

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

ARTHUR ANDRÉ CASTRO DA COSTA

**AÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE *Dysphania ambrosioides* L. SOBRE ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E FUNCIONAIS EM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM CAMUNDONGOS.**

São Luís

2018

ARTHUR ANDRÉ CASTRO DA COSTA

**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 apresentado à Universidade Federal do Maranhão como exigência para obtenção do título de Graduado em Ciências Biológicas, módulo bacharelado.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Silva Pereira

São Luís

2018

ARTHUR ANDRÉ CASTRO DA COSTA

**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 apresentado à Universidade Federal do Maranhão como exigência para obtenção do título de Graduado do módulo bacharelado em Ciências Biológicas.  
Orientador: Prof. Dr. Wanderson Silva Pereira

Aprovado em: \_\_/\_\_/\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Ms. Gustavo Pereira Calado

---

Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

---

Prof. Dr. Antônio Marcus de Andrade Paes

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

André Castro da Costa, Arthur.

AÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE *Dysphania ambrosioides* L. SOBRE ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E FUNCIONAIS EM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM CAMUNDONGOS / Arthur André Castro da Costa. - 2018.

65 f.

Orientador(a): Wanderson Silva Pereira.

Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão, 2018.

1. Avaliação locomotora. 2. *Dysphania ambrosioides*. 3. FAcOEt. 4. MIA. 5. Osteoartrite. I. Silva Pereira, Wanderson. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Certamente, gostaria de agradecer em primeiro lugar e somente a Deus por toda ajuda, força, encorajamento, paciência e companhia nos dias tempestades e dias de sol. Apesar dos grandes desafios que tive ao longo de toda minha carreira acadêmica pude ver claramente a presença de um Deus de amor me guiando, aconselhando e cuidando de mim. Sou grandiosamente grato por me mostrar quão incrível e complexo foi sua criação divina, e que apesar de todos as intempéries da vida humana preservastes um pouco da tua perfeição. Mais acima de tudo, gostaria de agradece-lo pelas pessoas maravilhosas que Ele colocou e minha vida. O agradeco pelos meus pais, Neuzivania Santos Castro e a Josué Araújo da Costa que foram essenciais na minha formação dando-me apoio de todas as formas possíveis para que o nosso sonho se realizasse, minha formação acadêmica.

Agradeço a Deus pela minha família adventista, que me proporcionou muitos momentos de alegria e conforto nos momentos difíceis. Contudo, gostaria de agradecer em especial a Deus por duas pessoas incríveis que Ele colocou em minha vida. A Paulo Afonso Diniz, um grande amigo e irmão que ganhei na minha graduação e quero levar essa amizade para o resto da nossa eternidade. Sua simplicidade, franqueza e humildade me trouxeram grandes lições para a vida e bem sei que tenho muito ainda o que aprender. E a ti, Taize Soares Santos; minhas palavras não serão suficientes para te agradecer por tudo que fizeste por mim. Seu amor, carinho e cumplicidade me foram dados e eu os guardarei como o bem mais precioso que possuo em minha vida. Desde agora que escrevo bate-me uma saudade imensurável pela sua partida, contudo lhe desejo o melhor que Deus possa lhe proporcionar. Sua ausência será para mim muito difícil, pois estará comigo todo o tempo em meu coração.

Também sou grato a Deus pela família LIF, onde passei 6 anos da minha vida desfrutando da companhia de pessoas bem humoradas, competentes e compromissadas com a ciência, das quais tive grande apoio nessa jornada. Destas agradeço em especial aos companheiros e amigos de estudo: Jacqueline Ribeiro, Lucas André e Alda Karen, que foram fundamentais para a execução deste trabalho científico, dos quais terei o prazer em ajuda-los. Também agradeço às minhas professoras-orientadoras: Flávia Raquel

Fernandes do Nascimento e a Rosane Nassar Meireles Guerra que me foram como mães: que me acolheram e apoiaram concedendo-me a oportunidade de desenvolver os estudos com auxílio de bolsas. Certamente sem os seus auxílios dificilmente estaria eu realizando meu trabalho de conclusão de curso. À professor Flávia, com quem estive por mais tempo, sou grato por todos os ensinamentos e pela sua pessoa simples, humilde e incrível.

Também agradeço a Deus pelo apoio que obtive do LEED, em especial à Maria do Socorro de Sousa Cartagenes e a Gustavo Pereira Calado, que também me receberam em seu laboratório e me ensinaram a base de tudo que sei sobre o estudo de osteoartrite.

E a meu Orientador, Wanderson Silva Pereira. Você foi uma pessoa especial que Deus colocou em minha vida. Não foi apenas um professor, mas um grande amigo durante todos esses anos. Posso dizer com toda certeza que você foi uma das duas maiores inspirações para amar a Biologia. Sua dedicação e amor a biologia claramente o faz ser reconhecido como um dos melhores professores do curso de Ciências Biológicas, por isso terá sempre meu eterno respeito. Meu muito obrigado!

Dedico a toda minha família, aos meus amigos e irmãos, em especial, aos meus pais, Neuzivania Santos Castro e Josué Araújo da Costa que me apoiam e incentivaram a buscar uma vida melhor por meio do estudo.

*“Pois desde a criação do mundo os atributos invisíveis de Deus, seu eterno poder e sua natureza divina, têm sido observados claramente, podendo ser compreendidos por intermédio de tudo o que foi criado, de maneira que tais pessoas são indesculpáveis.*

*(Romanos 1:20)*

## RESUMO

COSTA, Arthur André Castro. Ação da fração acetato de etila das folhas de *Dysphania ambrosioides* L. sobre aspectos imunológicos e funcionais em modelo experimental de osteoartrite em camundongos. F65. Monografia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017.

A osteoartrite (OA) é uma doença inflamatória crônica articular que apresenta sinais clínicos como alterações na estrutura óssea, dor e rigidez na movimentação. Atualmente um dos modelos experimentais de indução de OA é realizado por meio da injeção de MIA. Este é caracterizado como um composto altamente tóxico e capaz de ocasionar a perda da homeostase sinovial. Deste modo, este trabalho descreve as alterações fisiológicas, imunológicas, anatômicas e comportamentais em camundongos com osteoartrite induzida por MIA, bem como avalia o efeito do tratamento oral da fração acetato de etila das folhas de *Dysphania ambrosioides* na OA. Para a padronização do modelo, no primeiro estudo, os animais foram divididos em 2 grupos (7/grupo). O grupo PBS – animais que receberam injeção de 10 µL de PBS no ligamento patelar do joelho direito. O grupo MIA - animais submetidos a indução de OA por injeção de 10µL de MIA na concentração de 8 mg/kg. A avaliação locomotora foi verificada por atividade de subida em escada, em triplicata, via fórmula que considera o tempo e estímulos como parâmetros quantitativos da função, e a avaliação do desenvolvimento de OA foi mensurada a partir do diâmetro do joelho com auxílio de fita métrica. No 43º dia, o soro sanguíneo foi coletado para dosagens de citocinas e a pata dos animais foram armazenadas para análises histopatológicas. A injeção de MIA apresentou pico inflamatório 24h após a indução de OA. O modelo experimental foi caracterizado como modelo local crônico apresentando diferenças estatísticas do grupo MIA em relação ao grupo PBS no desenvolvimento de OA e na avaliação de locomoção, contudo, sem diferença nos níveis de citocinas circulantes entre os grupos. Em análises histopatológicas foi observada maior presença de infiltração celular significativamente diferente do grupo MIA em comparação ao PBS. No segundo artigo, os animais foram divididos em 4 grupos (5/grupo) após indução de OA: o grupo Controle foi administrado com PBS1x, enquanto os grupos FAcOEt 0.5, FAcOEt 1.0 e FAcOEt 5.0 foram tratados com fração acetato de etila nas doses de 0.5, 1.0 ou 5.0 mg/kg, respectivamente. Foram realizados a avaliação de desenvolvimento de OA e de locomoção, bem como a pesagem órgãos linfóides e contagem de células totais. Foram observadas diferenças significativas do grupo FAcOEt 5.0 em relação ao Controle nos dias 23, 33 e 43, inibindo inclusive a recidiva inflamatória e de déficit de locomoção. Não houve alteração na celularidade e peso de órgãos linfóides. Assim, conclui-se que a injeção de MIA foi eficaz na indução de OA promovendo um modelo experimental de inflamação local crônica com alterações fisiológicas e comportamentais em camundongos, e que o tratamento FAcOEt na dose de 5mg/kg foi capaz de reverter o quadro de progressão de OA e melhora na qualidade de locomoção.

**Palavras-chave:** MIA, Análise histopatológica, Avaliação Locomotora

## ABSTRACT

### **ACTION OF ETHYL ACETATE FRACTION OF *Dysphania ambrosioides* LEAVES ON IMMUNOLOGICAL AND FUNCTIONAL ASPECTS IN EXPERIMENTAL MODEL OF OSTEOARTRITE IN MICE.**

Osteoarthritis (OA) is a chronic inflammatory joint disease that presents clinical signs such as changes in bone structure, pain and stiffness in movement. Currently one of the experimental models of OA induction is performed through the injection of MIA. This is characterized as a highly toxic compound and capable of causing loss of synovial homeostasis. Thus, this work describes the physiological, immunological, anatomical and behavioral changes in mice with osteoarthritis induced by MIA, as well as evaluates the effect of the oral treatment of the ethyl acetate fraction of the leaves of *Dysphania ambrosioides* on OA. For the standardization of the model, in the first study, the animals were divided into 2 groups (7 / group). The PBS group - animals that received 10  $\mu$ L PBS injection into the right knee patellar ligament. The group MIA - animals submitted to induction of OA by injection of 10 $\mu$ L of MIA at the concentration of 8 mg / kg. The locomotor evaluation was verified by ladder climb activity, in triplicate, using a formula that considers time and stimuli as quantitative parameters of the function, and the evaluation of OA development was measured from knee diameter using a tape measure. On the 43rd day, blood serum was collected for cytokine dosages and the paw of the animals were stored for histopathological analysis. The MIA injection showed 24 h inflammatory peak after the induction of OA. The experimental model was characterized as a chronic local model presenting statistical differences of the MIA group in relation to the PBS group in the development of OA and the locomotion evaluation, however, with no difference in circulating cytokine levels between the groups. In histopathological analyzes a greater presence of cellular infiltration significantly different from the MIA group was observed in comparison to the PBS. In the second article, the animals were divided into 4 groups (5 / group) after induction of OA: the Control group was administered with PBS1x, while the FAcOEt 0.5, FAcOEt 1.0 and FAcOEt 5.0 groups were treated with ethyl acetate fraction at doses of 0.5, 1.0 or 5.0 mg / kg, respectively. Evaluations of OA and locomotion development were performed, as well as lymphoid organ weighing and total cell count. Significant differences were observed in the FAcOEt 5.0 group in relation to Control on days 23, 33 and 43, even inhibiting inflammatory relapse and locomotion deficit. There was no change in the cellularity and weight of lymphoid organs. Thus, it was concluded that MIA injection was effective in inducing OA by promoting an experimental model of chronic local inflammation with physiological and behavioral changes in mice, and that FAcOEt treatment at a dose of 5mg / kg was able to reverse the progression of OA and improvement in the quality of locomotion.

**Descriptors:** MIA, Histopathological analysis, Locomotor evaluation.

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

Figura 1: Delineamento dos procedimentos experimentais de treino ao 43º dia após indução de OA.....	23
Figura 2: Avaliação do desenvolvimento de OA em camundongos.....	26
Figura 3: Avaliação locomotora de animais em modelo experimental de OA em camundongos.....	27
Figura 4: Análise histopatológica do joelho em modelo experimental de OA em camundongo.....	28

### ARTIGO 2

Figura 1: Delineamento dos procedimentos experimentais de treino ao 43º dia após indução de OA.....	40
Figura 2: Avaliação do desenvolvimento de OA em camundongos em animais tratados com FAcOEt de <i>D. ambrosioides</i> .....	42
Figura 3: Avaliação locomotora de animais em modelo experimental de OA em camundongos tratados com FAcOEt de <i>D. ambrosioides</i> .....	43
Figura 4: Avaliação do peso e celularidade dos órgãos linfoides .....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média das concentrações de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , IL6 e IL-10 em pg/mL .....	27
Tabela 2: Análise histopatológica da membrana sinovial de animais com OA experimental.....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AvL** – Avaliação Locomotora

**CBA** - *Cytometric beads array* – Citometria de esferas ordenadas

**EBH** – Extrato bruto hidroalcoólico

**FAcOEt** – Fração Acetato de Etila

**IL**- Interleucina

**MIA** – Monoiodoacetato de sódio

**PBS** - *Phosphate buffered saline* – Tampão fosfato-salino

**OA** – Osteoartrite

**TNF- $\alpha$**  - *Tumor necrosis fator alfa* - Fator de necrose tumoral alfa

**WHO** - *World Health Organization* – Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
OBJETIVOS.....	18
CAPÍTULO 1 .....	19
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
Animais .....	22
Delineamento experimental .....	22
Indução e avaliação de osteoartrite (OA).....	23
Avaliação locomotora (AvL) .....	24
Dosagem de citocinas.....	24
Análise histopatológica da sinóvia.....	25
Análises estatísticas.....	25
RESULTADOS .....	27
Avaliação do desenvolvimento da OA.....	27
Avaliação locomotora .....	27
Análise de citocinas.....	28
Análise histopatológica da sinóvia.....	28
DISCUSSÃO.....	30
CONCLUSÃO.....	32
REFERENCIAS .....	32
CAPÍTULO 2 .....	34
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
Identificação do material vegetal e preparo dos extratos .....	38
Animais .....	38

Indução e avaliação de osteoartrite (OA).....	38
Avaliação locomotora (AvL) .....	39
Delineamento experimental .....	40
Análises estatísticas.....	41
RESULTADOS .....	42
Avaliação do desenvolvimento de OA.....	42
Avaliação locomotora em animais com OA .....	43
Análise de peso e celularidade dos órgãos linfóides .....	44
DISCUSSÃO .....	45
CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS .....	48
CONCLUSÃO GERAL .....	51
REFERÊNCIAS .....	52
ANEXO .....	56

## INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA), segundo a *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI), é definida como um desarranjo molecular da articulação que conduz a uma degradação estrutural e funcional, caracterizada pela degeneração da cartilagem, remodelação óssea, formação de osteófitos, inflamação das articulações e perda de função articular normal (KRAUS et al, 2015). Segundo Li et al., (2016), os principais sintomas e sinais clínicos característicos de OA incluem: inflamação, dor na região afetada, rigidez articular, movimentação restrita e crepitação.

É uma doença multifatorial podendo ser iniciada por fatores: genéticos, metabólicos e/ou traumáticos, que resultam em alterações fisiomorfológicas, bioquímicas, moleculares e biomecânicas em células como na matriz extracelular (SHARMA et al, 2006; HAMAMURA, 2015). A manifestação desta doença pode ser acometida em qualquer articulação sinovial, no entanto, o joelho é uma das articulações com maior incidência (CROSS et al., 2014).

