintomáticas obtidas (JOSE, 2013).

2.2.1 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO E NÃO FARMACOLÓGICO

Todos os pacientes com osteoartrite precisam de acesso à informação e educação sobre tratamento, e a importância de mudanças no estilo de vida, exercícios, adequação das atividades, redução de peso e outras medidas para diminuir o impacto sobre as articulações. O foco inicial deve ser em autocuidado devido à importância no incentivo ao tratamento não-farmacológico.

Pacientes devem ser incentivados a prática regular de exercícios aeróbios, de fortalecimento muscular e de ganho de amplitude de movimento. Pacientes com OA sintomática podem ser encaminhados à fisioterapia para avaliação e instrução de exercícios apropriados para reduzir a dor e aumentar a capacidade funcional (ZHAI et al., 2010). O uso de bengalas e andadores também é recomendado para OA sintomática dos joelhos, promovendo melhora da dor e menor gasto de energia (JONES et al., 2012).

Acupuntura é uma modalidade de tratamento com comprovado benefício na melhora no quadro da dor na OA (MANHEIMER et al., 2010). Outras terapias do corpo e da mente, como yoga, *tai chi* e *qi gong* também podem ser usadas no tratamento da OA, com evidência de melhora. O uso de medicamentos é complementar ao tratamento não farmacológico (SELFE e INNES et al., 2009). Este conjunto de estratégias constitui a primeira linha no tratamento, sendo de fundamental importância na recuperação, manutenção do estado funcional e principalmente na readaptação do indivíduo (JOSE, 2013).

Os recursos farmacológicos disponíveis para o tratamento da OA podem ser de uso sistêmico, tópico ou intra-articular. Entre os tratamentos farmacológicos disponíveis, existem os essencialmente analgésicos, que não interferem no curso da doença, os anti-inflamatórios e,

por fim, os medicamentos modificadores da doença osteoartrite (DMDOA), que são capazes de reverter, estabilizar ou pelo menos retardar o curso da OA (LOESER, 2009).

2.2.2 TRATAMENTO ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO

O medicamento de primeira escolha para o controle da dor é o paracetamol, na dose de até 4g/dia. Uma alternativa para os pacientes com restrições ao uso sistêmico de AINEs é a prescrição de analgésicos como a capsaicina ou anti-inflamatórios tópicos. Tanto os AINEs quanto os inibidores da COX-2 devem ser utilizados na menor dose eficaz e no menor tempo possível (JOSE, 2013).

Os profissionais de saúde devem levar em conta os fatores de risco de cada paciente, incluindo a idade, a avaliação do risco de toxicidade gastrointestinal e renal. O perfil do meloxicam e dos demais COX-2 seletivos para OA, demonstram segurança gastrointestinal e perfil econômico favorável em relação aos fármacos da classe dos coxibes. Em caso de resposta inadequada ou contraindicação aos AINEs, pode ser utilizado os opióides em caso de dor intensa, como o tramadol (JOSE, 2013).

2.2.3 TRATAMENTO COM MODIFICADORES DA DOENÇA OSTEOARTRITE

Entre os DMDOA de uso oral destacam-se o ácido hialurônico (FIDEX et al., 2006), glicosamina (TOWHEED et al., 2006), a condroitina (HOCHBERG e ZHAN, 2008), a associação de glicosamina com condroitina (CLEGG et al., 2006), os extratos insaponificáveis de soja e abacate (CHRISTENSEN et al., 2008) e a cloroquina (VOULTRRNOHNO, 2006).

O ácido hialurônico (AH) é uma DMDOA de uso intra-articular, e a sua aplicação recebe o nome de viscosuplementação (VS) (DE REZENDE, M.U et al., 2013). Tem importante ação moduladora, principalmente através da interação com receptores CD44 presente nos sinoviócitos tipo B (WANG et al., 2006). Além dos efeitos mecânicos de promover melhor distribuição de forças, diminuir a pressão pelo peso e recuperar as propriedades reológicas do líquido sinovial, além de atuar bioquimicamente, diminuindo a expressão gênica das citocinas e enzimas associadas a OA (WANG et al., 2006).

Atualmente recomenda-se a adição de 1ml por aplicação por viscosuplementação. Os hialuronanos, como o hialuronato de sódio, apresentam meia-vida intra-articular de 13 horas. E sua aplicação é semanal entre três a cinco semanas (CAMPOS et al, 2013).

Os bons resultados clínicos têm mostrado a eficácia do ácido hialurônico no alívio da dor e na melhora da rigidez articular, sendo seu uso intra-articular indicado para o tratamento da osteoartrite do joelho, tanto na fase aguda quanto crônica. A viscosuplementação podem ser utilizadas na articulação dos joelhos, ou em qualquer articulação osteoartríticas (LOVATO et al., 2006). Estudos relataram que a terapia combinada de ácido hialurônico e corticoide podem reduzir maior e mais rápida a intensidade da dor do que o ácido hialurônico isoladamente (JOSE, 2013).

A glucosamina participa da síntese das glicosaminoglicanas (GAGs), proteoglicanas e hialuronato da cartilagem articular, porém o mecanismo exato ainda não estar elucidado (TOWHEED et al., 2005). Funciona tanto como substrato, quanto age diretamente no condrócito, estimulando a síntese de proteoglicanas e inibindo metaloproteases. Inibe os efeitos da IL-1 sobre o fator nuclear capa beta dentro do condrócito, também inibindo a produção de NO, mais IL-1 e TGF. Tem ação sobre o osteoclasto e sobre a sinóvia (JIMENEZ e DODGE, 1997). Há três tipos de glucosamina no mercado: a glucosamina hidrocloreídrica (retirada da casca de caranguejo), a glucosamina sulfatada (retirada da casca de camarões de águas profundas) e a glucosamina sintética (sulfatada) (REGINSTER et al., 2001).

O sulfato de condroitina é uma glicosaminoglicana encontrada em vários tecidos humanos, inclusive na cartilagem hialina. Essa substância estimula diretamente a cartilagem através da inibição da IL-1 e metaloproteases (MATHIEU, 2002).

A associação da glucosamina com condroitina agem por vias diferentes tendo efeitos complementares. A dose usual é de 1,5 g de glucosamina e 1,2 g de condroitina em dose única diária ou dividida, dependendo da apresentação comercial (REZENDE e GOBBI, 2009). São comprovadamente inibidores de IL-1, IL-6, IL-8 e metaloproteases e estimuladores do condrócito *in vitro* (HENRATIN et al., 2003).

Uma meta-análise de (2008) através de estudos controlados com insaponificáveis de soja e de abacate foi possível observar que seu uso reduz a dor, assim colabora para a diminuição da utilização de analgésicos e melhora a função de pacientes com OA de joelhos. Apesar disso, ainda não está esclarecida a capacidade dessa droga de prevenir a perda do espaço articular na artrose. A dose indicada é de 300mg/dia (CHRISTENSEN et al., 2008).

Segundo o consenso brasileiro de OA (2002), os insaponificáveis de soja e de abacate apresentam ainda efeitos de supressão da produção de óxido nítrico induzida por IL-1, porém a eficácia clínica no tratamento da artrose não é estabelecida.

No Brasil, há consenso de indicação da cloroquina como forma de tratamento da OA, principalmente nas formas inflamatórias e erosivas da artrose (VUOLTEENAHO et al., 2005).

2.2.4 TERAPIA GÊNICA

Outros tratamentos em desenvolvimento relacionado a OA estão relacionados a terapia gênica e a aplicação de plasma rico em plaquetas. Na terapia gênica, a interleucina IL-1 e o TNF- α são considerados os principais potenciais alvos para terapia em OA. O NF- κ B é um dos principais fatores de transcrição relacionado à via inflamatória e vários métodos têm sido usados para inibir a indução de NF κ B, como o uso de oligonucleotídeos antissenso (AUTIERI et al., 1995). A interferência por RNA foi capaz de inibir a expressão de vários genes relacionados à via de sinalização do NF- κ B, tais como os genes da ciclooxigenase-2 (COX-2), da óxido nítrico sintetase-2 (NOS-2) e da metaloproteinase-9 de matriz (MMP-9).

Esses mediadores estão associados ao início e à progressão da lesão articular em modelo de osteoartrite e são induzidos em condrócitos expostos a IL-1 e TNF- α . Estudos demonstram que o siRNA específico para NF- κ B p65 é um potencial candidato na terapia gênica preventiva para OA em estágios precoces (LIANXU et al., 2006).

Outro alvo da terapia gênica é a atuação deste processo na senescência dos condrócitos como alvo de estudos com siRNA, uma vez que a idade é considerada um dos fatores de risco para desenvolvimento de OA, devido a correlação com a queda na síntese de matriz extracelular pelos condrócitos. Uma das proteínas envolvidas nos estudos está relacionada, a p16INK4a que tem um papel importante no controle do ciclo celular e senescência, atuando como um competidor de ciclinas que controlam a saída da célula da fase G1 e levando à senescência (HILL et al., 2003).

Em pacientes com OA há uma alta expressão de p16INK4a e o silenciamento desta proteína *in vitro* em condrócitos de pacientes com OA leva a uma alteração de suas características senescentes como, aumento na expressão de alguns genes específicos de condrócitos e a melhora geral em sua capacidade de reparo. A inibição da p16INK4a por RNAi pode ser uma estratégia terapêutica explorada para o bloqueio da senescência articular de condrócitos relevante à prevenção e tratamento de OA (ZHOU et al., 2004).

2.2.5 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

A utilização do PRP injetado no sítio lesionado, gera ativação de plaquetas pela trombina endógena e/ ou colágeno intra-celular. Uma vez ativados, desencadeiam a liberação de fatores de crescimento por meio da degradação dos grânulos alfa (AHMAD et al., 2012). Dentre as substâncias liberadas, incluem -se o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), antagonista do receptor da interleucina-1(IL-1RA), receptores solúveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF-RI), fator de crescimento transformador beta (TGF-B), osteocalcina (Oc), osteonectina (On), dentre outros fatores (LACCI e DARDIK, 2010). Vários destes fatores atuam com a função anti-inflamatória e anticatabólica (VAN BUUL et al., 2011). O fator de crescimento transformador beta atua também como inibidor da degradação da cartilagem e substâncias como IGF1, PDGF e TGF-B1, auxiliam na estabilização da cartilagem por meio de regulação metabólica dos condrócitos (SCHMIDT et al., 2005; ANITUA et al., 2007).

