

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado

**AÇÃO DE *Persea americana* Mill. EM MODELO
EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM RATOS**

BRENO FACUNDES BONFIM

São Luís - MA

2019

BRENO FACUNDES BONFIM

**AÇÃO DE *Persea americana* Mill. EM MODELO
EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

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

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Lilalea Gonçalves França.

São Luís - MA

2019

Bonfim, Breno Facundes.

Ação de *Persea americana* Mill. em modelo experimental de osteoartrite em ratos / Breno Facundes Bonfim. - 2019. 75 f.

Coorientador(a): Lilalea Gonçalves França.

Orientador(a): Maria do Socorro de Sousa Cartágenes.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2019.

1. Dor. 2. Osteoartrite. 3. *Persea americana*. I. de Sousa Cartágenes, Maria do Socorro. II. Gonçalves França, Lilalea. III. Título.

BRENO FACUNDES BONFIM

**AÇÃO DE *Persea americana* Mill. EM MODELO
EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Aprovada em: _____ /: _____ /: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª Maria do Socorro de Sousa Cartágenes (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^ª Dr^ª Lucilene Amorim Silva
Universidade Federal do Maranhão

Prof^ª Dr. Antonio Carlos Romão Borges
Universidade Federal do Maranhão

Prof^ª Dr^ª Elizabeth Soares Fernandes
Universidade CEUMA

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

Arthur Schopenhauer

Dedico este trabalho – e a minha vida – às pessoas mais importantes dela. Meus pais: Jackeline Silva Bonfim e Roosevelt Beserra Bonfim. Meus avós: Clovis Rodrigues da Silva e Maria Lia Araújo da Silva, João Facundes Bonfim* e Maria do Carmo Bonfim*, aos meus segundos pais Odarcir Mesquita de Sousa e Raimundo Nonato Pereira de Sousa além as pessoas que sempre cuidaram de mim sem pedir nada em troca: Rosa dos Santos da Cruz e Maria Mercedes da Silva Conceição - Cecé*, e a todas as pessoas que sonham, sonharam e que sonharão em ser cientistas e pesquisadores um dia.

* *In memoriam*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, prof. Dra. Maria do Socorro Cartágenes por, há 4 anos, acreditar e investir em mim, além de toda ajuda e auxílio nos últimos dois anos. Muito obrigado pela paciência, ensinamentos, conselhos e orientações, sempre me encorajando a ser o melhor que eu possa ser. Estimada professora, não tenho palavras para lhe dizer o quanto és luz na minha vida e na de muitos. Obrigado por tudo.

À professora Dra. Lilalea França por ser tão especial em minha vida e por ter me introduzido ao LEED. Por toda paciência, cuidado, atenção e pelos bons momentos que vivemos;

A João Vitor de Assis Tepedino, por ter estado do meu lado desde antes do início da minha graduação. Se não fosse o seu apoio, eu não estaria aqui hoje;

A Tázia Lopes de Castro por toda amizade, ajuda, momentos de trabalho e de descontração que ficarão pra sempre na minha memória. Te amo;

A todos os pesquisadores do Laboratório de Estudo Experimental em Dor (LEED) por terem estudado, discutido e dividido tantos momentos felizes nos dias de experimento e discussão científica. Sem vocês essa pesquisa não existiria;

Ao meu melhor amigo, José Daniel Rodrigues de Oliveira Filho por ter estado do meu lado durante os últimos dez anos;

Ao professor Dr. Bismarck Ascar Sauer por ter me ajudado com a avaliação histológica, ao professor Dr. Fernando César Vilhena Moreira e ao Mrs. Sebastião Vieira de Moraes por terem me ajudado com a avaliação radiológica;

À professora Dra. Claudia Quintino da Rocha por ter ajudado no desenvolvimento do projeto em todas as análises químicas do extrato vegetal;

Ao professor Dr. Raimundo Antônio Gomes Oliveira e a Professora Dra. Lucilene Amorim por terem oferecido suporte microscópico;

A todos os professores vinculados ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por toda contribuição científica; da mesma forma agradeço a coordenação do programa por todo o esforço, dedicação e contribuição à ciência e ao desenvolvimento tecnológico Brasileiro;

Aos meus colegas de turma do mestrado em ciências da saúde (2018-2020), em especial à Alana dos Santos Cardoso, Caio Fernando Ferreira Coelho, Emilly Caroline dos Santos Moraes, Iandeyara Savanna Carneiro da Silva, Nelmar de Oliveira Mendes, Pedro Felipe Rodrigues Sousa e Thamys Marinho Melo por terem sido uma fonte de ânimo durante a pós-graduação. Fico muito feliz por ter compartilhado esses dois anos ao lado de todos vocês.