A participação do sistema imune no desenvolvimento e progressão da OA é um dos elementos chave na patogênese da doença. Estudos têm indicado que a progressão da OA está correlacionada principalmente por processos inflamatórios (KIM, 2013). No processo de desenvolvimento de OA a produção de mediadores pró-inflamatórios por células do sistema imune e condrócitos, inclui aumento dos níveis de IL - 1 e TNF-  $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ), que inibem a síntese de componentes da matriz extracelular resultando numa reparação tecidual deficiente (SILVA, 2009).

Os fatores de risco são bem descritos na literatura, como: o processo de envelhecimento, gênero (maior incidência em mulheres), obesidade, predisposição genética e fatores mecânicos (FELSON 2004; HUNTER et al, 2009). 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%. Possivelmente, este dado esteja correlacionado ao aumento na produção de TNF- $\alpha$  em mulheres no período de climatério (TONET e NÓBREGA, 2008; BARROQUEIRO, 2017). De semelhante modo, sugere-se que este fator acarrete não apenas o desenvolvimento de OA, como também surgimento de doenças coronárias (JIALAL et al, 2002) e piora no quadro clínico de pacientes pós AVC (CLARK, 1997; BARONE, 1997)

O aumento da expectativa de vida da população evidencia uma importante relação com o aumento de casos de OA em idosos. Em decorrência do envelhecimento, alterações fisiológicas naturais como: considerável decréscimo da massa muscular e aumento na porcentagem de gordura corporal, promove alteração mecânica no aparelho articular, o que acarreta maior sobrecarga nas articulações seguida de processo inflamatório (RÄTSEPSOO et al, 2013; MESSIER et al, 2013; PEREIRA et al, 2011). Dados radiográficos sugerem que a maioria das pessoas com idade acima de 65 anos (80%) indicam alguma evidência de OA (ARDEN, 2006; ABOLHASSANZADEH et al, 2014).

Compreendendo a importância médica dessa enfermidade tem para a população mundial alguns tratamentos de primeira linha são adotados para amenizar a gravidade do quadro clínico em pessoas acometidas com OA, como: Inibidores específicos de COX-2, como o Meloxicam e opióides naturais, ou sintéticos como o Tramadol, que também são utilizados nos casos de má resposta terapêutica ou quando há contra-indicação para uso de inibidores específicos de COX-2 (COIMBRA, 2002), opióides fortes que são utilizados em caso de dores intensas, como a morfina, metadona, oxicodona e fentalina (WILDER-SMITH, 2005) ou ainda o uso de anticorpos monoclonais como o Tanezumab que demonstra eficácia na diminuição da dor e melhora significativa da função do joelho em paciente com artrite e Adalimumab, um bloqueador de TNF- $\alpha$  que já é utilizado para o tratamento de pacientes com artrite reumatóide e outras condições inflamatórias sistêmicas (NAGASHIMA, 2011; VERBRUGGEN, 2011).

Além dos medicamentos alopáticos convencionais, atualmente, os avanços em estudos com plantas medicinais têm se caracterizado como uma importante alternativa no tratamento de diversas doenças (TAUFNER et al., 2006). De acordo com Sousa et al., (2012), este potencial deriva da grande diversidade e da complexidade de metabólitos secundários produzidos, que são produtos de mecanismos adaptativos e defensivos contra animais e microrganismos.

Nesse contexto de investigação de produtos naturais para desenvolvimento de novos potenciais terapêuticos, encontramos *Chenopodium ambrosioides L.* ou *Dysphania ambrosioides L.* (TRÓPICOS, 2018); que 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 (RENISUS, 2018).

*D. ambrosioides* L. é uma planta cosmopolita conhecida popularmente como mastruz, mastruço ou erva-de-Santa-Maria. Amplamente distribuída no Brasil; pertencente à família Amaranthaceae, é uma erva perene, com até 1m de altura, originária da América Central e do Sul (CHEVALLIER, 1996). Esta tem sido utilizada comumente na medicina popular na forma de chás ou infusões agindo como diurético e anti-helmíntico, além de ser utilizada para tratar ferimentos, problemas respiratórios, processos inflamatórios, contusões, equimoses, entre outros (KUMAR, 2007; LORENZI e MATOS, 2002). Deste modo, muitos estudos foram instigados a comprovar cientificamente as propriedades deste fitoterápico, especialmente do extrato de suas folhas. Atualmente, estudos descrevem uma série de atividades biológicas tais como: antibacteriano (LALL, 1999), fungicida (DELESPAUL, 2000), leishmanicida (MONZOTE, 2014; PATRÍCIO, 2008), anti-helmíntico (MACDONALD, 2004), anti-tumoral (NASCIMENTO, 2006), anti-artrítico (PEREIRA, 2014), anti-inflamatório (TRIVELLATO-GRASSI, 2013), atuando inclusive sobre o desenvolvimento da AO (CALADO et al., 2015).

Este estudo teve por finalidade o desenvolvimento do modelo experimental de OA em camundongos *Swiss* caracterizando parâmetros imunológicos, fisiológicos e comportamentais principalmente pela falta de informação nesta área e disponibilidade de materiais biotecnológicos de análises, bem como criar um modelo que permita o desenvolvimento de testes futuros de *screening* de fármacos com ação anti-inflamatória e antiartrítica. Neste aspecto, este trabalho teve como uma segunda finalidade a avaliação do efeito do tratamento de fração acetato de etila do EBH de *D. ambrosioides* neste modelo proposto.

## OBJETIVOS

### Geral

Avaliar o efeito do tratamento oral com a fração de acetato de etila do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *D. ambrosioides* em modelo experimental de osteoartrite após padronização do modelo em camundongos.

### Específicos

#### Capítulo I

- Padronizar o modelo de osteoartrite induzida por Monoiodoacetato de sódio (MIA) em camundongos;
- Padronizar a avaliação da evolução da atividade locomotora em diferentes tempos após a indução de OA;
- Quantificar citocinas circulantes;
- Analisar a histopatologia em cortes de joelho.

#### Capítulo II

Avaliar o efeito do tratamento oral com fração de acetato de etila de *D. ambrosioides* sobre o modelo de osteoartrite experimental, a partir da:

- Cinética da inflamação articular;
- Evolução da atividade locomotora em diferentes tempos após a indução de OA;
- Alterações do peso e celularidade de órgãos linfóides;

## CAPÍTULO 1

### PADRONIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM CAMUNDONGOS SWISS

COSTA, Arthur André Castro<sup>1</sup>; OLIVEIRA, Jacqueline Ribeiro<sup>2</sup>; GUERRA, Rosane N assar Meireles<sup>3</sup>; NASCIMENTO, Flávia Raquel Fernandes<sup>3</sup>; PEREIRA, Wanderson Silva<sup>3</sup>.

#### RESUMO

Osteoartrite (OA) é uma doença inflamatória crônica que causa dor, limitações articulares e que constitui importante problema de saúde pública. O monoiodoacetato de sódio (MIA) é um indutor experimental de OA ocasionando degeneração da estrutura sinovial. Este trabalho teve como objetivo padronizar o modelo de OA em camundongos *Swiss*. Animais machos (7/grupo) foram divididos em 2 grupos: Grupo PBS recebeu injeção de 10 µL de PBS, enquanto, para indução da OA, grupo MIA recebeu 10µL de MIA na concentração de 8 mg/kg na articulação do joelho direito. A avaliação locomotora foi testada por subida em escada e a avaliação da OA feita pela mensuração do diâmetro do joelho realizada no dia 0 e em dias alternados do 1º ao 43º dia. O soro sanguíneo foi coletado para dosagem das citocinas e as patas removidas para análises histopatológicas. O grupo MIA apresentou pico inflamatório 24 horas após indução de OA quando comparado ao grupo PBS. A evolução da OA caracterizou-se como local e crônica apresentando diferenças estatísticas entre o grupo MIA e PBS nos dias 1, 3, 33 e 43, e na avaliação locomotora, nos dias 1, 3, 43. Não houveram diferenças significativas entre os grupos quanto níveis de citocinas. Nas análises histopatológicas observou-se deformação na cartilagem, com aumento de edema e intenso infiltrado celular no grupo MIA e diferentemente do observado no grupo PBS. Assim, a injeção de MIA foi capaz de induzir OA, com alterações imunofisiológicas, morfológicas e comportamentais consideráveis, caracterizando-se como um modelo experimental em camundongos *Swiss* de grande relevância e com potencial para testes futuros de novos fármacos.

**Palavras chave:** Análise histopatológica, MIA, Avaliação locomotora

---

<sup>1</sup> Graduando em Ciências Biológicas – UFMA

<sup>2</sup> Graduanda em Farmácia - UFMA

<sup>3</sup> Prof. Dr da Universidade Federal do Maranhão

**ABSTRACT****STANDARDIZATION OF THE EXPERIMENTAL MODEL OF OSTEOARTHRITIS IN SWISS MICE**

Osteoarthritis (OA) is a chronic inflammatory disease that causes pain, joint limitations and is an important public health problem. Sodium monoiodoacetate (MIA) is an experimental inducer of OA causing degeneration of the synovial structure. This work aimed to standardize the OA model in Swiss mice. Male animals (7 / group) were divided into 2 groups: Group PBS received 10  $\mu$ L of PBS injection, while for MIA induction, MIA group received 10  $\mu$ L of MIA at 8 mg / kg concentration in the right knee joint. The locomotor evaluation was tested by climbing the ladder and the OA evaluation was done by measuring the knee diameter performed on day 0 and on alternate days from day 1 to day 43. Blood serum was collected for cytokine dosing and the paws removed for histopathological analysis. The MIA group had an inflammatory peak 24 hour after induction of OA when compared to the PBS group. The evolution of OA was characterized as local and chronic presenting statistical differences between the MIA and PBS groups on days 1, 3, 33 and 43, and in the locomotor evaluation on days 1, 3, 43. There were no significant differences between the groups levels of cytokines. In the histopathological analysis cartilage deformation was observed, with increased edema and intense cellular infiltrate in the MIA group and differently from the one observed in the PBS group. Thus, the injection of MIA was able to induce OA, with considerable immunological, morphological and behavioral changes, being an experimental model in Swiss mice of great relevance and potential for future tests of new drugs.

**Descriptors:** Histopathological analysis, MIA, Locomotor evaluation

## INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é uma doença inflamatória crônica, multifatorial que leva a dor, incapacidade funcional progressiva e diminuição da qualidade de vida. Está categorizada entre as doenças crônicas mais prevalentes no mundo acometendo 50% ou mais dos indivíduos idosos<sup>1,2</sup>. Nos países industrializados, como o Brasil, 80% da população acima de 60 anos sofrem com OA, com maior prevalência no grupo de 70 – 79 anos, e 33,7% acometendo principalmente a articulação do joelho<sup>19</sup>.

A importância mundial desta doença tem conduzido a comunidade científica a vários estudos na busca por elucidar a complexidade do processo fisiopatológico de OA por meio de novos modelos experimentais. Atualmente, há descrito métodos para a indução da OA como: corte medial do ligamento<sup>13</sup>, transecção do menisco lateral<sup>16</sup> e indução por Monoiodoacetato de sódio (MIA)<sup>9</sup>.

A lesão por MIA ocorre pela inibição da atividade de enzimas glicolíticas e oxidativas nos condrócitos<sup>5,8</sup>. Fragmentos da degradação de proteoglicanos e colágenos em OA induzida com MIA demonstram similaridade com mecanismos de degeneração observados na cartilagem articular com OA<sup>11</sup>, assim promovendo sinais clínicos semelhantes como inflamação e dor.

Apesar do grande contingente informacional na literatura científica a respeito dos aspectos inflamatórios e dos mediadores químicos, como também da histopatologia da OA, este conhecimento já adquirido refere-se majoritariamente a resultados obtidos por testes experimentais em ratos, sendo descritos poucos trabalhos que utilizam camundongos como animais de modelo experimental, como proposto por Ogbona<sup>18</sup> (2015) que avaliou parâmetros de hipersensibilidade térmica e mecânica, e imunohistoquímica de joelhos de camundongos C57Bl/6.

A padronização do modelo experimental de OA em camundongos trata-se de um importante avanço e melhor viabilização do estudo dessa enfermidade. Por conseguinte, deve-se ao fato da maior disponibilidade desses animais, fácil manuseio e armazenamento, menores custos de manutenção, bem como maior disponibilidade de materiais biotecnológicos com menores gastos, referente ao tamanho e peso, assim caracterizando-se como um modelo viável e econômico.

Este estudo visou padronizar um modelo experimental que permitisse a avaliação futura do efeito de fármacos no tratamento da OA. Assim compreendemos que do mesmo

modo observado em ratos<sup>3</sup>, a injeção de MIA na concentração de 8mg/kg do peso do animal é capaz de induzir alterações imunofisiológicas e estruturais na arquitetura dos tecidos cartilagosos e ósseos das articulações do joelho em camundongos *Swiss*, interferindo inclusive na fisiologia locomotora do animal.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Imunofisiologia (LIF) localizado no campus do Bacanga da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Brasil. Todos os procedimentos envolvendo animais foram analisados e aprovados pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Maranhão (CEUA), sob o protocolo de número 005293/2015-14.

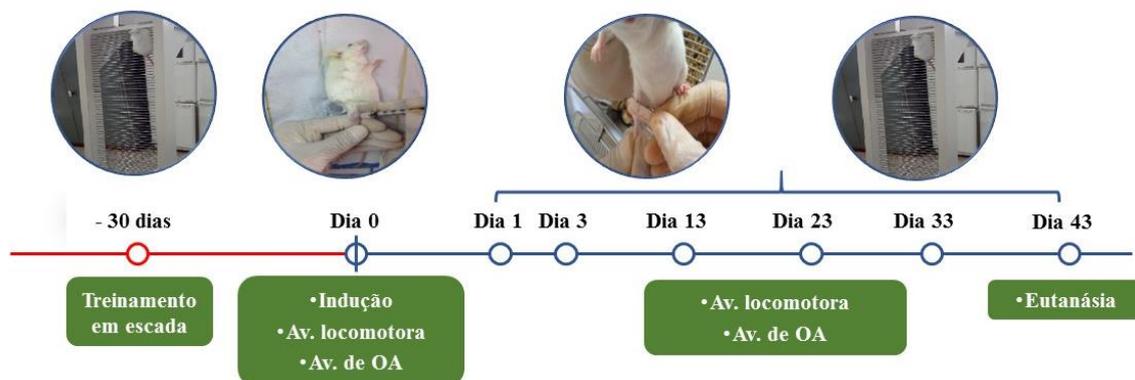
### Animais

Para execução deste trabalho foram utilizados 14 camundongos da linhagem *Swiss* adultos com idade média de 5 meses, pesando cerca de 45g, machos, provenientes do Biotério Central da UFMA. Os animais foram alimentados com ração e água *Ad libitum* e tiveram ciclo claro-escuro padronizado de 12 – 12 horas.