2.3- PRODUTOS NATURAIS

As plantas medicinais são utilizadas amplamente pelos pacientes com OA, entre estas, pode-se destacar as formulações com extratos das espécies de *Harpagophytum procumbens*, *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roem. & Schult) DC (LONG et al., 2001) e *Boswellia serrata* (CARDOSO CC, 2015). Estas três plantas apresentam eficácia comprovada ao nível do alívio da dor e no aumento da função física, que são as principais causas da diminuição da qualidade de vida dos pacientes (CARDOSO CC, 2015).

O fitoterápico garra-do-diabo é comercializado nos países europeus e mais recentemente no Brasil, com o nome de ARPADOL[®]. O extrato seco de raízes secundárias do *H. procumbens* tem como principal princípio ativo um iridóide glicosilado, o harpagosídeo, responsável pelas propriedades terapêuticas da planta e usado como marcador químico (ANAUATE et al., 2009). *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roem. & Schult) DC cujo nome popular é unha-de-gato apresenta efeito modular (SETTY & SIGAL, 2005). Outra planta com efeito anti-inflamatório (PEREIRA et al., 2015), imunomolador (CRUZ et al., 2007) e antiedematogênica (PEREIRA NLF et al., 2015) utilizada pela população é a *Dysphania ambrosioides*.

2.4- DYSPHANIA AMBROSIOIDES

Dysphania ambrosioides é uma erva perene, com até um metro de altura. É conhecida popularmente como erva-de-santa-maria, mastruço, mastruz, mentruço, quenopódio, erva-embrósia, dentre outros (LORENZI e MATOS, 2008). Possui folhas simples, alternadas, pecioladas, de tamanhos diferentes, sendo menores e mais finas na parte superior da planta, limbo alongado, lanceolado ou oval-alongado, base simétrica e atenuada, ápice agudo, margem denteada, nervação peninérvea, folhas concolores, consistência papirácea e pecíolo alado (SILVA et al., 2012).

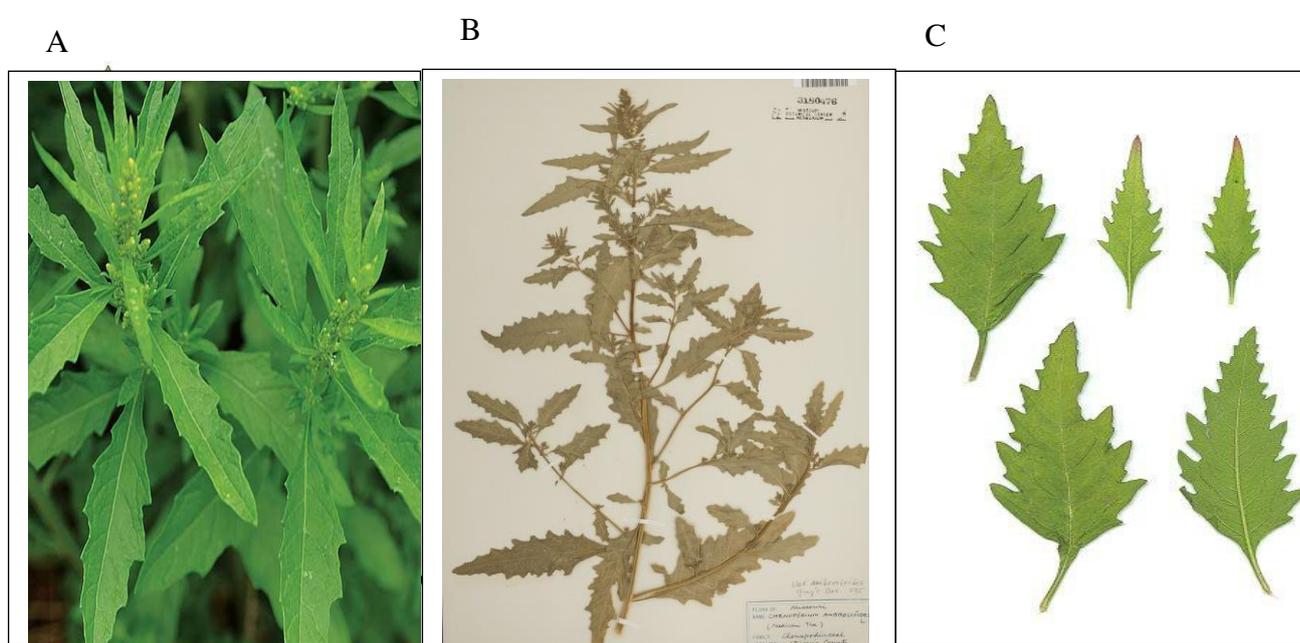


Figura 1: *Dysphania ambrosioides* (A), exsicata (B) e folhas (C). Fonte : <https://www.seedsavers.org/department/e> e <https://www.tropicos.org/>

Dysphania ambrosioides L. pertence à família Amaranthaceae, com divisão Magnoliophyta, classe: Magnoliopsida, ordem: Coryophyllales, gênero *Dysphania* e nomenclatura binomial de *Dysphania ambrosioides* (Mosyakin e Clemants), com sinonímia de *Chenopodium ambrosioides* (LORENZI e MATOS, 2008; TROPICOS.ORG, 2017).

É originária da América Central e do Sul, possui distribuição cosmopolita, exceto pelas regiões mais frias do Hemisfério Norte. É espontânea em todas as regiões do Brasil, principalmente na região sul e sudeste, onde é considerada planta daninha (LORENZI e MATOS, 2008).

Em relação aos compostos encontrados nas folhas desta espécie identificou-se a presença de triperpenoides e esteroides (VALÉRIO, 2014). Em outro estudo, o extrato aquoso das folhas do mastruz apresentou também taninos, gomas, heterosídeos senevólicos, mucilagens, cumarinas, fenóis, esteróides, triterpenóides, carotenóides e alcaloides (SILVA et al., 2012). Segundo Nara e colaboradores (2015), apresenta ainda flavonas, flavonóis, xantonas e flavononas. No óleo das partes aéreas da planta, é encontrado (Z)-ascaridol, 2-careno, p-cimeno, isoascaridol e α -terpineno (FERRARI-FILHO et al., 2012). Essa variação na composição dos compostos encontrados irá tanto variar com o tipo de método extrativo quanto a fatores expostos, como sazonalidade, ritmo circadiano, a disponibilidade hídrica, nutrientes, dentre outros fatores que podem afetar o conteúdo final de metabólitos secundários em plantas medicinais, além das condições de coleta, estabilização e estocagem, podem ter grande influência na qualidade e, conseqüentemente, no valor terapêutico dos produtos desenvolvidos (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

2.4.1- PROPRIEDADE MEDICINAL

Em relação as propriedades medicinais possuem atividades antiparasitária, atividade analgésica, atividade anti-inflamatória, atividade antifúngica, atividade bacteriostática, atividade antiproliferativa e antitumoral, atividade cicatrizante, atividade imunomoduladora, atividade antioxidante, atividade inseticida, dentre outros.

2.4.1.2-ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

O tratamento intralesional com *D. ambrosioides* em infecção por *Leishmania amazonensis* apresenta atividade sobre o sistema imune na inibição da disseminação de *L. amazonensis* (PATRICIO et al., 2008). Além, de apresentar atividade citotóxica contra as formas promastigotas do parasito (REIS et al., 2012). O extrato bruto hidroalcoólico de *D. ambrosioides* e sua fração acetato de etila mostra-se eficaz em reduzir a infecção de macrófagos por *L. amazonensis*, além de ser capaz de inibir de forma profilática a infecção (LIMA JUNIOR et al., 2014).

O extrato hidroalcoólico das folhas de *D. ambrosioides* apresenta ação inibitória sobre o crescimento de *Giardia lamblia*, apresentando assim, ação giardicida *in vitro* (NEIVA et al., 2011). Já óleo essencial das partes aéreas de *D. ambrosioides* mostra uma atividade

promissora frente à *Trichomonas vaginalis*, com uma concentração inibitória mínima de 25 mg/mL (FIDALGO et al., 2004).

2.4.1.3-ATIVIDADE ANALGÉSICA

O extrato hidroalcoólico do mastruz, apresentou efeito nociceptivo em modelo de contorções abdominais que avalia a dor inflamatória aguda (SOUSA et al., 2012). Segundo Calado (2015), o extrato hidroalcoólico das folhas de *D. ambrosioides* possui um monoterpeno bicíclico denominado ascaridol que é responsável por ter ação antinociceptiva e anti-inflamatória atuando inclusive sobre o desenvolvimento da OA.

2.4.1.4-ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Neiva e colaboradores (2011), descreveram a composição do extrato hidroalcoólico do mastruz que é composto principalmente por flavonoides, saponinas e terpenos, sendo descritos por ter atividade anti-inflamatória). Segundo Pereira (2014), o extrato hidroalcoólico do mastruz possui atividade anti-inflamatória em modelo de bolha de ar que avalia a inflamação aguda e ainda atividade Antiartrítica (PEREIRA et al., 2018).

2.4.1.5-ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Segundo Jardim (2006), o óleo essencial e o extrato hexânico de partes aéreas de *D. ambrosioides*, compostos principalmente de (Z)-ascaridol, apresentaram grande potencial no controle da contaminação fúngica em produtos armazenados.

2.4.1.6-ATIVIDADE BACTERIOSTÁTICA

A análise da atividade antimicobacteriana da fração clorofórmica de *D. ambrosioides* evidenciou eficácia moderada frente à cepa de *M. tuberculosis* (VALÉRIO, 2014). E estudos que avaliaram a combinações do extrato do mastruz juntamente com a amicacina, observou-se uma ação sinérgica com a linhagem *E. coli* e antagonismo frente a *P. aeruginosa*. E quando combinaram o extrato com a gentamicina, observaram sinergismo frente à linhagem *S. aureus* e antagonismo frente às linhagens de *E. coli* e *P. aeruginosa* (PEREIRA NLF et al., 2015).

2.4.1.7-ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E ANTITUMORAL

Segundo Juiz (2013), o mastruz mostrou atividade antiproliferativa em modelo experimental de citotoxicidade por MTT, cuja composição química do óleo essencial apresentou 65,9% de ascaridol, o que pode explicar a citotoxicidade apresentada pelo óleo desta planta. E segundo Nascimento (2006), o extrato bruto apresentou atividade antitumoral.