### Delineamento experimental

Os animais foram divididos em dois grupos PBS e MIA (n=7/grupo); estes foram previamente treinados em subida em escada por um período de 30 dias (período de adaptação à escada) antes do dia de indução de OA. No dia 0 (dia da indução), o grupo PBS recebeu injeção de 10µL de solução PBS estéril no ligamento patelar do joelho direito. No grupo MIA foi induzido a OA experimental, com injeção de 10µL de MIA na concentração de 8 mg/kg. Após 43 dias de avaliação do desenvolvimento da OA com fita métrica e da atividade locomotora, os animais foram anestesiados **com xilasina-cetamina-PBS (hidromódulo 2:1:1)**, e após a certificação do plano anestésico, foi coletado o sangue dos animais por ruptura retro-orbital para posterior obtenção do soro sanguíneo e

dosagem de citocinas. Após eutanásia, a pata direita dos animais foi retirada e fixada em 25ml de formol tamponado a 10% para análises histopatológicas futuras.



**Figura 1: Delineamento dos procedimentos experimentais de treino ao 43º dia após indução de OA.** O grupo PBS recebeu injeção de 10 µL de PBS 1x estéril no ligamento patelar do joelho direito, enquanto o grupo MIA recebeu injeção de monoiodoacetato de sódio na dose de 8mg/kg de mesmo volume 30 dias após o treino. Tanto o desenvolvimento da OA quanto atividade locomotora foram avaliados nos dias 0, 1, 3, 13, 23, 33, 43.

### Indução e avaliação de osteoartrite (OA)

Os animais foram previamente anestesiados através de injeção intramuscular (i.m.) da pata esquerda com 100µl de solução: cloridrato de xilazina (2,33 mg/ml), cloridrato de cetamina (116 mg/ml) e PBS com hidromódulo 2:1:1 utilizando seringa e agulha estéril descartável. Após certificação do plano anestésico, foi feita assepsia com solução tópica de álcool 70 % da articulação da pata posterior direita (joelho) e realizada a tricotomia. A lesão articular foi induzida por uma única injeção intra-articular de 10 µL de MIA na concentração de 8 mg/kg, com a pata flexionada, na altura do joelho, em um ângulo de aproximadamente 90°. A solução de MIA foi injetada através do ligamento patelar utilizando uma agulha Seringa Ultra-Fine BD 6mm® no espaço intra-articular entre tibia e fêmur<sup>6, 21</sup>.

Para a avaliação da cinética da inflamação foi utilizada fita métrica de precisão para definir o diâmetro articular do joelho, em centímetros. A avaliação foi realizada em dias alternados (do 1º ao 43º dia, incluindo o dia da indução - dia 0). Posteriormente os dados quantitativos foram expressos com base na seguinte fórmula:

$$\text{DIA (N)} - \text{DIA 0} = \Delta_n$$

Onde  $N$  é o dia de avaliação e  $\Delta_n$  o valor em delta do dia específico de análise.

### **Avaliação locomotora (AvL)**

Após o período de adaptação ao aparelho já mencionado anteriormente. Neste método foi medido o tempo de subida em escada (**1m de altura**) e número de estímulos, com 3 repetições para cada animal.

A cronometragem do tempo de avaliação se deu da seguinte forma: os animais foram colocados na base da escada, após sua adesão a esta, inicia-se imediatamente a cronometragem do tempo. Caso o animal não subisse no tempo de 1 segundo este foi sujeito a um estímulo de subida. Havendo persistência da ausência de atividade, o animal recebeu novos estímulos com intervalo de tempo de 2 segundos. E por fim detectado ausência total de atividade com número acima de 10 estímulos, a avaliação foi finalizada (vídeo em anexo em cd). O resultado final de déficit de locomoção foi expresso baseado na seguinte fórmula:

$$\frac{\sum t + \sum n^{\circ} E}{n^{\circ} \text{ de Repetições}}$$

Onde  $t$  é o tempo total cronometrado em segundos e  $E$  é o número de estímulos.

### **Dosagem de citocinas**

Para a quantificação das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$  foi utilizada a técnica de CBA, ensaio citométrico de esferas ordenadas, a partir do soro sanguíneo. Todos os reagentes utilizados foram provenientes do Kit - BD Cytometric Bead Array (CBA) inflammation Mouse obtidos da Becton Dickinson Biosciences (San Jose, CA, USA).

Os soros foram centrifugados à 1500 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente para precipitação de debris. Em cada poço da placa de 96 poços, fundo U, foram adicionados 25 µL da amostra padrão fornecida pelo fabricante ou dos soros a serem testados. Em seguida receberam 25µL de cada reagente “cytokine beads” para marcar a produção de cada citocina e 25 µL de anticorpo conjugado ao fluorocromo PE. As amostras foram homogeneizadas e incubadas à temperatura ambiente por 3 horas protegidos da luz. Após o período de incubação as amostras foram ressuspensas com 300 µL de solução tampão. A placa foi centrifugada por 10 minutos à 453 rpm e o sobrenadante foi descartado. As amostras foram então ressuspensas em 150 µL de solução tampão para leitura no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Após a leitura dos padrões e das amostras, os dados foram analisados no software FCAP ARRAY Versão 3.0 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), onde os valores foram expressos em pg/mL para cada citocina.

### **Análise histopatológica da sinóvia**

As patas com injeção de MIA ou PBS foram fixadas em formol a 10% até o período de processo de descalcificação. As amostras ficaram submersas em solução de EDTA 5%. (Solução descalcificante) por 15 dias. Os tecidos foram posteriormente colocados em formalina, desidratados em uma série graduada de etanol e xilol, incorporado em parafina, cortados em secções em série de 6 mm de espessura e corado com hematoxilina-eosina (H & E). A análise histopatológica foi realizada empregando-se interpretação de parâmetros como infiltrado celular, necrose, formação de edema e hemorragia, por meio de *score* de avaliação referente aos níveis: ausente (0), leve (1), moderado (2) e intenso (3). A imagens analisadas apresentavam aumento de 100x.

### **Análises estatísticas**

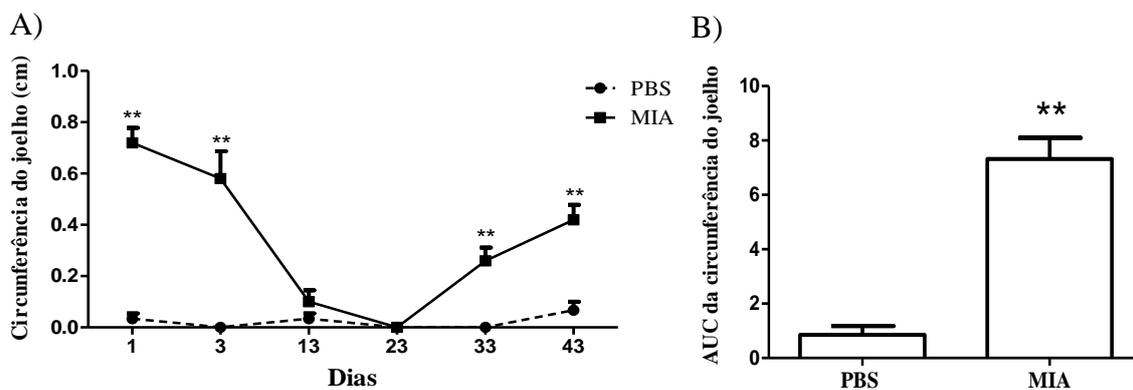
As análises foram realizadas no software GraphPad Prism 5.0 ®. A comparação entre os grupos para análise de distribuição foi feita com o teste D'Agostin Pearson em seguida *Test t student* quando houve distribuição normal, ou teste de Mann-Whitney

quando não houve distribuição normal. As diferenças foram consideradas significativas para valores de \* $p \leq 0,05$  e \*\* $p \leq 0,01$ .

## RESULTADOS

### Avaliação do desenvolvimento da OA

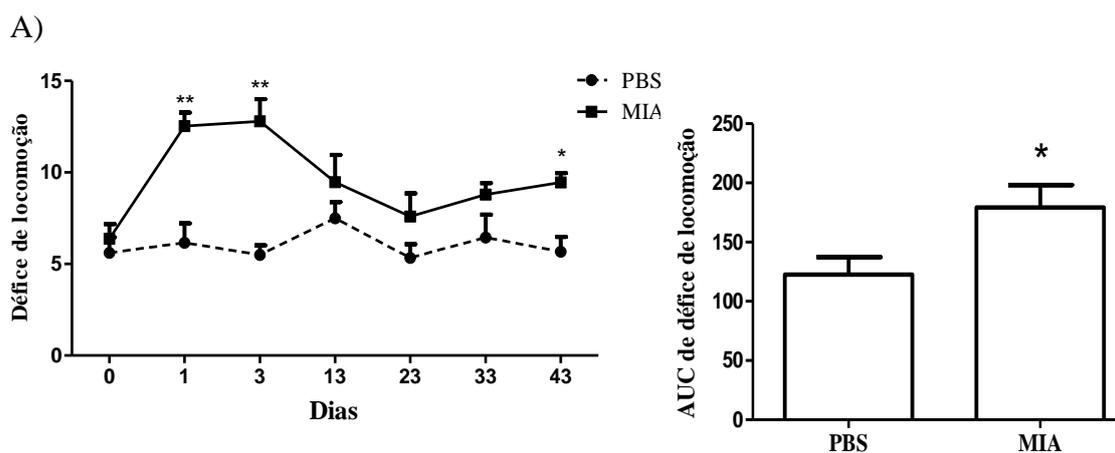
Avaliando a progressão do desenvolvimento da OA foi observado que a injeção de MIA na dose de 8mg/kg foi capaz de promover uma inflamação inicial em camundongos *Swiss* com pico inflamatório logo após as 24h da indução. A avaliação da cinética da inflamação sinovial demonstrou que houve diferenças significativas do grupo MIA em relação ao grupo PBS nos dias 1, 3, 33 e 43 (figura 2A). A análise da área sob a curva (figura 2B) demonstrou uma expressiva diferença entre o grupo MIA quando comparado ao grupo PBS.



**Figura 2: Avaliação do desenvolvimento de OA em camundongos** O grupo PBS recebeu injeção de 10  $\mu$ L de PBS 1x estéril no ligamento patelar do joelho direito, enquanto o grupo MIA recebeu injeção de monoiodoacetato de sódio na dose de 8mg/kg de mesmo volume. Os joelhos dos animais foram medidos com auxílio de fita métrica em dias alternados (do 1º ao 43º dia, incluindo o dia 0). **A) Delta de OA:** Os dados obtidos foram convertidos em delta (valor do dia x - valor do dia 0). **B) AUC de OA:** Área sob a curva do desenvolvimento de OA. As análises estatísticas foram por Test *t* Student para valores significativos de \*\* $p < 0.01$  em comparação ao grupo PBS.

### Avaliação locomotora

Foi observado que animais do grupo MIA demandaram mais tempo/estímulo para concluir a atividade locomotora sobre a escada em relação ao grupo PBS nos dias 1, 3, 43 (figura 3A). Na análise da área sob a curva observou-se que o MIA é estaticamente diferente quando comparado ao grupo PBS (figura 3B).



**Figura 3: Avaliação locomotora de animais em modelo experimental de OA em camundongos.** O grupo PBS recebeu injeção de 10  $\mu$ L de PBS 1x estéril no ligamento patelar do joelho direito, enquanto o grupo MIA recebeu injeção de monoiodoacetato de sódio na dose de 8mg/kg de mesmo volume. Os animais foram avaliados em dias alternados (do 1º ao 43º dia, incluindo o dia 0.) **A) Avaliação Locomotora:** Os dados foram expressos como déficit de locomoção considerando tempo e estímulo. **B) AUC de AvL:** área sob a curva da avaliação locomotora por medição do déficit de locomoção. As análises estatísticas foram por Test *t* Student para valores significativos de \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  em comparação ao grupo PBS.

### Análise de citocinas

Não foram observadas diferenças significativas na quantificação de citocinas circulantes do grupo MIA quando comparado ao grupo PBS referente ao 43º dia após a indução (Tabela 1).

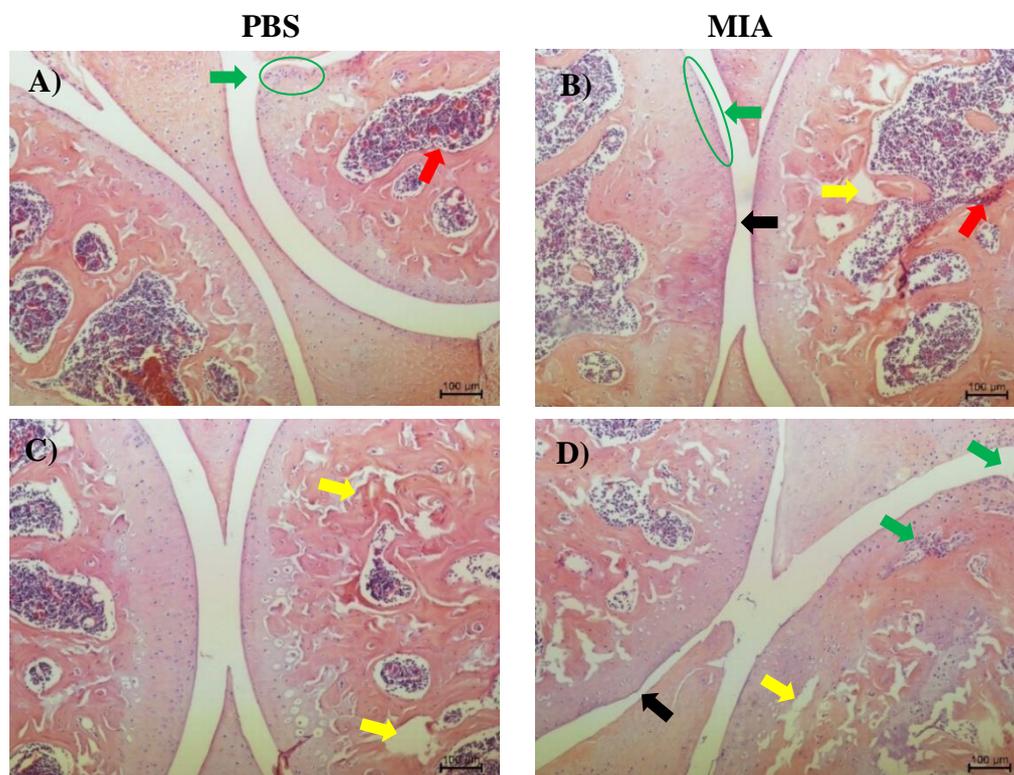
**Tabela 1. Média das concentrações de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , IL6 e IL-10 em pg/mL.**

Grupos	IFN- $\gamma$	IL-12	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-10
PBS	0,03 $\pm$ 0,07	0,0 $\pm$ 0,0	86,02 $\pm$ 5,02	0,2 $\pm$ 0,59	0 $\pm$ 0,0
MIA	0,09 $\pm$ 0,12	0,52 $\pm$ 1,16	63,77 $\pm$ 8,48	0,09 $\pm$ 0,21	0 $\pm$ 0,0

O grupo PBS recebeu injeção de 10  $\mu$ L de PBS 1x estéril no ligamento patelar do joelho direito, enquanto o grupo MIA recebeu injeção de monoiodoacetato de sódio na dose de 8mg/kg de mesmo volume. No dia 43 foi coletado soro sanguíneo dos animais. Para a dosagem das citocinas foi utilizada a técnica de CBA. As análises estatísticas foram por Test *t* Student em comparação ao grupo PBS.

### Análise histopatológica da sinóvia

Para a avaliação histopatológica foi observado que o grupo MIA apresentou diferença significativa em comparação ao grupo PBS apenas para o parâmetro de infiltrado celular quando todos os animais do grupo MIA apresentaram estágio intenso e os animais do grupo PBS estágio moderado. Também foi observado no grupo MIA deformação na cartilagem, com presença de hemorragia moderada ao intenso, formação de edema apenas do tipo intenso com predominância de células do tipo neutrófilo (Figura 4B e 4D). Enquanto o grupo PBS apresentou hemorragia leve e arquitetura tecidual íntegra. Para a formação de edema foi verificado no grupo PBS uma variação entre intenso e moderado (Tabela 2). Não foram observadas presença de necrose celular em ambos os grupos.



**Figura 4 Análise histopatológica do joelho em modelo experimental de OA.** O grupo PBS recebeu injeção de 10  $\mu$ L de PBS 1x estéril no ligamento patelar do joelho direito, enquanto o grupo MIA recebeu injeção de monoiodoacetato de sódio na dose de 8mg/kg de mesmo volume. Os cortes histológicos apresentam espessura de 6mm coradas com Hematoxilina & Eosina **A) e C) Cortes histológicos do grupo PBS. B) e D) Cortes histológicos do grupo MIA.** As setas: vermelho, amarelo, verde e preto representam presença respectivamente de: hemorragia, edema, infiltrado celular e deformação na cartilagem. As imagens obtidas apresentam ampliação de 100x.

**Tabela 2: Análise histopatológica da membrana sinovial de animais com OA experimental.**

GRUPOS	EDEMA	INFILTRADO CELULAR	HEMORRAGIA	NECROSE
PBS	2,3±0,5	2,0±0,0	1,6±1,1	0,0±0,0
MIA	3,0±0,0	3,0±0,0*	2,3±0,5	0,0±0,0

A análise histopatológica foi realizada empregando-se interpretação subjetiva de parâmetros como: edema, infiltrado celular, hemorragia e necrose, por meio de escore de avaliação referente aos níveis: ausente (0), leve (1), moderado (2) e intenso (3). Os valores foram expressos por média  $\pm$  desvio padrão. As análises estatísticas foram por Test *t* Student para valores significativos de  $*p < 0,05$  em comparação ao grupo PBS.

## DISCUSSÃO

Neste trabalho foi utilizado o MIA como indutor da inflamação sinovial articular, uma vez que já é descrito na literatura a capacidade de promover um quadro clínico similar aos dos pacientes portadores de OA, tais como: inflamação e dor crônica, esclerose do osso subcondral, formação de osteófitos, lesão da cartilagem e alterações de biomarcadores como glicosaminoglicanos e metaloproteinases seguida de inibição da glicólise e morte de condrócitos<sup>4, 6, 8, 14</sup>.

Segundo Smith<sup>20</sup> et al (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. 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* (figura 1A). Este resultado demonstra que existe uma importante diferença na resposta imune entre modelos de OA induzidos em camundongos e ratos. Em *Rattus norvegicus* foi observado pico inflamatório apenas no 7º dia após indução com MIA (Indutor de degradação articular)<sup>3</sup>. Deste modo, podemos concluir que camundongos *Swiss* demonstram uma resposta mais acelerada aos efeitos do MIA em relação ao modelo aplicado em ratos<sup>3</sup>.

A inflamação tende a diminuir a partir do 3º dia após indução, porém, foi observado uma evidente recidiva na inflamação do grupo MIA a partir do 23º dia (uma vez que, o grupo PBS manteve-se constante) com apenas uma única injeção de MIA

(figura 1A). Segundo Hochberg<sup>10</sup> et al, 2016, a recidiva e regressão dos sintomas de OA visto neste trabalho é um mecanismo comum que pode ser observado na fase pré-clínica e clínica da doença, sugerindo assim, que o modelo experimental de OA via injeção de MIA apresenta características de inflamação crônica.

Os sinais clínicos característicos de OA descrito por Li<sup>15</sup> et al., 2016, que envolvem dor na região afetada, rigidez articular, movimento restrito e crepitação são fatores cruciais e limitantes de movimento. Neste trabalho foi desenvolvido um modelo de avaliação denominado: avaliação locomotora (AvL), o qual foi capaz de expressar as diferenças na fisiologia de locomoção e comportamento dos animais entre os grupos.

Na Av.L foi observado diferenças significativas do grupo MIA em relação ao grupo PBS nos dias 1, 3, 43 (figura 3A). Este resultado demonstra conformidade com a evolução da OA mostrada na figura 1A, quando o pico inflamatório se deu no período inicial. De semelhante modo, nos dias 13 e 23 da avaliação, quando a inflamação se apresentou menos expressiva (figura 2A), não foi observado diferença estatística do grupo MIA quando comparado ao grupo PBS.

As regressões e recidivas da inflamação são características típicas de indivíduos com OA<sup>10</sup>, e o modelo proposto simulou eficientemente esse aspecto da doença em camundongos quando submetidos a avaliação do desenvolvimento da OA e na AvL. Analisando o gráfico de área sob a curva (figura 3B) foi conferido que os animais do grupo MIA em comparação ao grupo PBS apresentaram diferença significativa no tempo de locomoção. Novamente este resultado reforça a hipótese de que o modelo utilizado neste trabalho se caracteriza como um eficiente modelo experimental de OA.

Naturalmente, é comum pacientes portadores de OA adotarem mudança de comportamentos na locomoção com intuito de amenizarem a dor. Ao longo desse estudo foi observado que uma porcentagem considerável dos animais não utilizava a pata afetada; nesse caso, perdia-se o sincronismo das patas e, ao invés de andar, saltavam na escada acelerando o tempo de subida, porém paravam; possivelmente por causa da dor ou cansaço. A associação de tempo e estímulos na fórmula de avaliação foi capaz de eliminar o viés do comportamento do animal na avaliação de locomoção sem desconsidera-lo.

A OA é uma doença que se caracteriza principalmente como inflamação local, no entanto, neste estudo buscou-se avaliar a doença de forma sistêmica com o intuito de

buscar novos parâmetros para sua caracterização. Para isso, foram realizados a quantificação de citocinas. Estes mediadores de inflamação envolvidos apresentam importante papel no efeito catabólico (na degradação da articulação) e anabólico (na regeneração da cartilagem)<sup>17,23</sup>. Contudo, não foi verificada diferenças estatísticas de citocinas circulantes em ambos os grupos no 43º dia após a indução. Sem alterações sistêmicas, analisamos alterações histopatológicas na articulação sinovial.

A integridade da cartilagem sinovial é um importante fator de caracterização de uma articulação saudável. Deformações nessa, podem representar um sinal clínico clássico de doenças articulares como OA e artrite reumatóide<sup>7, 12</sup>. Foi observado que animais do grupo PBS apresentaram parâmetros de edema e infiltrado celular em grau moderado, possivelmente este resultado deve-se ao desgaste natural em decorrência do envelhecimento.

Enquanto, superfície da cartilagem dos animais do grupo PBS estava íntegra, foram registradas deformações na cartilagem articular de animais do grupo MIA. Possivelmente, esta deformação esteja associada a presença de infiltrado celular e formação de edema de grau intenso. Segundo Sommer<sup>22</sup> (2010) o infiltrado promove a produção de citocinas pró-inflamatórias capazes de destruir a cartilagem, ossos e tecidos moles adjacentes. Deste modo, essa irregularidade na superfície articular nos tecidos do grupo MIA expressa uma clara evidência do desenvolvimento da OA.

## **CONCLUSÃO**

A injeção de MIA na concentração de 8mg/kg foi eficaz na indução de OA caracterizando o modelo experimental como inflamatório crônico capaz de promover alterações fisiológicas locais, com reflexos na atividade locomotora e comportamento em camundongos *Swiss* com base em um novo método avaliativo de locomoção.

## **REFERENCIAS**

1. Allen KD, Golightly YM. State of the evidence. *Curr Opin Rheumatol.*; 27(3):276-83. 2015.
2. Alkan BM, Fidan F, Tosun A, Ardiçoğlu O. Quality of life and self-reported disability in patients with knee osteoarthritis. *Mod Rheumatol*;24(1)166-71. 2014.
3. Calado GP, Lopes AJO, Junior LMC, Lima FCA, Silva LAS, Pereira WS, Amaral FMM, Garcia JBS, Cartágenes MSS, Nascimento FRF. *Chenopodium ambrosioides* L. Reduces Synovial Inflammation and Pain in Experimental Osteoarthritis. *Plos One*, [s.l.], v. 10, n. 11, p.1-20, 2 nov.. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0141886>. 2015.
4. Combe R, Bramwell S, Field MJ. The monosodiumiodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? *Neurosci. Lett.*, Nov, v. 370, n. 2-3, p. 236-240, 2004.
5. Dunhan J, Hoedt-schmidt S, Kalbhen DA. Prolonged effect of iodoacetate on articular cartilage and its modification by an anti-rheumatic drug. *Int J Exp Path.*; 74(3):283-289, Jun 1993.
6. Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, Fox A, Rediske J, Pellas T, Kidd B, Bevan S, Winter J. Pain related behavior in two models of osteoarthritis in rat knee. *Pain*, v. 112, p. 83-93, 2004.
7. Freitas DA, Guedes, MBO, Fonseca, SF. Efeito de um programa de treinamento aeróbico na dor, desempenho físico e funcional e na resposta inflamatória em idosos com osteoartrite de joelho- Resultados preliminares. *Ter Man.*; 10(47):52-59, 2012.
8. C RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: in animal model of osteoarthritis. *Toxicol. Pathol*, Jan/Fev. v. 52, n.1, p. 86-100, 2003.
9. Guingamp C, Gegout-pottie P, Philippe L, Terlain B, Netter P, Gillet P. Mono-iodoacetate induced experimental osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism.*; 40(9):1670-1679, Sep 1997.
10. Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman M. *Rheumatology*, 2-Volume Set, 6th Edition. Elsevier Health Sciences Brazil, Setembro, 2016.
11. Janusz MJ, Little CB, King LE, Hookfin EB, Brown KK, Heitmeyer SA, ET AL. Detection of aggrecanase- and MMP- generated catabolic neopeptides in the rat iodoacetate model of cartilage degeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. Sep; 12(9):720-8, 2004.
12. Josh VR. Rheumatology: past, present and future. *J. Assoc. Physicians India*, v. 60, p. 21, 2012.

13. Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, Uchida M, Ogata N, Seichi A, Nakamura K, Kawaguchi H. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage*;13:632–641, 2005.
14. Lee CH, Wen ZH, Chang YC, Huang SY, Tang CC, Chen WF, Hsieh SP, Hsieh CS, Jean YH. Intra-articular magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>) reduces experimental osteoarthritis and nociception: association with attenuation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit 1 phosphorylation and apoptosis in rat chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, Nov; v. 17, n.11, p. 1485-1489, 2009.
15. Li X, Dong Z, Zhang F, Dong J, Zhang Y. Vitamin E slows down the progression of osteoarthritis (Review). *Experimental and therapeutic medicine* 12: 18-22, 2016
16. Little CB, Zaki S. What constitutes an “animal model of osteoarthritis” – the need for consensus? *Osteoarthritis And Cartilage*, [s.l.], v. 20, n. 4, p.261-267, abr. 2012.
17. Muller MB, Tuan RS. Anabolizantes / equilíbrio catabólicos em patogênese da osteoartrite: identificação de alvos moleculares. *PM & R.*; vol 3 (6, suplemento 1):. S3- S11, 2011.18 Ogbonna AC, Clark AK, Malcangio M. Development of monosodium acetate-induced osteoarthritis and inflammatory pain in ageing mice. *Age*, [s.l.], v. 37, n. 3, p.37-54, 14 maio 2015.
18. Ogbonna AC, Clark AK, Malcangio M. Development of monosodium acetate-induced osteoarthritis and inflammatory pain in ageing mice. *Age*, [s.l.], v. 37, n. 3, p.37-54, 14 maio 2015.
19. Pineda MB, Sotos JH, Puentes MV. Calidad de vida, em pacientes com artrosis de rodilla y/o cadera. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*. 2014.
20. Smith MM, Little CB. Review: Animal Models of Osteoarthritis. *Current Rheumatology Reviews*. v.4, 2008.
21. Silva A, Andersen ML, Tufik S. Sleep pattern in an experimental model of osteoarthritis. *Pain*, v. 140. p. 446-455, 2008.
22. Sommer C, White, F. Cytokines, chemokines and pain. *Pharmacology of pain*. P. 279 – 302, 2010.
23. Wojdasiewicz P, Poniatowski AA, Szukiewicz D. The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediator of Inflammation*, Julho, 2014.

## CAPÍTULO 2

### FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE *Disphania ambrosioides* L. INIBE O DESENVOLVIMENTO DA OSTEOARTRITE EXPERIMENTAL.

COSTA, Arthur André Castro<sup>4</sup>; SOUSA, Lucas André Ferreira<sup>4</sup>; OLIVEIRA, Jacqueline Ribeiro<sup>5</sup>; NASCIMENTO, Flávia Raquel Fernandes<sup>6</sup>; GUERRA, Rosane Nassar Meireles<sup>6</sup>; PEREIRA, Wanderson Silva<sup>6</sup>

#### RESUMO

Osteoartrite é uma doença inflamatória sinovial associada a dor, limitação do movimento e perda da funcionalidade da articulação. Neste estudo foi avaliado o efeito do tratamento oral por gavagem com fração acetato de etila das folhas de *Dysphania ambrosioides* em modelo experimental de OA. Para isso, camundongos *Swiss*, machos, foram divididos em 4 grupos (5/grupo), logo após a indução de OA com MIA (8mg/kg do peso do animal). Grupo Controle foi administrado com 100µL com PBS; Grupos FAcOEt 0.5, FAcOEt 1.0 e FAcOEt 5.0, foram tratados com a fração nas doses de 0.5, 1.0 ou 5.0 mg/kg, do peso do animal, respectivamente. A avaliações ocorreram em dias alternados (do 1º ao 43º dia, incluindo o dia 0). Na avaliação de OA, o diâmetro do joelho dos animais foi medido com fita métrica. Na avaliação locomotora foram quantificadas subidas em escada por fórmula que leva em consideração o tempo e estímulos. Os órgãos linfóides foram coletados, pesados e processados para a contagem total de células. Houve inibição considerável da inflamação no joelho dos animais e menor déficit de locomoção do grupo FAcOEt 5.0 após tratamento apresentando diferença significativa em relação ao Controle nos dias 23, 33 e 43, porém, sem alteração na celularidade e peso de órgãos linfóides com exceção da celularidade do baço no grupo FAcOEt 1.0, onde foi observado um aumento significativo. Assim, podemos concluir que o tratamento FAcOEt na dose de 5mg/kg apresenta efeito sobre a OA sendo capaz reverter o quadro de progressão da doença e melhora na atividade locomotora.