2.4.1.8-ATIVIDADE CICATRIZANTE

Possui ação cicatrizante (PINHEIRO NETO et al., 2005) e segundo Grassi-Trivellato (2011), possui ação cicatrização em ensaio cutâneo através da forma farmacêutica em pomada com extrato concentrado a 5 %.

2.4.1.9-ATIVIDADE IMUNOMODULADORA

Foi demonstrado também que a espécie *D. ambrosioides*, apresenta atividade moduladora e antiedematogênica tópica em modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton que é responsável pela triagem de substâncias que atuam na fase aguda da inflamação (CRUZ et al., 2007).

2.4.1.10-ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante têm ação direta ou indireta no metabolismo ósseo. Eles podem interferir no recrutamento de células osteoprogenitoras, favorecendo, assim a diferenciação e função osteoplástica (ALMEIDA et al., 2007) e também atua na diferenciação osteoclástica (LEE et al., 2005). Em 1971, Arisawa e colaboradores descobriram o composto campferol e depois anos mais tarde, Pang e colaboradores (2006) demonstraram que esse composto influencia na maturação e atividade osteoclástica. Estudos comprovaram o potencial protetor do campferol que é um composto antioxidante presente na espécie *D. ambrosioides* (CHOI, 2011) e através de mais ensaios percebe-se que o extrato etanólico das folhas do mastruz, mostrou-se um grande potencial antioxidante (ALMEIDA et al., 2013).

2.4.1.11-ATIVIDADE INSETICIDA

O óleo essencial das folhas e caule de *D. ambrosioides* apresenta mortalidade de 100% na dose de 500 µL de óleo/L de ar, após 24 h de exposição contra o gorgulho-do-milho, *Sitophilus zeamays* Mots (JARAMILLO et al., 2012), que é uma das principais pragas do milho (*Zea mays* L.) e de outros cereais armazenados no Brasil (FERRARI-FILHO et al.,2012).

3. JUSTIFICATIVA

Considerando que não há estudos na literatura demonstrando OA em camundongos fêmeas em modelo experimental e a importância em se observar se há diferença entre o desenvolvimento de OA entre camundongos machos e fêmeas, visto que o número de casos de osteoartrite em mulheres ser maior quando comparado ao de homens e ainda por o extrato bruto dessa espécie ter sido descrita com potencial imunomodulador e antiartrítico (CRUZ et al.,2007;PEREIRA et al.,2018). Dados preliminares sugerem que a fração acetato de etila apresenta similar potencial por apresentar constituintes semelhante ao extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides*. Foi hipotetizado que o tratamento com a fração acetato de etila de *Dysphania ambrosioides* é capaz de inibir o desenvolvimento e progressão de OA reduzindo a inflamação e melhorando a qualidade de locomoção de camundongos fêmeas em modelo experimental de OA.

4.OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar o efeito do tratamento oral com a fração acetato de etila de *D. ambrosioides* sobre a indução de OA em camundongos fêmeas;

4.2 ESPECÍFICOS

- Investigar a ação da fração de acetato de etila sobre o desenvolvimento da OA induzida por injeção intra-articular de monoiodoacetato de sódio;
- Verificar o efeito sistêmico da fração de acetato de etila sob órgãos linfóides;
- Observar o efeito do tratamento da fração de acetato de etila na atividade locomotora durante o desenvolvimento da OA.
- Analisar o efeito fração de acetato de etila sobre a histopatologia da OA.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Imunofisiologia (LIF), localizado no campus Dom Delgado da Universidade Federal do Maranhão. Para isso, foi submetido à análise e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Maranhão (CEUA), sob o protocolo de número 23115.005293/2015-14.

5.1- MATERIAL BOTÂNICO E PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

As folhas de *D. ambrosioides* foram coletadas no Horto Paz e Harmonia, às 9:00 horas da manhã do dia 15/09/2014 no município de São José de Ribamar - MA e identificadas no Herbário Ático Seabra sob o número 0998/SLS017213 da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, MA, Brasil.

Para obtenção do extrato, as folhas foram secas a temperatura ambiente $\pm 37^{\circ}\text{C}$, trituradas para a obtenção do material (pó), que foi macerado em álcool etílico PA (Merck, Brasil) a 70% (v/v) na proporção variável pó das folhas/etanol (m/v) de 1:3, durante 8/8 h, ocorreu agitação e o processo durou 72 h. O processo de extração foi repetido por três vezes, sendo que a cada extração foi adicionado ao macerado a mesma quantidade de álcool etílico, foram reunidas as soluções extrativas, que foram filtradas e concentradas em rotaevaporador denominando-se de extrato bruto hidroalcolico (EBH). O EBH foi fracionado em funil de separação com adição de 400 mL de metanol e hexano até a fase hexânica se apresentar incolor, resultando na fração hexânica. A fase hidroalcolica resultante do processo anterior foi, então, fracionada com diclorometano de separação até que a fase diclorometano se apresentou incolor, dando origem à fração diclorometano. Em seguida, procedeu-se a partição da fase hidroalcolica remanescente com acetato de etila em funil de separação, até que a fase acetato de etila se apresentou-se incolor, resultando na fração acetato de etila. Por fim, a fase hidroalcolica remanescente foi utilizada para a obtenção da fração butanólica usando como solvente o butanol. Posteriormente, apenas a fração acetato de etila foi concentrada em evaporador rotativo e liofilizadas. A fração seca foi pesada e feito o cálculo do rendimento final que foi obtido 1,32g da fração acetato de etila para cada 10g do EBH. A fração foi armazenada em recipiente de vidro estéril a 4°C envolvido com papel alumínio até o momento de uso.

5.2-ANÁLISE FITOQUÍMICA

Neste trabalho não foi realizado a análise fitoquímica da fração acetato de etila de *Dysphania ambrosioides*, visto que em outro trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa realizou este procedimento de identificação utilizando a metodologia de Matos (2009). No qual foi identificado que a fração em estudo possui constituintes polares como: taninos condensados, flavononas, cumarinas, alcaloides, saponinas e esteroides (DIAS, 2018).

5.3 ANIMAIS

Para execução deste trabalho foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss* adultos, fêmeas com idade média de 4 meses, peso médio 33g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Os animais foram alimentados com ração e água *Ad libitum* e tiveram ciclo claro-escuro padronizado de 12 – 12 horas.

5.4 MODELO DE OSTEOARTRITE INDUZIDA POR MONOIODOACETATO DE SÓDIO

Os animais foram previamente anestesiados através de injeção intramuscular (i.m.) da pata esquerda com Xilazina 2%, Cetamina 10% e PBS 1x com hidromódulo 2:1:1 utilizando seringa e agulha estéril descartável. Foi verificada a sensibilidade do animal, para a realização da retirada dos pelos (tricotomia) da pata posterior direita, depois foi realizado o procedimento de assepsia local com solução de álcool 70 %. Foi flexionada a pata posterior do camundongo, na altura do joelho, com um ângulo de aproximadamente 45°, e foi aplicada a solução de MIA na concentração de 8 mg/kg do peso do animal no ligamento patelar do joelho direito utilizando uma agulha com (13 x 0,38 mm) no espaço intra-articular entre tíbia e fêmur (Modificado de FERNIHOUGH, 2004; SILVA, et al., 2008).

5.5 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA OSTEOARTRITE

Para a avaliação da OA foi utilizada fita métrica de precisão posicionada na região articular do joelho do camundongo, a fim de verificar o diâmetro articular do joelho. A avaliação foi realizada em dias alternados a partir dos dias 0, 1, 3, 5 até o 31º dia (dia em que ocorreu a eutanásia dos animais). A avaliação da OA ocorria sempre após a avaliação locomotora dos camundongos.



Fórmula do desenvolvimento de OA

$$\Delta OA = \text{Dia } x - \text{Dia } 0$$

Figura 3 :Fórmula para calcular a circunferência articular do joelho do camundongo (COSTA,2018).

Figura 2 :Avaliação do desenvolvimento da OA. Fonte :imagem do autor.

5.6 AVALIAÇÃO LOCOMOTORA

Para verificar a avaliação locomotora, foi utilizado uma escada medindo aproximadamente 100 cm de altura, com degraus de ferro e inclinação de aproximadamente 80° C. Os animais foram treinados durante um período de 30 dias antes do dia da indução do MIA para a correta adaptação da atividade proposta. A Avaliação locomotora baseia-se na relação tempo de subida/estímulos. Ao longo do experimento foram contados o tempo em segundos (s) da subida de cada animal com três repetições. No caso da indução de subida, caso o animal recusar se movimentar por mais de 3 minutos a avaliação é finalizada. (COSTA, 2018).



Fórmula para o cálculo da Avaliação locomotora

$$\frac{(\Sigma \text{ de tempo(s)}) + \Sigma \text{ de estímulos } \times 1s}{n^{\circ} \text{ de avaliações}}$$

Figura 5: Fórmula para calcular a avaliação locomotora dos animais (COSTA, 2018).

Figura 4:Avaliação locomotora. Fonte :Imagem do autor

5.7-PESO E NÚMERO DE CÉLULAS DOS ÓRGÃOS LINFOIDES

Após todos os procedimentos necessários, como a aplicação da anestesia, da retirada de sangue da região ocular, o baço foi pesado e colocado dentro de um tamis, com o auxílio de um êmbolo de uma seringa de 1 mL e foi adicionado 3 mL da solução PBS 1x não estéril, para a maceração do órgão. Após a maceração, foi retirada uma alíquota de 10 µL da amostra que foi colocada em um microtúbulo de 1,5 mL, onde foi adicionado à solução de Turk para a contagem de células. O linfonodo foi pesado e com auxílio de duas lâminas foscas foi macerado juntamente com o 1mL de PBS 1x não estéril. A amostra foi colocada em um microtúbulo de 1,5 ml. Para a contagem das células utilizou-se o corante cristal violeta. A contagem total de células de ambos os órgãos foi feita através de microscópio óptico com auxílio da câmara de Neubauer.

5.8- ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

As patas foram removidas e fixadas em formol a 10% e posteriormente imerso em solução descalcificante por 15 dias, seguindo-se do processamento por métodos de rotina até a inclusão em blocos de parafina. Os compartimentos mediais e laterais foram separados longitudinalmente e encaminhados para preparação histológica rotineira por hematoxilina-eosina. Os cortes teciduais foram colocados em moldes retangulares, formando blocos que foram subsequentemente seccionados por navalhas de aço do micrótomo de 4 µm. Foram feitos cortes histológicos de 6 mm e analisados parâmetros como: Necrose, infiltrado inflamatório, inflamatório, extensão da lesão e edema.