**Palavras chave:** OA, FAcOEt, Avaliação locomotora

---

<sup>4</sup> Graduando em Ciências Biológicas – UFMA

<sup>5</sup> Graduando em Farmácia - UFMA

<sup>6</sup> Prof. Dr da Universidade Federal do Maranhão

**ABSTRACT****FRACTION OF ETILA ACETATE OF LEAVES OF *Disphania ambrosioides* L. INHIBIT THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL OSTEOARTRITE**

Osteoarthritis is an inflammatory synovial disease associated with pain, limited movement and loss of joint function. In this study the effect of oral treatment by gavage with ethyl acetate fraction of leaves of *Dysphania ambrosioides* was evaluated in an experimental model of OA. For this, Swiss male mice were divided into 4 groups (5 / group), soon after the induction of OA with MIA (8mg / kg of animal weight). Control Group was administered with 100µL with PBS; Groups FAcOEt 0.5, FAcOEt 1.0 and FAcOEt 5.0, were treated with the fraction at doses of 0.5, 1.0 or 5.0 mg / kg, of animal weight, respectively. Evaluations occurred on alternate days (from day 1 to day 43, including day 0). In the evaluation of OA, the knee diameter of the animals was measured with tape measure. In the locomotor evaluation, ladder ascents were quantified by formula taking into account the time and stimuli. The lymphoid organs were collected, weighed and processed for the total cell count. There was considerable inhibition of knee inflammation in the animals and lower locomotion deficit of the FAcOEt 5.0 group after treatment presenting a significant difference in relation to the Control on days 23, 33 and 43, but without alteration in the cellularity and weight of lymphoid organs with the exception of cellularity of the spleen in the FAcOEt 1.0 group, where a significant increase was observed. Thus, we can conclude that the FAcOEt treatment at a dose of 5mg / kg has an effect on OA being able to reverse the progression of the disease and improve the locomotor activity.

**Descriptors:** OA, FAcOEt, Locomotor evaluation

## INTRODUÇÃO

A Osteoartrite (OA) é uma doença inflamatória da articulação sinovial associada a dor, inchaço articular, limitação do movimento e perda da funcionalidade da articulação acometida<sup>3</sup>. O inchaço é uma característica clínica atribuída à inflamação, indicando a presença de sinovite devido ao espessamento da membrana sinovial através do processo de infiltração de células mononucleares<sup>12,13</sup>. Segundo Goldring<sup>12</sup> (2011), o infiltrado de condrócitos desempenha um importante papel no efeito catabólico na matriz celular através da produção de mediadores pró-inflamatórios por condrócitos, incluindo IL - 1 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Em pacientes com OA, os condrócitos e as células sinoviais produzem níveis aumentados do TNF- $\alpha$ , que juntamente com IL-1 atuam diminuindo a síntese de colágeno e aumentam mediadores catabólicos, como metaloproteinases de matriz (MMPs) e outras substâncias inflamatórias como IL-8, IL-6, prostaglandina E2 (PGE2) e óxido nítrico (NO)<sup>21</sup>.

Com base nisso, em 1977 foi descrito pela primeira vez por Kalbhen e Blum a utilização de Monoiodoacetato de sódio (MIA) em modelos experimentais que simulem a OA<sup>14</sup>. 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 resultado a degradação da articulação. Por consequência, ocorre uma retração na cartilagem, e por fim, às características histopatológicas semelhantes a OA de humanos<sup>11</sup>. Essa aplicação intra-articular de 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 hiperalgisia secundária, em detrimento da nocicepção no sítio primário de lesão, que seria o sintoma de real morbidez na clínica<sup>17</sup>.

Considerando a importância da relevância mundial da OA, estudos têm buscado novas alternativas em tratamentos com base em fitoterápicos, cujo objetivo é melhorar o quadro clínico e fisiopatológico dessa enfermidade. Estudos têm demonstrado efeito benéfico do extrato de semente de uva<sup>29</sup>, abacate e soja<sup>5</sup> e mastruz<sup>2</sup>, entre outros.

*Dysphania ambrosioides* L., antes denominada de *Chenopodium ambrosioides* L. de acordo com o Trópicos Garden<sup>11</sup> (2017), pertence à família Amaranthaceae e é conhecida popularmente como mastruz, sendo uma planta largamente utilizada pela

medicina popular no tratamento de pneumonias, resfriados, equimoses, ferimentos, inflamações e contusões dolorosas<sup>16,23</sup>. Atualmente, já são descritas importantes atividades biológicas dessa espécie vegetal para doenças articulares, como: anti-inflamatório<sup>27</sup>, analgésico<sup>26</sup>, antiartrítico<sup>20</sup>, reparador de tecidos moles e de tecido ósseo<sup>22</sup> e inibindo o desenvolvimento de OA<sup>2</sup>. É sabido que a fração acetato de etila assim como o extrato bruto hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* (EBH) apresentam propriedades polares similares, assim metabólitos secundários presentes no EBH possivelmente podem estar envolvidos na resposta efetiva a enfermidades<sup>6</sup>. Segundo Neiva<sup>19</sup> (2011) o EBH possui constituintes químicos como ácido orgânicos, alcaloides, compostos fenólicos, saponinas, taninos condensados e flavononas sendo descritos por ter atividade anti-inflamatória. Com base nisso, foi hipotetizado que a Fração acetato de etila das folhas de *D. ambrosioides* (FACOEt) pode apresentar efeito inibidor no desenvolvimento de OA em modelo experimental em camundongos mostrando regressão da inflamação articular e melhora na a atividade locomotora.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Identificação do material vegetal e preparo dos extratos**

As folhas de *D. ambrosioides* foram coletadas manualmente no horto Paz e Harmonia, no município de São José de Ribamar - MA e identificadas no Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, MA, Brasil (número: 0998/SLS017213). As folhas foram secas à temperatura de 37°C, pulverizadas e depois maceradas com etanol a 70%, sendo agitadas a cada 8 h. Após 24h, o produto da maceração foi filtrado. O procedimento de maceração e filtração foi repetido quatro vezes. Finalmente, após filtração, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida no evaporador rotativo, produzindo assim o extrato bruto hidroalcoólico (EBH). O fracionamento foi realizado pela partição sequencial com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) a partir do EBH seco, sendo que neste trabalho foi utilizada somente a fração acetato de etila (FAcOEt). Posteriormente, a FAcOEt foi concentrada em evaporador rotativo. A fração seca foi pesada e foi feito o cálculo do rendimento final, cujo resultado foi de 1,32g da fração acetato de etila para cada 10g do EBH.

### **Animais**

Para execução deste trabalho foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss* adultos com idade média de 5 meses, pesando cerca de 45g, machos, 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.

Todos os procedimentos envolvendo animais foram analisados e aprovados pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Maranhão (CEUA), sob o protocolo de número 005293/2015-14.

### **Indução e avaliação de osteoartrite (OA)**

Os animais foram previamente anestesiados através de injeção intramuscular (i.m.) da pata esquerda com 100µl de solução: cloridrato de xilazina (2,33 mg/ml), cloridrato de cetamina (116 mg/ml) e PBS com hidromódulo 2:1:1 utilizando seringa e agulha estéril descartável. Após certificação do plano anestésico, foi feita assepsia com solução tópica de álcool 70 % da articulação da pata posterior direita (joelho) e realizada a tricotomia. A lesão intra-articular foi induzida por uma única injeção intra-articular de 10 µL de MIA na concentração de 8 mg/kg, com a pata flexionada, na altura do joelho, em um ângulo de aproximadamente 90°, a solução de MIA foi injetada através do ligamento patelar utilizando uma agulha Seringa Ultra-Fine BD 6mm® no espaço intra-articular entre tíbia e fêmur<sup>9,24</sup>.

Para a avaliação da cinética da inflamação foi utilizada fita métrica de precisão para definir o diâmetro articular do joelho, em centímetros. A avaliação foi realizada em dias alternados (do 1° ao 43° dia, incluindo o dia da indução - dia 0 Posteriormente os dados quantitativos foram expressos com base na seguinte fórmula:

$$\text{DIA (N)} - \text{DIA 0} = \Delta_n$$

Onde  $N$  é o dia de avaliação e  $\Delta_n$  o valor em delta do dia específico de análise.

### **Avaliação locomotora (AvL)**

Para a avaliação da atividade locomotora, realizada nos dias concomitantes da avaliação do desenvolvimento de OA, primeiramente os animais foram treinados durante um período de 30 dias antes do dia da indução de OA para a adaptação à escada. Nesta avaliação foi medido o tempo de subida em escada, com 3 repetições para cada animal.

A cronometragem do tempo de avaliação se deu da seguinte forma: os animais foram colocados na base da escada, após sua adesão a esta, inicia-se imediatamente a cronometragem do tempo. Caso o animal não subisse no tempo de 1 segundo este foi sujeito a um estímulo de subida. Havendo persistência da ausência de atividade, o animal recebeu novos estímulos com intervalo de tempo de 2 segundos. E por fim detectado ausência total de atividade com número acima de 10 estímulos, a avaliação foi finalizada

(vídeo em anexo em cd). O resultado final de déficit de locomoção foi expresso baseado na seguinte fórmula:

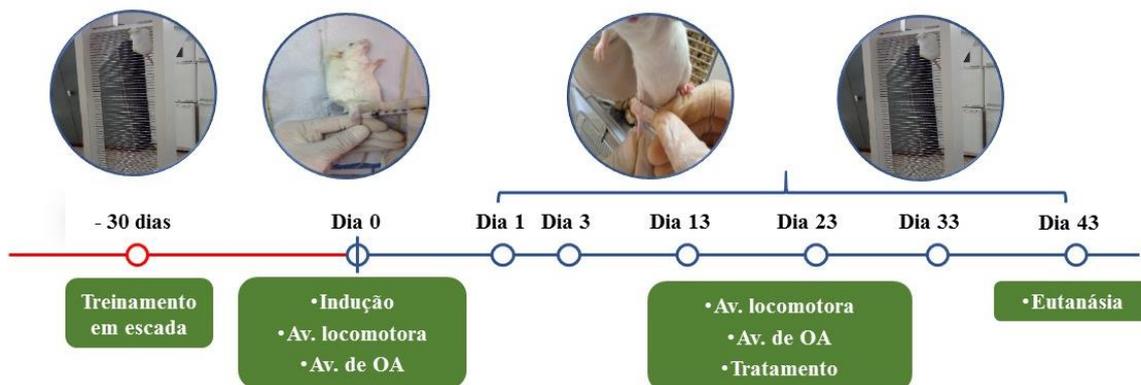
$$\frac{\sum t + \sum n^{\circ} E}{n^{\circ} \text{ de Repetições}}$$

Onde  $t$  é o tempo total cronometrado em segundos e  $E$  é o número de estímulos.

### **Delineamento experimental**

Os animais foram divididos em 4 grupos ( $n=5/\text{grupo}$ ). No dia 0, todos os animais foram submetidos à indução de OA. O Grupo Controle foi administrado com PBS. Animais dos grupos FacOet 0.5, FacOet 1.0, FacOet 5.0, após indução de OA, foram tratados com a fração acetato de etila nas doses de 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, 5.0 mg/kg respectivamente. Os animais foram tratados diariamente via oral por gavagem.

A avaliação de OA e a Av. L foram realizadas em dias alternados, do 1º ao 43º dia, incluindo o dia da indução - dia 0. No 43º dia de experimento, após tratamento, os animais foram anestesiados com **xilasina-cetamina-PBS (hidromódulo 2:1:1)**, e após a certificação do plano anestésico, foi coletado o sangue dos animais por ruptura retro-orbital para posterior obtenção do soro sanguíneo. A pata direita dos animais foi retirada e fixada em 25mL de formol tamponado a 10% visando análises futuras. Os órgãos linfóides foram pesados em balança de precisão e posteriormente foram macerados para contagem de células; o linfonodo inguinal e baço foram macerados em 1 mL e 3 mL de PBS, respectivamente. As células foram coradas em cristal violeta e contadas em microscópio óptico utilizando câmara de Neubauer.



**Figura 1: Delineamento dos procedimentos experimentais de treino ao 43º dia após indução de OA.** O grupo PBS recebeu injeção de 10  $\mu$ L de PBS 1x estéril no ligamento patelar do joelho direito, enquanto o grupo MIA recebeu injeção de monoiodoacetato de sódio na dose de 8mg/kg de mesmo volume 30 dias após o treino. Tanto o desenvolvimento da OA quanto atividade locomotora foram avaliados nos dias 0, 1, 3, 13, 23, 33, 43. A partir do dia 1 os animais foram tratados com FAcOEt de *Dysphania ambrosioides* nas doses de 0.5 mg/Kg, 1.0 mg/Kg, 5.0 mg/Kg ou administrado com PBS.