5.9- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em 4 grupos com 5 animais cada e treinados em escada por 30 dias antes da indução do MIA. Durante a indução receberam injeção de 10µL de MIA na concentração de 8mg/kg no ligamento patelar do joelho direito para indução de OA e depois foram tratados com 100 uL por via oral através de gavagem. As doses do tratamento foram administradas através de cânula de aço inox BD-10 com diâmetro de 1,0mm apresentando uma esfera de 1,7 mm na porção da aplicação, raio de 40 mm e comprimento de 31 mm. Esta cânula foi acoplada em uma seringa de 1mL, onde primeiramente foi se retirar a

porção da agulha. A administração das doses foi feita logo após o efeito do anestésico cessar, sendo o tratamento realizado diariamente, e no mesmo horário. Os animais do experimento foram organizados nas seguintes ordens de grupo:

Tabela 1: Organização dos grupos experimentais.

Grupos	Produto a ser administrado	Volume
Controle	água de injeção	100 µL
DEXA	Dexametasona (2 mg/kg);	100 µL
Grupo (FAcOET1)	Fração acetato de etila dose de 1mg /Kg	100 µL
Grupo (FAcOET5)	Fração acetato de etila dose de 5mg/Kg	100 µL

5.10- ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5.0 ®. A comparação entre os grupos para análise de distribuição foi feita com o teste D'Agostin Pearson em seguida *Test t student* quando houve distribuição normal, ou pós-teste de Mann-Whitney quando não houve distribuição anormal. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p \leq 0,05$.

6.RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para os procedimentos experimentais, utilizou-se camundongos fêmeas, pois a osteoartrite ocorre com maior frequência em pacientes do sexo feminino (MIRANDA, 2014; SRIKANTH et al., 2005). E para indução experimental da OA, utilizou-se o monoiodoacetato de sódio (MIA), pois a sua administração gera características descritas semelhante a OA que ocorre em humanos, sendo assim, sua utilização proposta em experimentos animais (KISS, 2011).

Dysphania ambrosioides é muito conhecido por suas inúmeras propriedades, sendo relatado por sua ação antirreumática (LORENZI e MATOS, 2008), além de apresentar efeito imunomodulador (CRUZ et al., 2007).

O extrato hidroalcoólico das folhas de *D. ambrosioides* composto principalmente por flavonoides, saponinas e terpenos, sendo descritos por ter atividade anti-inflamatória (NEIVA et al., 2011) e a fração acetato de etila de *Dysphania ambrosioides* apresenta constituintes polares semelhantes como taninos condensados , flavononas , cumarinas , alcaloides, saponinas e esteroides que podem ter ação semelhante frente a osteoartrite (DIAS, 2018)

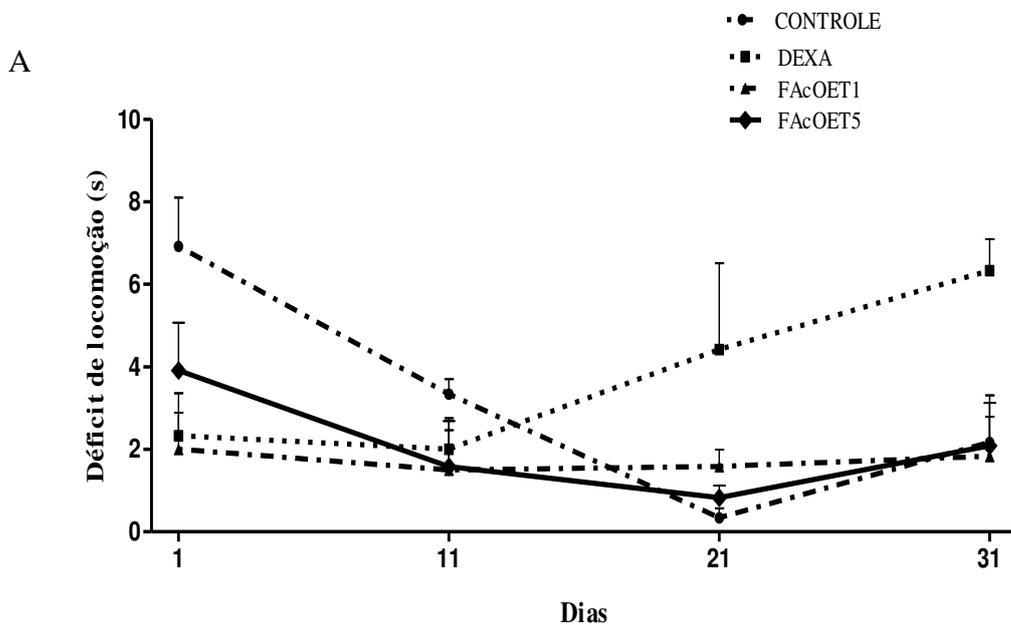
Segundo Moraes (2011), a classe de metabólitos flavonoides tem importante ação na redução de TNF- α e PGE2, mediadores nos quais gera resposta pró-inflamatória e que estão correlacionados com o desenvolvimento da osteoartrite e segundo Grassi (2011) *D. ambrosioides* está relacionada na diminuição da nocicepção o que podendo estar relacionado com a diminuição da dor nos animais durante o exercício de subida de escada e gerando melhora durante a flexão articular dos animais.

Assim, *D. ambrosioides* apresenta um potencial no tratamento da OA. Visando estabelecer a relação do tratamento da patologia e melhora da fisiologia motora. Os animais foram submetidos a treinos diários, onde pode-se perceber a melhora no desempenho na movimentação em camundongos tratados com as frações.

Como visto na figura 6 B, percebe-se que os animais do grupo FAcOET 5 apresentaram a locomoção em menor tempo quando comparadas ao grupo controle e dexametasona, isso pode estar relacionado tanto ao seu efeito anti-inflamatório quanto ao seu efeito anticonceptivo.

Logo, a fração pode auxiliar na diminuição dos sintomas da osteoartrite. Assim, apresenta-se a *D. ambrosioides* como alvo importante de estudos. A avaliação do efeito da fração acetato de etila em modelo experimental de OA mostrou-se eficaz na melhora da evolução da osteoartrite auxiliando, assim a atividade locomotora dos animais que utilizaram a fração acetato de etila de *D.ambrosioides* na dose de 1 mg/kg e 5 mg/kg apresentaram diminuição do tempo de subida em escada, diferente do observado no grupo controle apesar de que nessa avaliação não ter tido diferença significativa o que pode estar relacionado ao n de animais utilizados, no caso 5 animais por grupo como observado na imagem 6 A e B.

No trabalho experimental de Costa (2018) no qual utilizou-se animais machos tratados com a fração acetato de etila de *D. ambrosioides* com as mesmas doses vista neste trabalho, percebeu-se que a recidiva da inflamação ocorreu no dia 23 de avaliação e quando comparado a resposta em camundongos fêmeas esta recidiva ocorreu no dia 21 como visto na imagem 6 A. Este resultado pode estar relacionado com a resposta hormonal dos camundongos fêmeas que gera um aumento da liberação de TNF- α (GOMES, 2007) e pode ocasionar a uma resposta inflamatória mais rápida quando comparada com animais machos.



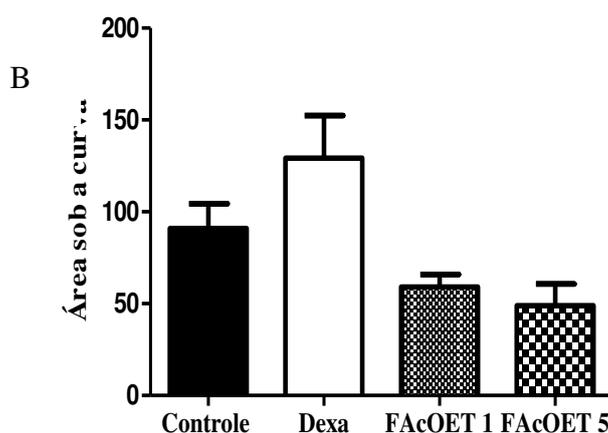


Figura 6: Efeito do tratamento da fração acetato de etila de *D. ambrosioides* sobre o sobre a atividade locomotora da OA em camundongos fêmeas. Camundongo *Swiss* fêmeas foram tratadas com água para injeção (Controle), /Dexametasona -2mg/Kg (DEXA), fração acetato de etila de *D. ambrosioides* - 1mg/Kg (FAcOET1), fração de acetato de etila - 5mg/Kg (FAcOET5). Figura 6(A) Índice da AO. Figura 6 (B) Área sob a curva (AUC) do delta da OA. Os dados representam a média \pm SEM de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ do grupo FAcOET1 e # $p < 0,05$ do grupo FAcOET5, ambos em relação ao Controle.

A administração do MIA gera uma degradação articular e conseqüentemente, um processo inflamatório inicial e local, resultando em um processo degenerativo e doloroso. (BOVE et al., 2003). Segundo Smith e colaboradores (2008), um dos sinais clínicos mais visíveis que comprovam a efetividade da indução de OA experimental em animais está correlacionada com o aumento da circunferência articular. Na figura 7 A, foi observado que a injeção de MIA na concentração de 8mg/kg promoveu pico de inflamação 24h após a indução da OA em camundongos *Swiss* fêmeas, porém, em relação aos grupos tratados com a FAcOET1 e FAcOET5 percebeu-se diminuição significativa da OA ao longo da avaliação como observado na figura 7 B.

É sabido que o extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides* apresenta em sua composição flavonoides e essa classe de metabolito secundário tem ação anti-inflamatória (COUTINHO et al., 2009; RAMOS, 2009), e a fração acetato de etila de *D.ambrosioides* apresenta constituintes polares semelhantes ao EBH, como taninos condensados, flavononas, cumarinas, alcaloides, saponinas e esteroides que podem ter ação na melhora efetivos na resposta frente a OA (DIAS, 2018). Além de apresentar um monoterpene bicíclico, o ascaridol que também atua na atividade anti-inflamatória e possui ação antinociceptiva (CALADO et al., 2015).

D. ambrosioides possui ainda atividade antiedematogênica e moduladora (PEREIRA et al., 2015). Estudos demonstram que esse metabolito apresenta diferentes mecanismos de atuação na inflamação, podendo agir inibindo a síntese de TNF- α , bloqueando as enzimas fosfolipase, COX 1 e 2 ou as lipoxigenases (AGNIHOTRI et al., 2010; BARROS, 2012).

Segundo Costa (2018), no qual utilizou camundongos machos na avaliação da OA, percebeu-se que no grupo FAcOET 5 ocorreu inibição do desenvolvimento da inflamação articular, além de observar diferença significativa no grupo FAcOET 5 em comparação ao Controle. Entretanto, quando Costa (2018) avaliou a circunferência articular dos grupos FAcOET 0.5 e FAcOET 1 em relação ao grupo Controle não foi observado diferenças significativas no tamanho da circunferência do joelho dos animais dos grupos FAcOET 0.5 e FAcOET 1.0 em relação ao grupo Controle em todos os dias de avaliação.

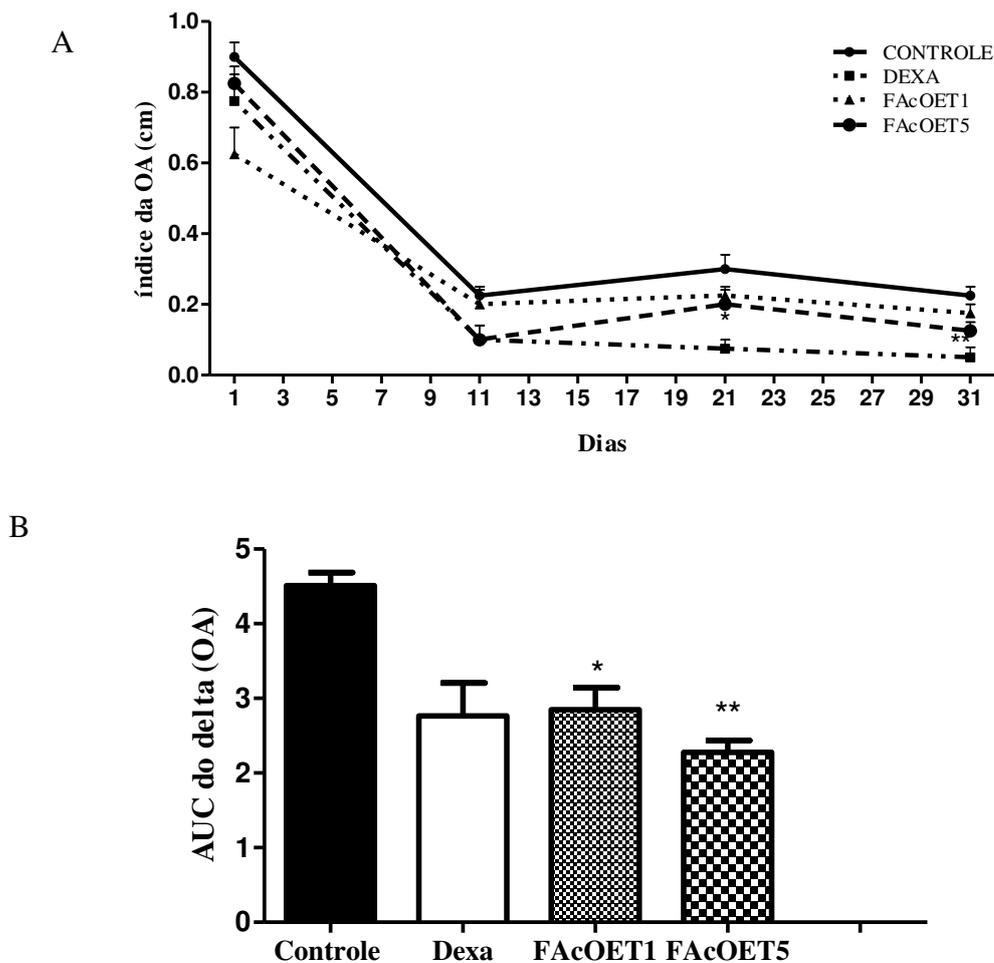
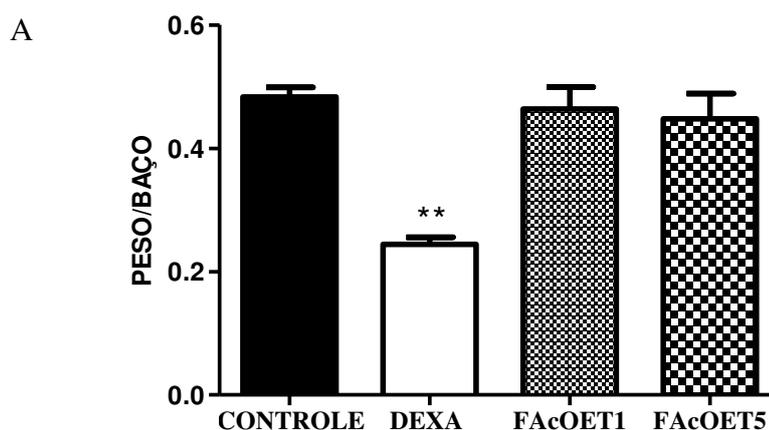


Figura 7: Efeito do tratamento da fração acetato de etila de *D. ambrosioides* sobre a desenvolvimento da OA em camundongos fêmeas. Camundongos *Swiss* fêmeas receberam, por gavagem, água para injeção (Controle), Dexametasona (2mg/Kg (DEXA), fração acetato de etila de *D. ambrosioides*- 1mg/Kg (FAcOET1),

fração de acetato de etila-5mg/Kg (FAcOET5). Figura 7 (A) Tempo da locomoção em segundos. Figura 7 (B) Área sob a curva (AUC) da avaliação locomotora. Os dados representam a média \pm SEM de 5 animais por grupo. *p < 0,05 em relação ao controle e #p < 0,05 do grupo FAcOET5, ambos em relação ao Controle.

Além disso, para a compreensão da ação das frações sobre os parâmetros demonstrados anteriormente, buscou-se avaliar a ação do tratamento sobre os órgãos linfoides desses animais. Quando comparado o peso dos órgãos linfoides do grupo Controle com os grupos que foram administrados as frações não houve diferença significativa como observado na Figura 8 A e 8 B ,diferentemente do observado no grupo DEXA, onde o valor foi significativamente mais baixo em relação ao peso tanto do baço e do linfonodo, isso ocorre devido ao efeito imunossupressor gerado pelo medicamento (ANVISA, 2017).

A dexametasona é um glicocorticoide que ocasiona a imunossupressão e diminuição da contagem de linfócitos e gera contagem anormal de monócitos. Fato observado quando se compara o valor total de células do grupo que utilizou dexametasona,que possui um valor significativamente menor quando comparado ao grupo controle e aos animais que receberam a fração acetato de etila nas doses 1mg/kg e 5mg/kg como observado nas figuras 8 e 9 A e B que pode-se observa que tais frações ocasionaram aumento na proliferação celular, ou ainda segundo Cruz e colaboradores (2007) efeito imunomodulação , porém é necessário mais estudos e testes com marcação celular para verificar a dinâmica do efeito da fração acetato de etila de *D. ambrosioides* frente ao mecanismo de osteoartrite .



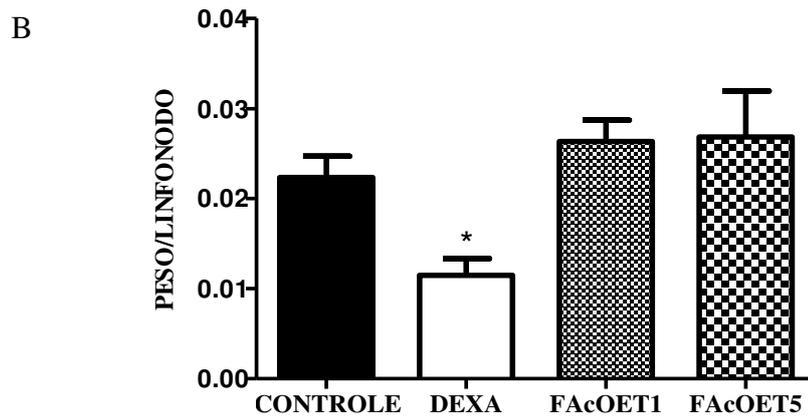
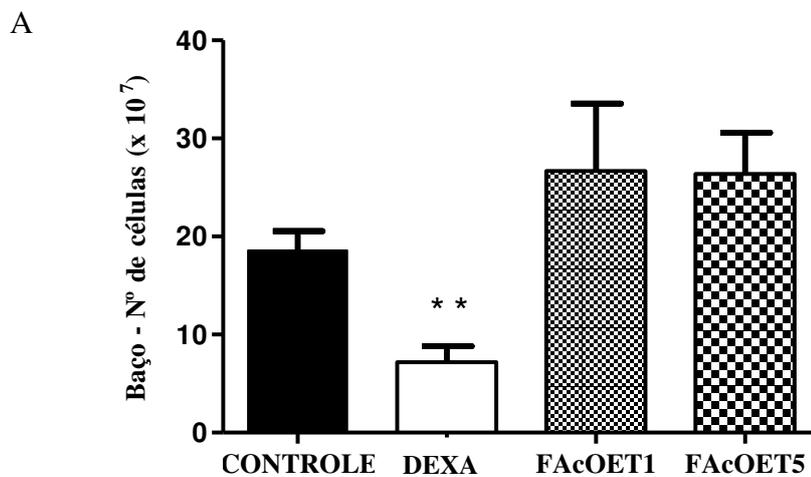


Figura 8: Efeito do tratamento da fração acetato de etila de *D. ambrosioides* sobre o peso dos órgãos linfóides de camundongos com OA. Camundongos *Swiss* fêmeas receberam, por gavagem, água para injeção (Controle), Dexametasona -2mg/Kg (DEXA), fração acetato de etila de *D. ambrosioides* -1mg/Kg (FAcOET 1), fração de acetato de etila -5mg/Kg (FAcOET 5). Figura 8 (A) Peso do baço. Figura 8 (B) Peso do linfonodo. Os dados representam a média \pm SEM de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao controle.