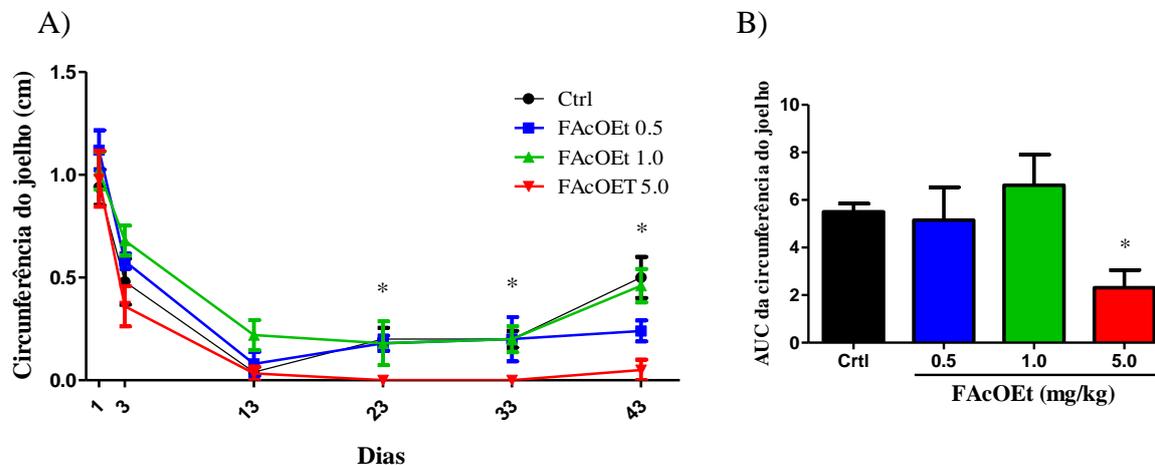
### Análises estatísticas

As análises foram realizadas no software GraphPad Prism 5.0 ® utilizando o teste t e ANOVA, seguido pelo teste de Dunnet, sendo considerado como significativo um valor de  $*p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

### Avaliação do desenvolvimento de OA

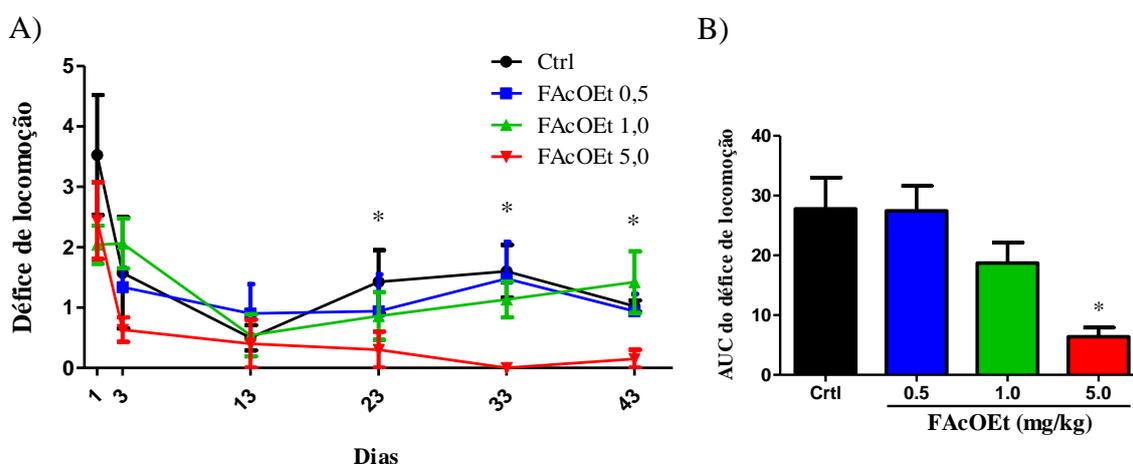
A avaliação do desenvolvimento da inflamação de OA demonstrou que o modelo aplicado funcionou, uma vez que foi observado inflamação inicial com pico inflamatório no dia 1 para todos os grupos em conformidade com o modelo padronizado para camundongos<sup>7</sup>. Na avaliação da cinética da inflamação articular foi observado que não houveram 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. Entretanto, pode-se observar uma inibição do desenvolvimento da inflamação articular no grupo FAcOEt 5.0, demonstrando diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo Controle nos dias 23, 33 e 43 (figura 2A). Analisando o gráfico da área sob a curva verificou-se que o quadro geral da inflamação sinovial apresentou diferença significativa apenas no grupo FAcOEt 5.0 em comparação ao Controle (figura 2B).



**Figura 2: Avaliação do desenvolvimento de OA em camundongos em animais tratados com FAcOEt de *D. ambrosioides*.** Os animais foram submetidos a injeção de MIA na dose de 8mg/kg no ligamento patelar do joelho direito. O grupo Controle foi administrado de PBS 1x, enquanto os grupos: FAcOEt 0.5 e FAcOEt 1.0 e FAcOEt 5.0 foram tratados com a fração acetato de etila das folhas de *D. ambrosioides* nas concentrações 0.5, 1.0, 5.0 mg/kg. Os joelhos dos animais foram medidos com fita métrica no dia 0 e dias alternados do 1 ao 43 dia. **A) Circunferência do joelho:** Os dados obtidos foram convertidos em delta (valor do dia x - valor do dia 0). **B) AUC de OA:** Área sob a curva do desenvolvimento de OA. As análises estatísticas foram por teste t e ANOVA, seguido pelo teste de Dunnet, para valores significativos de \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo Controle.

### Avaliação locomotora em animais com OA

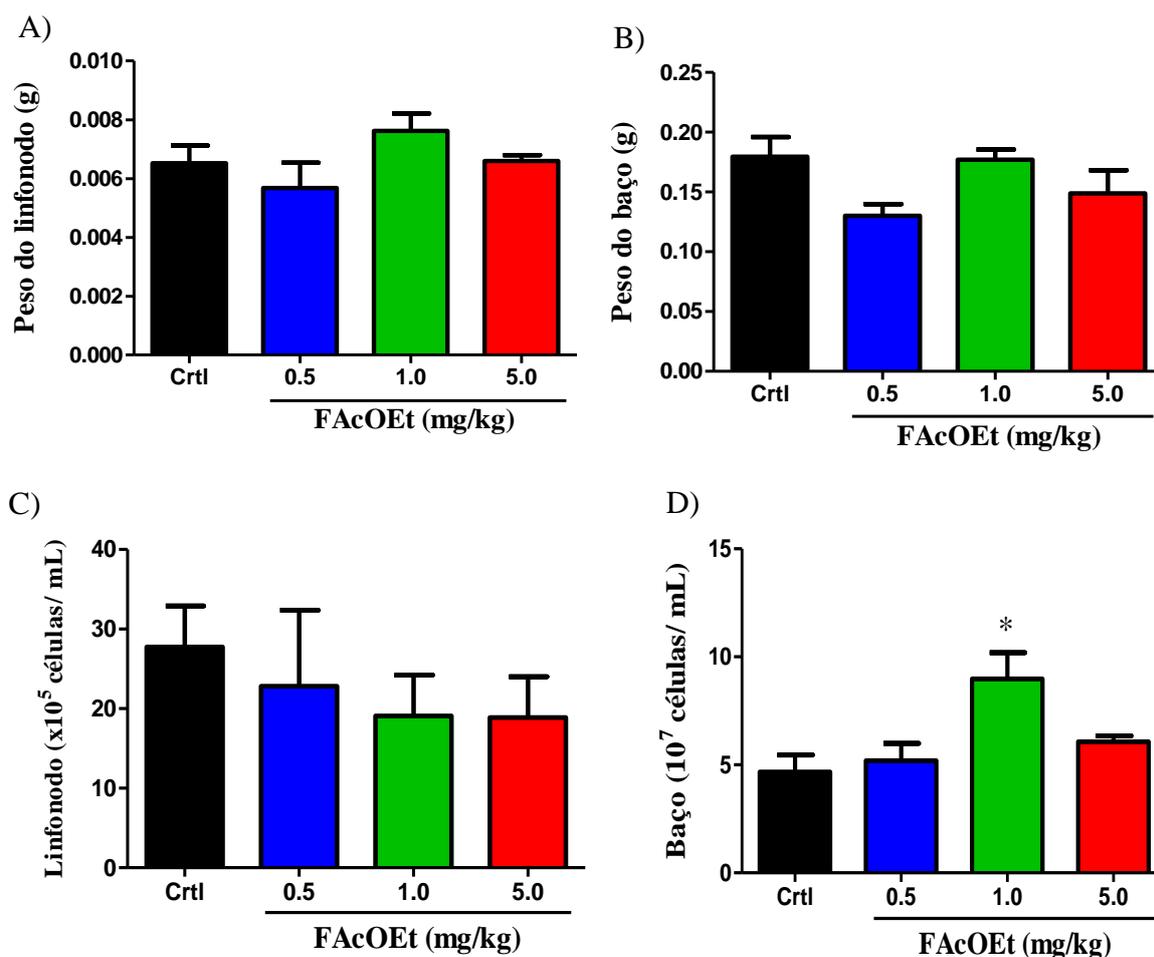
Não foram observadas diferenças significativas dos grupos terapêuticos FAcOEt 0.5 e FAcOEt 1.0 em relação ao grupo Controle referentes aos dias de avaliação da atividade locomotora (Figura 3A), assim como na análise de área sob a curva (Figura 2B). Contudo, foi observado diferença estatística do grupo FAcOEt 5.0 quando comparado ao grupo Controle nos dias 23, 33 e 43 (Figura 3A), sendo mais expressa na análise da área sob a curva (Figura 3B).



**Figura 3: Avaliação locomotora de animais em modelo experimental de OA em camundongos tratados com FAcOEt de *D. ambrosioides*.** Os animais receberam injeção de monoiodoacetato de sódio na dose de 8mg/kg no ligamento patelar do joelho direito. O grupo Controle foi administrado de PBS, enquanto os grupos: FAcOEt 0.5 e FAcOEt 1.0 e FAcOEt 5.0 foram tratados com a fração acetato de etila das folhas de *D. ambrosioides* nas concentrações 0.5, 1.0, 5.0 mg/kg. Os animais foram avaliados no dia 0 e dias alternados do 1 ao 43 dia. **A) Avaliação Locomotora:** Os dados foram expressos em tempo/estímulos. **B) AUC de AvL:** área sob a curva da avaliação locomotora por medição do tempo médio/estímulo. As análises estatísticas foram por teste t e ANOVA, seguido pelo teste de Dunnet, para valores significativos de  $*p < 0,05$  em comparação ao grupo Controle.

### Análise de peso e celularidade dos órgãos linfóides

Na avaliação do peso dos órgãos linfóides foi observado que não houve diferença estatística dos grupos terapêuticos em relação ao grupo Controle. Em relação a celularidade, apenas o grupo FAcOEt 1.0 apresentou aumento no número de células esplênicas (figura 3D).



**Figura 4: Avaliação do peso e celularidade dos órgãos linfóides.** Os animais receberam injeção de monoiodoacetato de sódio na dose de 8mg/kg no ligamento patelar do joelho direito. O grupo Controle foi administrado de PBS 1x, enquanto os grupos: FAcOEt 0.5 e FAcOEt 1.0 e FAcOEt 5.0 foram tratados com a fração acetato de etila das folhas de *D. ambrosioides* nas concentrações 0.5, 1.0, 5.0 mg/kg. No 43º dia os órgãos linfóides, linfonodo e baço, foram coletados, pesados e macerados em PBS 1x em 1ml ou 3ml respectivamente. O linfonodo e o baço foram macerados em 1 ml e 3 ml de PBS 1x respectivamente. **A) Peso do Linfonodo. B) Celularidade do Linfonodo C) Peso do baço, D) Celularidade do baço.** As linhas verticais indicam a média  $\pm$  erro padrão das médias. As análises estatísticas foram por teste t e ANOVA, seguido pelo teste de Dunnet, para valores significativos de  $*p < 0,05$  em comparação ao grupo Controle.

## DISCUSSÃO

A padronização do modelo experimental de OA em camundongo permitiu que novos estudos fossem realizados na busca por tratamentos alternativos dessa doença. Este atual estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento da FAcOEt do EBH das folhas de *D. ambrosioides* em diferentes concentrações sobre o desenvolvimento e progressão da inflamação articular e na qualidade de locomoção, bem como em aspectos imunológicos (avaliação de órgãos linfóides).

Avaliando o desenvolvimento da OA foi observado que os grupo FAcOEt 0.5 e FAcOEt 1.0 não demonstraram diferença estatística quando comparado ao grupo Controle em nenhum dos dias mensurados. Entretanto, o grupo FAcOEt 5.0 apresentou inibição do desenvolvimento da inflamação com diferença significativa nos dias 23, 33 e 43. Na análise histopatológica do estudo de padronização de OA foi observado a presença de infiltrado celular nos animais com injeção de MIA (grupo controle neste trabalho)<sup>7</sup>, segundo Pereira<sup>20</sup> (2014), o EBH de *D. ambrosioides* inibe a migração de neutrófilos e macrófagos/monócitos para o sítio inflamatório em modelo de artrite experimental, que simula a artrite reumatoide humano. Provavelmente este efeito esteja associado com a presença de compostos fitoquímicos como flavonoides e terpenos que são importantes metabólitos anti-inflamatórios<sup>8,30</sup>. Os mesmos compostos bioativos podem ser encontrados na FAcOEt uma vez que esta apresenta características polares similares ao EBH o que justificaria a considerável regressão da inflamação articular (dados ainda não publicados).

A limitação funcional da articulação impacta diretamente a qualidade de vida em pacientes acometidos com OA<sup>24</sup>. Com base nisso, buscou-se um modelo que pudesse simular a dificuldade de locomoção vertical de humanos, então a proposta do uso de subida em escada possibilitou realizar a avaliação de locomoção, onde foi observado que o grupo FAcEt 5.0 apresentou melhora quando comparado ao grupo Controle e ausência de diferenças estatísticas para grupos FAcEt 0.5 e FAcEt 1.0. Segundo Moraes<sup>18</sup> (2011), o metabólito flavonoides tem importante ação na redução de TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub>, mediadores nos quais gera resposta pró-inflamatórias, assim sendo um composto com características polares, possivelmente deve-se fazer presente na fração acetato de etila. Além disso, a presença do ascaridol, marcador para esta espécie, tem sido descrito pela sua atividade anti-inflamatória e ainda antinociceptiva<sup>2</sup>, fazendo com que haja diminuição da dor nos

animais durante o exercício de subida de escada. Ainda, segundo Calado<sup>2</sup> et al (2015), animais tratados com o EBH na dose de 5mg/kg apresentaram um aumento na habilidade de locomoção; de semelhante modo foi observado uma evidente melhora na locomoção dos animais tratados com FAcOEt 5.0.

Na avaliação do peso e celularidade dos órgãos linfóides não houve diferença significativa entre os grupos terapêuticos FAcOEt 0.5 e FAcOEt 5.0 em relação ao Controle. Contudo, foi observado um aumento estatisticamente significativo no número de células esplênicas do grupo FAcOEt 1.0 em comparação ao grupo Controle. Possivelmente, a FAcOEt 1.0 desempenhe uma atividade imunoestimulatória em órgãos linfóides secundários, principalmente baço, promovendo proliferação celular e manutenção da migração celular de órgãos drenantes para o foco inflamatório, simulando uma resposta natural tal como observado em indivíduos com OA. Esse aumento para a dose de 1mg/kg corrobora com o efeito imunoestimulador já descrito para essa espécie vegetal por Cruz<sup>8</sup> et al (2007).

O aumento de células no foco inflamatório, sinóvia, promove um *panus*, invasivo, de rápido crescimento, composto principalmente de linfócitos T e B, e células da imunidade inata como macrófagos, neutrófilos, mastócitos e células dendríticas. Estas células produzem citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas<sup>18</sup>, que ativam mais células inflamatórias e condrócitos, e liberam enzimas proteolíticas, que degradam a cartilagem e logo depois o osso, resultando, por fim, em erosões e destruição articular<sup>1</sup>, algo semelhante foi observado por Costa<sup>7</sup> et al (2017) na avaliação histopatológica, cujo o foco inflamatório foi constituído predominantemente de neutrófilos, estando de acordo com Cascão<sup>4</sup> et al (2010), que relata que os neutrófilos são fagócitos profissionais, sendo capazes não apenas de destruir patógenos bem como tecidos.

Levando em consideração os dados obtidos, é de extrema importância o reconhecimento do potencial da fração em diferentes doses frente ao tratamento de determinada enfermidade, uma vez que isso parece influenciar diretamente no padrão de resposta. Com base nisso, fica evidente que a dose de 5mg/kg da fração acetato de etila age diretamente no desenvolvimento da AO, melhorando a habilidade locomotora.

## CONCLUSÃO

A fração acetato de etila das folhas de *D. ambrosioides* na dose de 5 mg/kg foi eficaz em inibir o quadro de desenvolvimento e progressão de OA e melhora na qualidade de locomoção em modelo experimental em camundongos *Swiss*.

**REFERÊNCIAS**

1. Andreoli, T. E., Carpenter, C. C. J., Benett, J. C., Plum, F. Medicina Interna Básica. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
2. Calado GP, Lopes AJO, Junior LMC, Lima FCA, Silva LAS, Pereira WS, Amaral FMM Garcia JBS, Cartágenes MSS, Nascimento FRF. *Chenopodium ambrosioides* L. Reduces Synovial Inflammation and Pain in Experimental Osteoarthritis. *Plos One*, [s.l.], v. 10, n. 11, p.1-20, 2 nov. 2015.
3. Camanho, G. L. Tratamento de Osteoartrose de Joelho. *Revista Brasileira de Ortopedia* v. 36, p. 135-140, 2001.
4. Cascão, R., Rosário, H.S., Souto-Carneiro, M.M., Fonseca, J.E., 2010. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmunity Reviews*. 9, 531-535.
5. Christiansen, B. A. et al. Management of Osteoarthritis with Avocado/Soybean Unsaponifiables. *Cartilage*, [s.l.], v. 6, n. 1, p.30-44,. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1947603514554992>, 29 out. 2014
6. Coelho, SBF. Efeito da fração acetato de etila de *Chenopodium ambrosioides* l. Sobre a ativação e marcadores imunológicos em macrófagos da linhagem raw 264.7. Tese (monografia), Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2017.
7. Costa AAC, Oliveira JR, Guerra RNM, Nascimento FRF, Pereira WS. Padronização do modelo experimental de osteoartrite em camundongos *Swiss* [em submissão], 2018.
8. Cruz GV, Pereira PV, Patrício FJ, Costa GC, Sousa SM, Frazão JB, Aragão-Filho WC, Maciel MC, Silva LA, Amaral FM, Barroqueiro ES, Guerra RN, Nascimento FR. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. *Journal of Etlmopharmacology*.111, 148-154, 2007.
9. Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, Fox A, Rediske J, Pellas T, Kidd B, Bevan S, Winter J. Pain related behavior in two models of osteoarthritis in rat knee. *Pain*, v. 112, p. 83-93, 2004.
10. Garden, MOBOT-Missouri Botanical. Disponível em: <http://www.tropicos.org>.v. 3, 2017.
11. Goldring, M. B. The Role of the Chondrocyte in Osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, v. 43, n. 9, p. 1916–1926, 2000.

12. Goldring, M.B.; Otero, M. inflamação na osteoartrite. *Current Opinion in Rheumatology*.; vol 23. (5) : 471-478, 2011.
13. Guermazi, A.; Osteoarthritis year in review 2011: imaging. *V. 19*, 2011.
14. Kalbhen DA, Blum U. Theoretisches Konzept und experimentell Bestätigung für ein neues Arthrose-Modell am Versuchstier. *Arzneimittelforschung*.;27(3):527–531, 1977.
15. Komatsu, N., Takayanagi, H. Inflammation and bone destruction in arthritis: synergistic activity of immune and mesenchymal cells in joints. *Frontiers in immunology*. 3, 1-11, 2012
16. Lorenzi, H.; Matos, F J A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2002.
17. Mascarin, Lucas Zanon et al. Padronização do modelo de incapacitação articular induzida por monoiodoacetato de sódio para estudo pré-clínico da osteoartrite. 2015.
18. Moraes WP. Caracterização do mecanismo de ação antiinflamatória do flavonóide BAS1 isolado da planta *Brosimum acutifolium*. Tese Doutorado. Belém: Universidade Federal do Pará; 2011.
19. Neiva VA, Ribeiro MNS, Cartádenes MSS, Coutinho DFM, Nascimento FRF, Reis ASR, Amaral FMM. 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.
20. Pereira, W. S. Efeito do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* sobre processos inflamatórios e o desenvolvimento da artrite experimental. 2014. 132 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
21. 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.
22. Pinheiro NVF, Araujo BMA, Guerra PC, Borges ACR. Efeitos do cataplasma das folhas de mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) na reparação de tecidos moles e ósseo em rádio de coelhos. *J Bras Fitomed*.; 3(2): 62–66, 2005.

23. Prajapati N, Purohit SS, Sharma AK, Kumar TA. Hand Book of Medicinal plants: A Complete Source Book. Jodhpur:Agrobios publishers, 2003.
24. Silva A, Andersen ML, Tufik S. Sleep pattern in an experimental model of osteoarthritis. *Pain*, v. 140. p. 446-455, 2008.
25. 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.
26. Sousa, L.H.A et al. Avaliação da ação analgésica do extrato hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* L. em ensaios pré-clínicos. *Rev Ciênc Saude*. 2012.
27. Trivellato-grassi, L.; Malheiros, A.; Meyre-silva, C.; Buss, ZS.; Monguilhott, ED.; Fröde TS.; et al. From Popular Use to Pharmacological Validation: a Study of the Anti-Inflammatory, Anti-Nociceptive and Healing Effects of *Chenopodium ambrosioides* Extract. *J Ethnopharmacol*; (145): 127–138, 2013.
28. Vasconcellos, KSS, Dias, JMD, Dias RC. Dificuldades funcionais em mulheres obesas com osteoartrite de joelhos: relação entre percepção subjetiva e desempenho motor. *Fisioterapia e Pesquisa*.;14:55-61, 2007.
29. Woo YJ, Joo YB, Jung YO, Ju JH, Cho ML. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Experimental And Molecular Medicine*, [s.l.], v. 43, n. 10, p.561-570, 2011.
30. ZHU, W. X. et al. Evaluation of Essential Oil and its Three Main Active Ingredients of Chinese *Chenopodium ambrosioides* (Family: Chenopodiaceae) against *Blattella germanica*. *Journal Of Arthropod-borne Disease*. Beijing, China, p. 90-97. set. 2011. Disponível em: <<http://jad.tums.ac.ir>>. Acesso em: 09 ago. 2016.

## CONCLUSÃO GERAL

A injeção MIA demonstrou-se eficaz na indução de OA experimental caracterizando-o como modelo inflamatório crônico capaz de promover alterações fisiológicas locais, locomotoras e comportamentais em camundongos *Swiss*.

A fração acetato de etila do EBH de *D. ambrosioides* na dose de 5 mg/kg foi eficaz em reverter o quadro clínico dessas alterações promovidas pelo padrão do modelo experimental.

## REFERÊNCIAS

1. Abolhassanzadeh Z, Aflaki E, Yousefi G, Mohagheghzadeh A. Randomized Clinical Trial of Peganum Oil for Knee Osteoarthritis. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, DOI: 10.1177/2156587214566867 November 17, 2014.
2. Arden N, Nevitt MC. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol.*; 20:3-25, 2006.
3. Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feurstein GF. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  - Mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke*, 1997; 28:1233-44
4. Barroquiro RSB. Qualidade de vida, stress e sua correlação com parâmetros bioquímicos e imunológicos na saliva. Dissertação (doutorado), Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2017.
5. Calado GP, Lopes AJO, Junior LMC, Lima FCA, Silva LAS, Pereira WS, Amaral FMM, Garcia JBS, Cartágenes MSS, Nascimento FRF. *Chenopodium ambrosioides* L. Reduces Synovial Inflammation and Pain in Experimental Osteoarthritis. *Plos One*, [s.l.], v. 10, n. 11, p.1-20, 2 nov.. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0141886>. 2015.
6. Chevallier A. *The encyclopedia of medicinal plants*. New York: A D K Publishing Book, 1996.
7. Clark WM. Cytokines and reperfusion injury. *Neurology.*;49 (supl. 4):S10-S14, 1997.
8. Coimbra BI, Pastor EH, Greve JMD, Puccineli MLC, Fuller R, Cavalcanti FS. Brazilian consensus for the treatment of osteoarthritis. *Rev. Bras. Reumatol.* V. 42, 2002.
9. Cross M, Smith E, Hoy D, Nolte S, Ackerman I, Fransen M, Bridgett L, Williams S, Guillemin F, Hill CL, Laslett LL, Jones G, Cicuttini F, Osborne R, Vos T, Buchbinder R, Woolf A, March L. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, England, v. 73, n. 7, p.1323–1330, 2014
10. Delespaul Q, De Billerbeck VG, Roques CG, Michel G. The antifungal activity of oils as determinate by different screening methods. *J Essent Oil Res*; (12): 256-266, 2000.

11. Felson DT. An update on the pathogenesis and epidemiology of osteoarthritis. *Radiologic Clinics Of North America*, [s.l.], v. 42, n. 1, p.1-9, jan. 2004.
12. Hamamura K, Nishimura A, T II NO, Takigawa S, Sudo A, Yokota H. Chondroprotective effects of Salubrinal in a mouse model of osteoarthritis, *Bone Joint Res* vol. 4, no. 5, doi: 10.1302/2046-3758.45. 2000378, may 2015.
13. Hunter DJ, Eckstein F. Exercise and osteoarthritis. *Journal Of Anatomy*, [s.l.], v. 214, n. 2, p.197-207. Wiley-Blackwell, fev. 2009.
14. Jialal I, Devraj S, Venogopal SK. Oxidative stress, inflammation, and diabetic vasculopathies:the role of alpha tocopherol therapy. *Free Radic Res*, 2002.
15. Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage*;13:632–641, 2005.
16. Kim JS, Ellman MB, Yan D, AN HS, KC R, Li X, et al. Lactoferricin mediates anti-inflammatory and anti-catabolic effects via inhibition of IL-1 and LPS activity in the intervertebral disc. *J Cell Physiol*;228:1884–96, 2013.
17. 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 And Cartilage*, [s.l.], v. 23, n. 8, p.1233-1241, ago. 2015.
18. Kumar R, Mishra AK, Dubey NK, Tripathi YB. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxicogenic and antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology*, V. 115, p. 159–164, 2007.
19. Lall N, Meyer JJM. In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. *J Ethnopharmacol*; (66): 347-354, 1999
20. Li X, Dong Z, Zhang F, Dong J, Zhang Y. Vitamin E slows down the progression of osteoarthritis (Review). *Experimental and therapeutic medicine* 12: 18-22, 2016.
21. Lorenzi, H.; Matos, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 542p, 2002.
22. Macdonald D. Ascaridole less infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain a nematocide that is not toxic to mammalian smooth muscle. *J Ethnopharmacol* (92): 215-221, 2004.
23. Messier SP, Mihalko SL, Beavers DP, Nicklas BJ, Devita P, Carr JJ, Hunter DJ, Williamson JD, Bennell KL, Guermazi A, Lyles, Loeser RF. Strength Training for

- arthritis Trial (START): design and rationale. *BMC Musculoskelet Disord.* Vol. 14. Núm. 208. 2013.
24. Monzote L, García M, pastor J, Gil L, Scull R, Maes L, et al. Essential Oil from *Chenopodium ambrosioides* and Main Components: Activity Against Leishmania, their Mitochondria and other Microorganisms. *Exp Parasitol*; (136): 20-26, 2014.
  25. Nascimento FRF, Cruz GV, Pereira PV, Maciel M C, Silva LA, Azevedo AP, et al. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. Treatment. *Life Sciences* (22): 2650–2653, 2006.
  26. Nagashima H, Suzuki M, Araki S, Yamabe T. Preliminary assessment of the safety and efficacy of tanezumab in Japanese patients with moderate to severe osteoarthritis of the knee: a randomized, double-blind, dose-escalation, placebo-controlled study. *Osteoarthritis and cartilage*, v. 19, 2011.
  27. Ogbonna AC, Clark AK, Malcangio M. Development of monosodium acetate-induced osteoarthritis and inflammatory pain in ageing mice. *Age*, [s.l.], v. 37, n. 3, p.37-54, 4 maio 2015.
  28. Patrício FJ, Costa GC, Pereira PV, Aragão-Filho WC, Sousa SM, Frazão JB, et al. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. *J Ethnopharmacol*; (115): 313–319, 2008.
  29. Pereira D, Peleteiro B, Araújo J, Branco J, Santos RA, Ramos E. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 19, p. 1270-1285, 2011.
  30. Pereira W S. Avaliação do efeito do extrato bruto hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* sobre o desenvolvimento da artrite experimental [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro: Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ; 2014.
  31. Rätsepsoo M, Gapeyeva H, Sökk J, Ereline J, Haviko T, Pääsuke M. Leg extensor muscle strength, postural stability, and fear of falling after a 2-month home exercise program in women with severe knee joint osteoarthritis. *Medicina. KAUNAS.* Vol. 8. Núm. 49. P.347-353. 2013.
  32. RENISUS, BRASIL. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>. Acesso em 23 de Janeiro de 2018.
  33. Sharma L, Kapoor D, Issa S. Epidemiology of osteoarthritis: an update *Current Opinion in Rheumatology.*, vol. 18, n. 2, p. 147-156, Mar. 2006.

34. 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.
35. Sousa LHA, Rios CEP, Assunção AKM, Fialho EMS, Costa GC, Nascimento FRF. Avaliação da ação analgésica do extrato hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* L. em ensaios pré-clínicos. Rev Ciênc Saude.; 14 (1), 2012.
36. Taufner CF, Ferraço EB, Ribeiro LF. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Teresa e Marilândia, ES3. 2006.
37. Tonet AC; Nóbrega OT. Imunossenescência: a relação entre leucócitos, citocinas e doenças crônicas. Rev. Bras. Geriatr. Gerontol, , 11: 259-273, 2008.
38. Tropicos [internet]. Available from: <http://tropicos.org/Name/50215991>. Acesso em 23 de Janeiro de 2018.
39. Trivellato-Grassi L, Malheiros A, Meyre-Silva C, Buss ZS, Monguilhott ED, Fröde TS, et al. From Popular Use to Pharmacological Validation: a Study of the Anti-Inflammatory, Anti-Nociceptive and Healing Effects of *Chenopodium ambrosioides* Extract. J Ethnopharmacol; (145): 127–138, 2013.
40. Verbruggen G, Huart C, Desuter G. The use of adalimumab for cricoarytenoid arthritis in ankylosing spondylitis—an effective therapy. V. 121, P. 335- 338, 2011.
41. Wilder-Smith OHG. Opioid user in the elderly. Eur. J. Pain. 9, p. 137 – 140, 2005.
42. World Health Organization (WHO) [internet].<http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>. Acesso em 04 de Novembro de 2017.