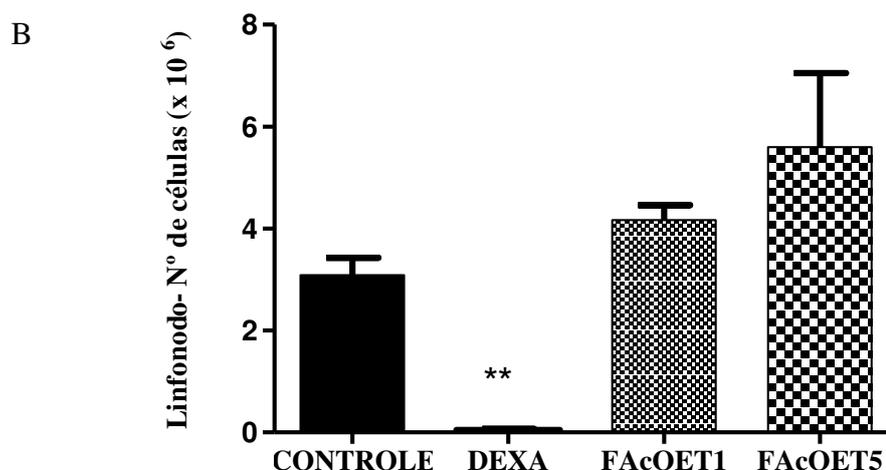


Figura 9: Efeito do tratamento da fração acetato de etila de *D. ambrosioides* sobre a contagem celular de camundongos com OA. Camundongos *Swiss* fêmeas receberam, por gavagem, água para injeção (Controle), Dexametasona -2mg/Kg (DEXA), fração acetato de etila de *D. ambrosioides* -1mg/Kg (FAcOET1), fração de acetato de etila -5mg/Kg (FAcOET 5). Figura 9 (A) número de células do baço. Figura 9(B) número de células do linfonodo. Os dados representam a média \pm SEM de 5 animais por grupo. **p < 0,01 em relação ao controle.

Em relação aos cortes histopatológicos, foi observado diferença significativa em relação a necrose tanto no grupo com a FacOET1 e FacOET5 em relação ao grupo controle negativo. Já em relação ao infiltrado inflamatório foi perceptível a diferença significativa das frações utilizadas quanto na dose de 1 mg/kg e 5 mg/kg em relação ao controle negativo.

Em relação a extensão da lesão, percebeu-se diferença significativa entre o grupo positivo e a fração de *D. ambrosioides* na dose de 1 mg/kg e diferença significativa do entre o grupo negativo e a fração de *D. ambrosioides* na dose 5 mg/kg. Quanto ao edema, percebeu-se diferença significativa entre o grupo positivo e a fração acetato de etila de *D. ambrosioides* na dose de 5 mg/kg.

Para a avaliação histopatológica foi observado que o grupo controle negativo apresentou diferença significativa em comparação aos grupos FAcOET 1mg /kg em relação a necrose e infiltrado inflamatório. Em relação ao FAcOET 5 mg/kg apresentou diferença significativa em todos os parâmetros analisados, como necrose, infiltrado inflamatório, extensão da lesão e edema, como pode-se observar nas Figuras10 e Tabela 2.

Esta diferença significativa em relação dos parâmetros analisados tanto na dose de 1mg/kg e 5mg/kg da fração acetato de etila de *D. ambrosioides* podem estar relacionados com a atividade antiedematogênica (PEREIRA et al., 2015) e também com a inibição síntese de TNF- α , com bloqueando das enzimas fosfolipase, COX 1 e 2 ou as lipoxigenases

(AGNIHOTRI et al.,2010; BARROS, 2012), podendo estar atuando na manutenção da arquitetura articular do camundongo como visto por Pereira e colaboradores (2018) que na dose de 5 mg/kg do extrato bruto de *D.ambrosioides* é capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF α), que podem atuar protegendo as articulações contra deformidade da cartilagem e estrutura óssea.

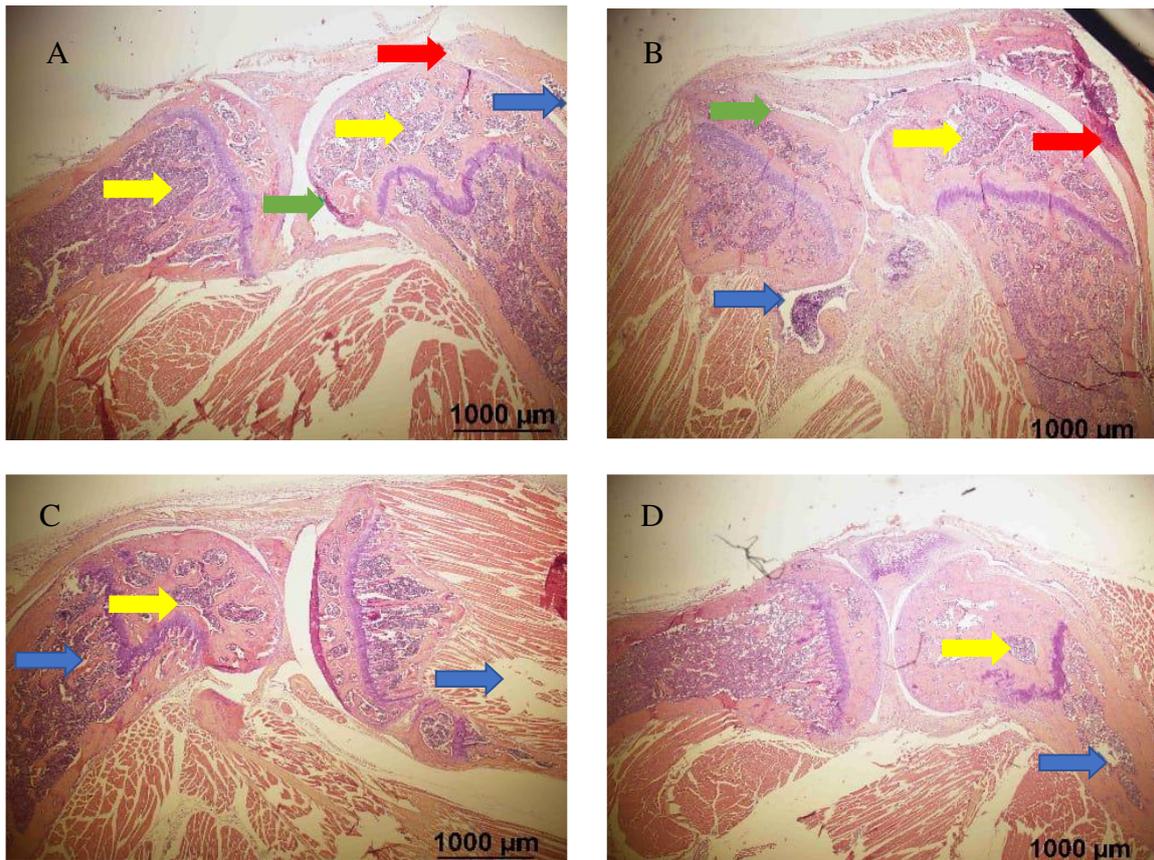


Figura 10: Cortes histopatológicos do ensaio experimental em modelo de osteoartrite em camundongos fêmeas. Os cortes histológicos apresentam espessura de 6mm coradas com Hematoxilina & Eosina A) Corte histológico controle, B) corte histológico grupo Dexa, C) Grupo da que utilizou a FAcOET na dose de 1mg/kg e D) Grupo que utilizou a FAcOET 5 na dose de 5 mg/kg. As setas: vermelho, amarelo, verde e azul representam presença respectivamente de: Necrose, infiltrado inflamatório, inflamatório, extensão da lesão e edema. As imagens obtidas apresentam ampliação de 100x.

Tabela 2. Escore clínico relacionado aos cortes histológicos

ESCORE	Controle	DEXA	FAcOET1	FAcOET5
Necrose	3 ± 0,5	1 ± 0,4*	1 ± 0,4*	1*
Infiltrado Inflamatório	3	2 ± 0,4	2 ± 0,4*	1 ± 0,5*
Extensão da lesão	3 ± 0,4	2 ± 0,5	2 ± 0,8#	1*
Edema	3	2 ± 0,5*	2	1*

* P ≤ 0,05 em relação ao controle negativo (C-)

P ≤ 0,05 em relação ao controle positivo (C+)

7.CONCLUSÃO

- Tanto a fração acetato de etila utilizada na dose de 1 mg/kg quanto na dose de 5 mg/kg apresentaram ação favorável na melhora da atividade locomoção dos animais com OA, principalmente na fração com a dose de 5mg/kg.
- Ocorreu melhora significativa na diminuição da circunferência articular dos animais tratado com a fração nas duas concentrações, principalmente na dose de 5mg/kg da fração acetato de etila de *D. ambrosioides* podendo está relacionado as classes de metabólitos da fração em estudo.
- Em relação a celularidade e peso dos órgãos linfoides não foi observado diferença significativa quando comparada ao controle.
- Ocorreu melhora tecidual relacionada a necrose, infiltrado celular , extensão da lesão e edema nos animais tratados com a dose de 1 mg/kg e principalmente com a dose de 5 mg/kg que manteve a arquitetura articular do joelho do animal , podendo está relacionado ao bloqueio de TNF- α pela classe de metabolitos da fração acetato de etila de *D. ambrosioides*.

REFERÊNCIAS

1. AGNIHOTRI S, WAKODE S, AGNIHOTRI A. An overview on anti-inflammatory properties and chemo-profiles of plants used in traditional medicine. **Indian Journal of natural products and Resources.** 1(2): 150-67,2010
2. AHMAD Z, HOWARD D, BROOKS RA, WARDALE J, HENSON F, GETGOODA, RUSHTON, N. The role of platelet-rich plasma in musculoskeletal Science. **Journal of the Royal Society of Medicine Short Reports**,3:40,2012.
3. ALMEIDA JMM. Avaliação do potencial antioxidante e osteoindutor do extrato do mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.). **Dissertação de mestrado.** Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.
4. ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Dexametasona,2017.
5. ANITUA E, SÁNCHEZ M, NURDEN AT, ZALDUENDO MM, DE LA FLUENTE M, AZOFRA J, ANDÍA, L. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. **Rheumatology.** 46:1769-72,2007.
6. ANAUATE MCC, TORRES LMB, MELLO SBV. Uso dos fitoterápicos, *Harpagophytum procumbens* (garra-do-diabo) e *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato) no tratamento da osteoartrite de coluna lombar. 2009.
7. AUTIERI MV, YUE TL, FERSTEIN GZ, OHLSTEIN E. Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kB inhibit human vascular smooth muscle cell adherence and proliferation and prevent neointima formation in rat carotid arteries. **Biochem Biophys Res Commun.**213(3):827-36,1995.
8. BRANDT KD, DIEPPE P, RADIN E. Etiopathogenesis of osteoarthritis. **Med. Clin North Am.** 93(1):1–24,2009.
9. BARROS, MCTC. Preparação de novos derivados flavonoides com potencial atividade biológica. **Dissertação Mestrado.** Coimbra: Universidade de Coimbra; 2012.
10. BRASIL, RENISUS. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. portal. saúde. gov. br/portal/arquivos/pdf/RENISUS, 2009.
11. BOVE SE, CALCATERRA SL, BROOKE RM, HUER CM, GUZMANREJUNEA UP, LSCHRIE RD, JKILGORE K S. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 11, n. 11, p. 821–830, nov.2003.