\*Autor de correspondência: Arthur André Castro da Costa E-mail: [arthur.andre07@outlook.com](mailto:arthur.andre07@outlook.com)

## ANEXO

### NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

A Revista de Ciências da Saúde (RCS) tem por finalidade publicar em caráter prioritário trabalhos científicos, desenvolvidos por pesquisadores, docentes de graduação e pós-graduação, alunos ligados aos departamentos que integram o Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Destina-se também à publicação de artigos de interesse para as Ciências da Saúde, desenvolvidos em outros departamentos da UFMA ou de outras instituições de ensino e pesquisa.

#### 1 CLASSIFICAÇÃO DOS ARTIGOS

Os artigos devem enquadrar-se nas seguintes categorias:

- a) artigos científicos de natureza clínica ou experimental, contendo informações novas ou relevantes;
- b) artigos de revisões com síntese e interdisciplinaridade dos conhecimentos abordados, com análise crítica do material bibliográfico pesquisado;
- c) caso clínico com relatos e uso de novos métodos;
- d) carta ao editor com críticas, consultas ou sugestões de artigos publicados;
- e) editoriais.

#### 2 NORMAS GERAIS

- a) não serão aceitos trabalhos já publicados ou submetidos simultaneamente à apreciação por parte de outros periódicos ou quaisquer outras publicações;
- b) os trabalhos serão analisados por membros da Comissão Editorial ou por consultores especializados no assunto e somente serão aceitos após o parecer dos mesmos, podendo sofrer correções ou modificações para adequação às normas após prévia consulta;
- c) em cada edição serão selecionados no mínimo 5 (cinco) e no máximo 10 (doze) trabalhos. Os não selecionados serão apreciados por ocasião das edições seguintes. Decorridos um ano sem que tenham sido selecionados, serão devolvidos aos autores com justificativa do editor;
- d) os conceitos emitidos nos trabalhos serão de responsabilidade integral dos autores;

- e) à RCS reservam-se todos os direitos autorais dos trabalhos publicados, permitindo entretanto a sua posterior reprodução como transcrição, com devida citação da fonte;
- f) cada autor de correspondência terá direito a 02 (dois) volumes, podendo solicitar quantidade maior, sendo-lhe levado a débito o respectivo acréscimo.

### 3 APRESENTAÇÃO DOS ORIGINAIS

a) os trabalhos deverão ser apresentados no Word, digitados em fonte Times New Roman corpo 12, com espaço duplo e margem de 3 cm de cada lado, em tamanho A4, sem qualquer outro tipo de formatação, a não ser:

- indicação de caracteres (negrito e itálico) para ressaltar termos ou nomes específicos;
- recuo de 1 cm no início do parágrafo;
- deve-se colocar entre aspas as citações diretas, ou seja, idênticas ao original. Quanto às citações com mais de três linhas, dá-se um recuo de parágrafo de 2 cm, com fonte corpo 10;
- uso de aspas (não usar caixa alta);
- os textos não devem exceder 15 laudas. - texto (incluindo tabelas e quadros). Esquemas, figuras, fotos e ilustrações devem ser submetidos em arquivo separado no Power Point;
- a publicação de imagens em cores será custeada pelo(s) autor(es) interessado(s), que deve(m) expressar seu interesse no momento da submissão do artigo;

#### b) Redação

Os originais deverão ser redigidos em português, de acordo com a norma culta do idioma nos seus aspectos morfológicos e sintéticos;

c) A página de rosto deverá conter as informações na seguinte ordem:

- título em português;
- título em inglês;
- nome(s) do(s) autor(es);
- título, vínculos e filiações em notas de rodapé;
- resumo indicativo ou informativo em português com tradução em inglês logo abaixo, acompanhado dos descritores que identifiquem o conteúdo e sua versão para o inglês. Deve ser disposto em apenas um único parágrafo, usando o verbo na voz ativa e na terceira pessoa do singular. Contendo no máximo 250 palavras.

d) Ordem dos elementos que constituem o texto:

- Título no primeiro idioma;
  - Título no segundo idioma;
  - Nome (s) do(s) autor(es);
  - Resumo em português;
  - Descritores em português;
  - Resumo em inglês;
  - Descritores em inglês;
  - Introdução;
  - Material e métodos;
  - Resultados;
  - Discussão;
  - Conclusão (ões);
  - Agradecimentos (aos órgãos de fomento, quando houver);
  - Referências;
  - Autor para correspondência (nome e email). O mesmo deverá ser indicado por um asterisco na lista de autores;
- e) As ilustrações (desenhos, gráficos, fotografias, plantas, mapas entre outras) são consideradas figuras e devem ser limitadas ao mínimo indispensável. Devem ser apresentadas com legendas numeradas em sequência, com algarismos arábicos precedidos do nome Figura, logo abaixo da figura a que se refere. As fotografias deverão ser em preto e branco. Caso o autor deseje que as mesmas sejam coloridas, arcará com a despesa da impressão colorida;
- f) As tabelas e os quadros devem ser numerados consecutivamente em algarismo arábico, com o respectivo título, acima do quadro e ou tabela a que se refere;
- g) Os nomes de medicamentos e materiais registrados, produtos comerciais, devem aparecer em notas de rodapé (indicadas por asterisco ou números arábicos e restritos ao indispensável). O texto deve conter somente nome genérico.

#### 4 CITAÇÕES E SISTEMAS DE CHAMADAS

Sempre que for mencionada uma citação bibliográfica no texto, indica-se a fonte consultada. Para efeito de padronização, recomenda-se a citação pelo sobre nome do autor, o número da referência sobrescrito, seguido da data de publicação, a saber:

a) quando o nome do autor não estiver incluído na sentença, indica-se no final da frase o(s) número(s) correspondente(s) ao(s) autor(es).

Ex.: Estudos com ressonância magnética demonstram várias mudanças na articulação temporomandibular antes desconhecidas<sup>18</sup>.

b) quando o nome do autor fizer parte da sentença, somente a data e a página consultada aparecem entre parênteses. Ex.: Silva<sup>18</sup> (2000) citaram que “estudos com ressonância magnética demonstram várias mudanças [...]” Silva<sup>19</sup> (2000) afirmaram que os estudos com RM demonstram várias mudanças [...].

c) trabalhos de um mesmo autor, de um mesmo ano, acrescentam-se à data, letras minúsculas do alfabeto latino sem espaçamento. Ex.: Para Silva<sup>18</sup> (2000a) estudos com ressonância magnética demonstram várias mudanças [...]. Silva<sup>29</sup> (2000b) citou que estudos com ressonância magnética demonstram várias mudanças [...].

d) quando houver coincidência de autores com o mesmo sobrenome e mesma data, acrescentam-se as iniciais de seus prénomes. Ex.: Para Silva<sup>18</sup>, L. (2000) estudos com ressonância magnética demonstram várias mudanças [...]. Silva<sup>19</sup>, M. (2000) citou que estudos com ressonância magnética demonstram várias mudanças [...].

e) quando o trabalho pertencer a dois autores, indica-se o sobrenome dos dois autores, separados por uma vírgula, seguido do ano.

#### Autor incluído na sentença

De acordo com Kreiborg e Cohen<sup>9</sup> (1992), os fenômenos mais pronunciados antes da [...].

f) quando o autor não for incluído na sentença. Ex.: Os fenômenos mais pronunciados antes da terapia são [...]<sup>9</sup> (mesmo que item 4, letra a).

g) quando forem mais de dois autores, indica-se o sobrenome do primeiro, seguido da expressão latina et al., e o ano. Ex.: De acordo com Abreu<sup>1</sup> et al. (1990), os fenômenos mais pronunciados antes da [...].

h) Quando se tratar de publicações diferentes, indica-se o sobrenome dos autores e o ano.

Autores incluídos na sentença:

Ex.: Abreu<sup>1</sup> et al. (1990), Kreiborg e Cohen<sup>9</sup> (1992) e Silva<sup>18</sup> (2000) afirmaram que os fenômenos mais pronunciados antes da [...]

Autores não incluídos na sentença:

Ex.: Alguns estudos<sup>1,9,18</sup> têm investigado os fenômenos mais pronunciados antes da [...].

i) nos trabalhos publicados por entidades coletivas deve ser mencionada a fonte, entre parênteses, no final da citação.

Ex: Sistema Educacional Brasileiro obedece a normas e metas consultivas (BRASIL<sup>3</sup>,1990).

j) citado por outros autores (apud) Abreu et al. (1990 apud Cohen<sup>9</sup>, 1992) afirmaram que um determinado grau de respostas [...].

OBS: Este recurso, no entanto, deve ser evita o ao máximo. Recomenda-se sempre a busca pelo artigo original.

## 5 REFERÊNCIAS

As referências devem ser elaboradas obedecendo ao disposto no Estilo Vancouver. Todo autor citado deve constar em lista chamada REFERÊNCIAS, devendo ser ordenados alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor ou pela primeira palavra do título (quando sem autoria), antecedido de numeração progressiva. Os títulos de periódicos devem ser abreviados de acordo com o PubMed e impressos sem negrito, itálico ou grifo, não devendo ser pontuados e tendo a mesma apresentação em todas as referências. Nas publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis autores, cita-se os seis primeiros autores seguido da expressão latina et al. Comunicações pessoais, trabalhos em andamento e os não publicados não devem ser incluídos na lista de referências, mas citados em notas de rodapé.

### 5.1 Exemplos

#### a) Livros

Livro com um autor

Madeira MC. Anatomia da face. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Sarvier; 1997.

#### Livros com dois autores

Stock CJR, Nehammer CF. Endodontia na prática clínica. 3ª ed. São Paulo: Pancast; 1994.

Livro com até seis autores, citam-se todos. Acima de seis autores, cite os seis primeiros seguido da expressão et al.

#### Livro em suporte eletrônico

Braselli A. Toxoplasmose. [monografia online]. [citado 2003 jan 30]. Disponível em: URL: <http://www.infecto.edu.uy>

Ueki N, Higashino K, Ortiz-Hidalgo CM. Histopathology [monografia em CD-ROM]. Houston: Addison Books; 1998. [citado 2002 fev27]. Disponível em: URL: <http://www.hist.com/dentistry>

#### Capítulo de livro

Puricelli E. Retenção dentária. In: Gonçalves EAN, Feller C. Atualização dentária na clínica odontológica. São Paulo: Artes Médicas; 1998. p. 3-28.

#### Capítulo de livro em suporte eletrônico

Wada CS. Determinações bioquímicas. In: Moura RA, Wada CS, Purchio A, Almeida TV. Técnicas de laboratório [monografia on-line]. São Paulo: Atheneu; 1998. [citado 1999 maio 27]. Disponível em: URL: <http://www.sinuses.com/post surg.htm>

#### b) Artigo de periódico

##### Com um autor

Varella JAF. Fatores biológicos no preparo da cavidade. Rev Assoc Paul Cir Dent 1961; 15(3): 149-154.

##### Com dois autores

Jürgensen CA, Jürgensen LD. Passivação do cobre, alternativa para obtenção da condição de anaerobiose. Rev Brás Pat Clin 1982; 18(3):58-63.

Com mais de seis autores

Zoitopoulos L, Brailsford SR, Gelbier S, Ludford RW, Marchant SH, Beighton D, et al. Dental caries and caries-associated microorganisms in the saliva and plaque of 3 and 4-year-old afro-caribbean and caucasian children in south London. *Arch Oral Biol* 1997; 41(11):1011-1018.

Em suporte eletrônico

Szwarcwald C, Barbosa Jr A, Fonseca MGR. Estimativa do número de crianças (0 a 4 anos) infectadas pelo HIV. Brasil. 2000. [citado 2002 mar 12]. Disponível em: URL <http://www.aids.gov.br/fnal/artigo.htm>.

Resumo

Varella JAF. Fatores biológicos no preparo da cavidade [resumo]. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 1961; 15(3): 149.

Sem indicação de autor

The residual caries dilemma. *Comm Dent Oral Epidemiol* 1999; 22(2):439-441.

Volume com suplemento

Basting RT, Serra MC, Paulillo LAMS. Preparos de cavidades na era da dentística restauradora. *Rev ABO Nac* 2000; 8 Suple 1:176-181.

Fascículo sem indicação de volume

Jürgensen CA, Jürgensen LD. Passivação do cobre, alternativa para obtenção da condição de anaerobiose. *Rev Brás Pat Clin* 1982; (3):58-63.

Sem indicação de volume ou fascículo

Jürgensen CA, Jürgensen LD. Passivação do cobre, alternativa para obtenção da condição de anaerobiose. *Rev Brás Pat Clin* 1982:58-63.

Artigo citados por outros autores (apud)

Hellwig E. Clinical evaluation of chemomechanical caries removal in primary molars and its acceptance by patients (2001) apud Maragakis GM, Hahn P, Hellwig E Caries Res Sept 2001; 35(3):205-210.

c) Dissertações e teses

Alves CMC. Análise morfométrica dos melanossomos presentes no interior do queratinócito na gengiva normal e inflamada em humanos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1996.

Em suporte eletrônico

Azevedo VMNN. Avaliação clínica de pacientes portadores de lesões dentárias cervicais não cariosas relacionadas com alguns aspectos físicos, químicos e mecânicos da cavidade bucal [Tese em CD-ROM]. Bauru: Faculdade de Odontologia da USP; 1994.

d) Trabalhos apresentados em evento

Debortoli G. Ecoinformação: aquisição e uso da informação na preservação dos recursos naturais. In: 20º Congresso Brasileiro de Biblioteconomia, Documentação e Ciência da Informação: 2002; Fortaleza. Anais. Fortaleza: Centro de Convenção do Ceará; 2002. p. 50-65.

Em suporte eletrônico

Aun MP. Antigas nações, novas redes: as transformações do processo de construção de políticas de informação [CD-ROM]. In: 20º Congresso Brasileiro de Biblioteconomia, Documentação e Ciência da Informação: 2002; Fortaleza. Anais. Fortaleza: Centro de Convenção do Ceará; 2002. p. 90-101.

e) Leis, decretos, portarias etc.

Brasil. Lei nº 8926, de 9 de agosto de 1994. Torna obrigatória a inclusão, nas bulas de medicamentos, de advertências e recomendações sobre seu uso por pessoas de mais de 65 anos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília 1998; 126(190):19291-19292.

Brasil. Decreto-Lei n° 2481, de 3 de outubro de 1998. Dispõe sobre o gesto provisório para o médico estrangeiro em situação ilegal em território nacional, diário oficial [da] Republica Federativa do Brasil, Brasília 1998; 126(192):19292-19295.