12. CALADO GP, LOPES AJO, JUNIOR LMC, LIMA FCA, SILVA LA, PEREIRA WS, AMARAL FMM, GARCIA JBS, CARTÁGENES MSS, NASCIMENTO FRF. *Chenopodium ambrosioides* L. Reduces synovial inflammation and pain in experimental Osteoarthritis. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. e 0141886, 2015.
13. CAMPOS GC, REZENDE MU, PAILO AF, FRUCCHI R, CAMARGO OP. Adding triamcinolone improves viscosupplementation: a randomized clinical trial. **Clin Orthop Relat Res**.471(2):613-20. 31,2013.
14. CIMMINO MA, SARZI-PUTTINI P, SCARPA R, CARPORALI R, PARAZZINI F, ZANINELLI A, MARCOLONGO R. Clinical presentation of osteoarthritis in general practice: determinants of pain in Italian patients in the AMICA study. **Semin Arthritis Rheum** .35(1Suppl 1):17-23,2005.
15. COSTA, AA. AÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE *Dysphania ambrosioides* L. SOBRE ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E FUNCIONAIS EM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM CAMUNDONGOS. **Trabalho de conclusão de curso** -Universidade Federal do Maranhão, 2018.
16. COUTINHO, MAS, MUZITANO MF, COSTA SS. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev Virtual Quím** .1(3),2009.
17. CLEGG DO, REDA DJ, HARRIS CL, KLEIN MA, O'DELL JR, HOOPER MM, BRADLEY JD, BINGHAM CO, WEISMAN MH, JACKSON CG, LANE NE, CUSH JJ. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. **N Engl J Med**.354(8):795-808,2006.
18. CHRISTENSEN R, BARTELS EM, ASTRUP A, BLIDDAL H. Symptomatic efficacy of avocado-soybean unsaponifiables (ASU) in osteoarthritis (OA) patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Osteoarthritis Cartilage**.16(4):399-408,2008.
19. CRUZ GVB, PEREIRA PVS, PATRÍCIO FJ, COSTA GC, SOUSA SM, FRAZÃO JB, ARAGÃO-FILHO WC, MACIEL MCG, SILVA LA, AMARAL FMM, BARROQUEIRO ESB, GUERRA RNM, NASCIMENTO FRF. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**.111, 148-154, 2007.
20. DE REZENDE, MÁRCIA UCHÔA, DE CAMPOS, GUSTAVO CONSTANTINO. A osteoartrite é uma doença mecânica ou inflamatória? **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 48, n. 6, p. 471-474, 2013.
21. DE REZENDE MU, De CAMPOS GC, PAILO AF. Current concepts in osteoarthritis. **Acta Ortop Bras**.21(2):120-2,2013.

22. DILLON CF, RASCH EK, GU Q, HIRSCH R. Prevalence of knee osteoarthritis in the United States: arthritis data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey 1991-94. **J Rheumatol.**33(11):2271-9,2006.
23. DIAS, LUCIANA AMORIN. Avaliação Fitoquímica da fração acetato de etila de *Dysphania ambrosioides* L. e seu efeito sobre reação granulomatosa. **Trabalho de conclusão de curso**. Universidade Federal do Maranhão, 2018.
24. DUARTE, MCT. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, n. 7, 2006.
25. ERNST E. Avocado/soybean unsaponifiables (ASU) for osteoarthritis a systematic review. **Clin Rheumatol.**22(4-5):285-8,2003.
26. FERNIHOUGH J, GENTRY C, MALCANGIO M, FOX ALYSON, REDISKE J, PELLAS T, KIDD B, BEAN S; WINTER J. Pain related behavior in two models of osteoarthritis in the rat knee. **Pain**, 112:83–93, 2004.
27. FERRARI FILHO E, ANTUNES L E G, TIECKER A, DIONELLO R G. Controle de gorgulho-do-milho submetido ao tratamento térmico. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 10, n. 3, p. 196-204, 2012.
28. FIDELIX TS, SOARES BG, TREVISANI VF. Diacerein for osteoarthritis. **Cochrane Database Syst Rev.** (1):CD0051, 2006.
29. FÉLIX-SILVA J, TOMAZ IM, SILVA MG, SANTOS KSCR, SILVA-JÚNIOR AA, CARVALHO MCRD, SOARES LAL, FERNANDES-PEDROSA MF. Identificação botânica e química de espécies vegetais de uso popular no Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 548-555, 2012.
30. FITZGERALD JB, Jin M, GRODZINSKY AJ. Shear and compression differentially regulate clusters of functionally related temporal transcription patterns in cartilage tissue. **J Biol Chem.** 2006;281(34):24095-103.
31. GOBBO-NETO, LOPES L, NORBERTO P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.
32. GOLDRING MB. The Role of the Chondrocyte in Osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, n. 9, p. 1916–1926, 2000.
33. GRASSI-TRIVELLATO L. *Chenopodium ambrosioides* L. ERVA DE SANTA MARIA (AMARANTHACEAE): STUDY OF ITS ANTI-INFLAMMATORY, ANTINOCICEPTIVE AND HEALING POTENTIAL. 147 f. **Dissertação Mestrado em Produtos Naturais e Substâncias Bioativas** - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2011.
34. HARRISONS, VAVKEN P, KEVY S, JACOBSON M, ZURAKOWSKI D, MURRAY MM. Platelet activation by collagen provides sustained release of anabolic cytokines. **Am J Sports Med.**39(4):729-34,2011.

35. HOCHBERG MC, ZHAN M, LANGENBERG P. The rate of decline of joint space width in patients with osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials of chondroitin sulfate. **Curr Med Res Opin.**24(11):3029-3,2008.
36. HENROTIN YE, SANCHEZ C, DEBERG MA, PICCARDI N, GUILLOU GB, MSIKA P, REGINSTER JYL. Avocado soybean unsaponifiables increase aggrecan synthesis and reduce catabolic and proinflammatory mediator production by human osteoarthritic chondrocytes. **J Rheumatol.**30(8):1825-34,2003.
37. HILL JA, ICHIM TE, KUSZNIERUK KP, LI MU, XHUANG W, YAN X, ZHONG R, CAIRNS E, BELL DA, WEI-PING M. Immune modulation by silencing IL-12 production in dendritic cells using small interfering RNA. **J Immunol .**171:691-6,2003.
38. KALBHEN DA, BLUM U. Hypothesis and experimental confirmation of a new pharmacological model of osteoarthrosis. **Arzneimittel-Forschung**, v. 27, n. 3, p. 527– 31, Jan. 1977.
39. KAWAKITA K, NISHIYAMA T, FUJISHIRO T, HAYASHI S, KANZAKI N, HASHIMOTO S, TAKEBE K, IWASA K, SAKATA S, NISHIDA K, KURODA R, KUROSAKA M. Akt phosphorylation in human chondrocytes is regulated by p53R2 in response to mechanical Mstress. **Osteoarthritis Cartilage.** 20 (12):1603–9, 2012.
40. KISS, R. M. Effect of severity of knee osteoarthritis on the variability of gait parameters. **Journal of Electromyography and Kinesiology**, v. 21, n. 5, p. 695–703, 2011. JARDIM CM. Composição e atividade antifúngica de extrato de *Chenopodium ambrosioides* L. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais ,2006.
41. JIMENEZ S, DODGE G. The effects of glucosamine sulfate on human chondrocyte gene expression. **Osteoarthritis Cartilage.** 5 (SA):72,1997.
42. JIANG L, RONG J, WANG Y, HU F, BAO C, LI X. The relationship between body mass index and hip osteoarthritis: a systematic review and metaanalysis. **Joint Bone Spine.**78(2):150-5. Review, 2011
43. JONES A, SILVA PG, SILVA AC, COLUCCI M, TUFFANIN A, JARDIM JR, NATOUR J. Impact of cane use on pain, function, general health and energy expenditure during gait in patients with knee osteoarthritis: a randomised controlled trial. **Ann Rheum Dis.**71(2):172-9,2012.
44. JUIZ, PJ L. Atividade apoptótica sobre osteoclastos, antimicrobiana e antitumoral de plantas medicinais cultivadas no recôncavo baiano. **Tese de doutorado**. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2013.
45. LACCI KM, DARDIK A. Platelet-Rich plasma: support for its use in wound healing. **Yale Journal of Biology and medicine .**83:1-9,2010.

46. LE LETK, MONTEJANO B, CAO Z, ZHAO Y, ANG D. Health care costs in US patients with and without a diagnosis of osteoarthritis. **J Pain Res.**5:23-30,2012.
47. LIANXU D, HONGTI J, CHANGLONG Y. NF-kBp65-specific siRNA inhibits expression of genes of COX-2, NOS-2 and MMP-9 in rat IL-1b-induced and TNF-a-induced chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage.**14:367-76,2006.
48. LOESER RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. **Osteoarthritis Cartilage.**17(8):971-9,2009.
49. LONG L, SOEKEN K, ERNST E. Herbal medicines for the treatment of osteoarthritis: a systematic review. *Rheumatology* 40:779-93; 2001.
50. LORENZI H, MATOS FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas, 2^o edição, Nova Odessa, SP: **Istituto Plantarum**,2008.
51. MASCARIN, LUCAS ZANON. Padronização do modelo de incapacitação articular induzida por monoiodoacetato de sódio para estudo pré-clínico da osteoartrite. **Dissertação Mestrado** - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2015.
52. MATHIEU P. A new mechanism of action of chondroitin sulfates ACS4ACS6 in osteoarthritic cartilage. **Presse Med.**31(29):1383-5,2002.
53. MIRANDA-CUNHA L, FAUSTINO A, ALVES C, VICENTE V, BARBOSA S. Avaliação da magnitude da desvantagem da osteoartrite na vida das pessoas: estudo MOVES. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 1, p. 22-30, 2015.
54. MIYASHIRO CAHV. Avaliação da atividade antioxidante e antiinflamatória do flavonóide rutina e derivados contendo metal de transição. **Dissertação Mestrado**. São Paulo: Universidade Bandeirante de São Paulo; 2010.
55. MORAES WP. Caracterização do mecanismo de ação antiinflamatória do flavonóide BAS1 isolado da planta *Brosimum acutifolium*. **Tese Doutorado**. Belém: Universidade Federal do Pará; 2011.
56. MNHEIMER E, CHENG K, LINDE K, LAO L, YOO J, WIELAND S, WINDT D A V D, BERMAN B, BOUTER L M. Acupuncture for peripheral joint osteoarthritis. **Cochrane Database Syst Rev.** (1):CD001977,2010.
57. NASCIMENTO FRF, CRUZ GV B, PEREIRA PV S, MACIEL MCG, SILVA L A, AZEVEDO P S, BARROQUEIRO B SB, GUERRA R NM. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L treatment. **Life Science**, 78, 2650-2653, 2006.

58. NEIVA VA, RIBEIRO MNS, CARTÁGENES MSS, COUTINHO-MORAES DF, NASCIMENO FRF, REIS AS, AMARAL MMA. Estudos pré-clínicos de atividade giardícida de *Chenopodium ambrosioides* L e a padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. **Revista Ciência e Saúde**.13,55-165,2011.
59. OKUMURA F A, REIS FA, BELCHIOR ACG, CARVALHO PTC, SILVA BAK, PEREIRA DM, LAIRA EMS. Avaliação dos sintomas e capacidade física em indivíduos com osteoartrose de joelho. **Rev Terapia Manual**, v. 7, n. 30, p. 83-87, 2009.
60. PEARLE AD, SCANZELLO CR, GEORGE A, MANDI LA, DICARLO FD, PETERSON IM, SCULCO TP, CROWM MK. Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with local inflammatory findings in patients with osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**. 15(5):516–23, 2007.
61. PELLETIER JP, MARTEL-PELLETIER J, ABRAMSON SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. **Arthritis Rheum**.44(6):1237-47,2001.
62. PEREIRA NLF, AQUINO PEA, SILVA MR, NASCIMENTO EM GRANGEIRO ARS, OLIVEIRA CDM, TINTINO SR, FIGUEREDO FG, VERAS HNH, MENEZES IRA. Efeito antibacteriano e anti-inflamatório tópico do extrato metanólico de *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Vol. 9(2): 73-159, Abr-Jun, 2015.
63. PEREIRA, VSR. Mecanismos celulares da inflamação: avaliação da actividade anti-inflamatório de flavonóides. **Tese de Doutorado**,2009.
64. PEREIRA, WS. *Chenopodium ambrosioides* Avaliação toxicológica e ação na resposta inflamatória. **Dissertação de mestrado**. Pós-graduação-Mestrado em Ciências da Saúde-Universidade Federal do Maranhão ,2009.
65. PEREIRA, WS. Efeito do Extrato Bruto Hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre processos inflamatórios e o desenvolvimento da artrite experimental. **Tese de doutorado**. Pós-graduação em Biociências, Universidade do estudo do Rio de Janeiro,162f.,2014.
66. 65.PEREIRA, WANDERSON S. et al. Anti-arthritic properties of crude extract from *Chenopodium ambrosioides* L. leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 8, p. 1078-1091, 2018.
67. PINHEIRO NETO VF, RIBEIRO RM, MORAIS CS, CAMPOS MB, VIEIRA DA, GUERRA PC, ABREU-SILVA AL, JUNIOR SJR, NASCIMENTO FRF, BORGES MOR, BORGUES MOR. Efeito do cataplasma das folhas de mastruz (*Chenopodium ambrosioides*) na reparação de tecidos moles e ósseo em rádio de coelho. Brasil.**Fitomed**.3;62-66,2005.

68. PISCOYA JL, FERMOR B, KRAUS VB, STABLER TV, GUILAK F. The influence of mechanical compression on the induction of osteoarthritis-related biomarkers in articular cartilage explants. **Osteoarthritis Cartilage**.13 (12):1092–9, 2005.
69. Portal da Saúde. Available from: <http://www.portaldasaude.pt/portal/conteudos/enciclopedia+da+saude/doencas/doencas+reumaticas/osteoartrrose.htm>. Acesso em :20/05/2017.
70. Projeção da população do Brasil por sexo e idade - 1980-2050. IBGE. Disponível em:http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2008/projecao.pdf, 2008. Acesso em 20/06/2017.
71. RAMOS CC. Propriedades anti-inflamatórias de flavonoides – mecanismos de acção celular. **Dissertação Mestrado**. Lisboa: Universidade de Lisboa; 2009.
72. REIS AS, RIOS CEP, MELO LP, COSTA GC, SILVA LA, PATRÍCIO FJB, AMARAL FMM, NASCIMENTO FRF. ATIVIDADE LEISHMANICIDA in vitro DE FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista de Ciências da Saúde**, 2012.
73. VASCONCELOS KSS, DIAS JMD, DIAS RC. Relação entre intensidade de dor e capacidade funcional em indivíduos obesos com osteoartrite de joelho. **Rev Bras. Fisioter**. 10(2):213-8,2010.
74. RENAME. Relação Nacional de Medicamentos Essencias,8 edições, Brasília-DF,2013.
75. SÁ, RAFAELA DAMASCENO. Estudo farmacognóstico de *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco,2013.
76. SELFE TK, INNES KE. Mind-Body Therapies and Osteoarthritis of the Knee. **Curr Rheumatol Rev**.5(4):204-211,2009.
77. SETTY AR, SIGAL LH. Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of actions, efficacy and side effects. **Sem in Arth and Rheum**: 773-84, 2005.
78. SILVA, MD. Estudos comportamentais e farmacológicos com a diacereína no modelo de monoartrite induzida por adjuvante completo de Freund (cfa) em ratos. 6f. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
79. SOHN DH, SOKOLOVE J, SHARPE O, ERHART JC, CHANDRA PE, LAHEY LJ, LINDSTROM TM, HWANG I, BOYER KA, ANDRIACCHI TP, ROBINSON WH.. Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine

- production via Toll-like receptor 4. **Arthritis research & therapy**, v. 14, n. 1, p. R7, 2012.
80. SOUSA LHA, RIOS CEP, ASSUNÇÃO AKM, FIALHO EMS, COSTA GC, NASCIMENTO FR. Avaliação da ação analgésica do extrato hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* L. em ensaios pré-clínicos. **Revista de Ciências da Saúde**, 2012.
81. SHARMA L, KAPOOR D, ISSA S. Epidemiology of osteoarthritis: an update. **Curr Opin Rheumatol** .18:147-156,2006.
82. SCHMIDT MB, CHEN EH, LYNCH SE. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet -derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. **Osteoarthr.Cartilage**.14:403-12,2005.
83. SRIKANTH VK, FRYER JL, ZHAI G, WINZENBERG TM, HOSMER D, JONES G. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage** .13(9):769-81,2005.
84. SOWERS MR, KARVONEN-GUTIERREZ CA. The evolving role of obesity in knee 18. osteoarthritis. **Curr Opin Rheumatol**.22(5):533-7,2010.
85. TAUFNER CF, FERRAÇO EB, RIBEIRO L F. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Teresa e MarilândiaES3. **Plantas medicinais e a saúde pública**, 2006.
86. TAK PP, GERLAG DM, AUPPERLE KR, VAN DE GEEST DA, OVERBEEK M, BENNETT BL, BOYLE DL, MANNING AM, FIRESTEIN GS. Inhibitor of nuclear factor kappaB kinase beta is a key regulator of synovial inflammation. **Arthritis Rheum** .44:1897-907,2001.
87. NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS (UK). Osteoarthritis: National clinical guideline for care and management in adults. London: **Royal College of Physicians**,2008.
88. TROPICOS.ORG. **Missouri Botanical Garden**. 2011. Disponível em: Acesso em: agosto 2017.
89. TOWHEED TE, MAXWELL L, ANASTASSIADES TP, SHEA B, HOUPPT J, ROBINSON V, HOCHBERG MC, WELLS G. Glucosamine therapy for treating osteoarthritis. **Cochrane Database Syst Rev**. (2):CD002946,2005.
90. VALÉRIO ES. Avaliação da atividade dos extratos hidroetanólico de *Chenopodium ambrosioides* L. e de *Eucalyptus alba* Reinw ex Blume, frente a cepas de *Mycobacterium* sp. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, 2014.

91. VASCONCELOS KSS, DIAS JMD, DIAS RC. Relação entre intensidade de dor e capacidade funcional em indivíduos obesos com osteoartrite de joelho. **Rev Bras. Fisioter.** 10(2):213-8,2010.
92. VAN BUULGM, KOEVOET WLM, KOPS N, BOS PK, VERHAAR JAN, WEINANS HET. A. Platelet-Rich Plasma Releasate Inhibits Inflammatory Processes in Osteoarthritic Chondrocytes. **Am J Sport Med.** November .39:2362-70,2011.
93. VUOLTEENAHO K, KUJALA P, MOILANEN T, MOILANEN E. Aurothiomalate and hydroxychloroquine inhibit nitric oxide production in chondrocytes and in human osteoarthritic cartilage. **Scand J Rheumatol.** 34(6):475-9,2005.
94. WANG CT, LIN YT, CHIANG BL, LIN YH, HOU SM. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage.** 14(12):1237-47,2006.
95. World Health Organization (WHO). Available from: <http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en>. Acesso em 10 de julho de 2017.
96. ZHANG W, NUKI G, MOSKOWITZ RW, ABRAMSON S, ALTMAN RD, ARDEN NK, BIERMA-ZEINSTRAS S, BRANDT KD, CROFT P, DOHERTY M, DOUGADOS M, HOCHBERG M, HUNTER DJ, KWOK K, LOHMANDER LS, TUGWELL P. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January. **Osteoarthritis Cartilage.** 18(4):476-99,2010.