A FAPEMA, CAPES e CNPq por terem fomentado pesquisas.

Sozinho eu nada sou. Mas ao lado de todos vocês podemos mudar o mundo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 Osteoartrite de joelho	21
2.2 Dor	24
2.3 Espécie vegetal: <i>Persea americana</i> Mill.....	28
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4. MÉTODOS	32
4.1 Aspectos éticos	32
4.2 Espécie Vegetal	32
4.3 Preparação do extrato vegetal	32
4.4 Caracterização química do extrato vegetal	33
4.4.1 Abordagem fitoquímica do extrato.....	33
4.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta-visível (CLAE- UV-Vis)	33
4.5 Animais.....	33
4.6 Protocolo experimental.....	34
4.7 Modelo de osteoartrite induzida por monoiodoacetato de sódio (MIA).....	36
4.8 Avaliação de Atividade Motora/Deambulação Forçada (<i>RotaRod Test</i>)	36
4.9 Quantificação de dor espontânea e avaliação da alodinia mecânica (<i>Von Frey Test</i>).....	36
4.10 Hiperalgesia Mecânica (<i>Randall Selitto Test</i>).....	37

4.11 Análises bioquímicas e hematológicas.....	38
4.12 Análise radiográfica	38
4.13 Análise histopatológica da articulação do joelho	39
4.14 Análise Estatística	39
5. RESULTADOS.....	40
5.1 Caracterização química do extrato vegetal	40
5.2 Avaliação de Atividade Motora/Deambulação Forçada (<i>RotaRod Test</i>)	43
5.3 Quantificação de dor espontânea e avaliação da alodinia mecânica (<i>Von Frey Test</i>)	45
5.4 Avaliação de Hiperalgisia Mecânica (Randall Selitto Test)	47
5.5 Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	49
5.6 Avaliação radiográfica	52
5.7 Avaliação histopatológica da articulação dos joelhos.....	56
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
ANEXO 1 – Certificado de aprovação emitido pelo CEUA.....	73
ANEXO 2 – Certificado de tombo de exsicata.....	74
ANEXO 3 – Certidão de cadastro no SISGEN	75

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AINES	Anti-inflamatórios não esteróides
ALT	Transaminase pirúvica
AST	Transaminase oxalacética
ATP	Adenosina Tri-Fosfato
CEUA	Comissão de ética em uso de animais
DRG	Gânglio da Raiz Dorsal
EHPA	Extrato Hidroetanólico de <i>Persea americana</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FIA-MS	Injeção de Fluxo
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i>
HPLC-UV	Cromatografia líquida por Espectrofotometria
IASP	International Association for the Study of Pain
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGF-2	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2
IL1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL6	Interleucina 6
IL8	Interleucina 8
LC-MS	Cromatografia líquida acoplado a Espectrofotometria de massas
LEED	Laboratório Experimental de Estudo da Dor
LNRP	Limiar nociceptivo de retirada de pata
LNRPA	Limiar nociceptivo de retirada de pata afetada

LNRPC	Limiar nociceptivo de retirada de pata contralateral
MAR	Herbário do Maranhão
MIA	Monoiodoacetato de sódio
NGF	Fator de crescimento nervoso
OA	Osteoartrite
OARSI	Sociedade Internacional para Pesquisa da Osteoartrite
PGE1	Prostaglandina E1
PGE2 α	Prostaglandina E2 alfa
PGE2	Prostaglandina E2
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
RPM	Rotações por minuto
SEM	Erro padrão das médias
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
VCM	Volume corpuscular médio

LISTA DE SIMBOLOS

cm	Centímetro
dL	Decilitros
g	Gramas
kg	Kilograma
kV	Quilovolts
L	Litros
m	Metro
mA	Miliampère
T	Toneladas
nm	Nanômetro
%	Porcentagem
mg	Miligrama
mL	Mililitro
V	Volume
UV	Ultravioleta
µm	Micrômetro
µL	Microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios de avaliação radiológica de osteoartrose.....	38
Tabela 2. Classes de metabólitos secundários presentes no extrato bruto das folhas de <i>Persea americana</i>	40
Tabela 3. Composição química do extrato hidroetanólico das folhas de <i>Persea americana</i>	42
Tabela 4. Números de células sanguíneas dos animais de ambos protocolos de tratamento.	50
Tabela 5. Dosagens bioquímicas dos animais de ambos protocolos de tratamento.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparação entre joelho em condições normais e joelho osteoartítico.	22
Figura 2. Ilustração do processo fisiológico da transmissão da dor.	27
Figura 3. Ilustração botânica de <i>Persea americana</i> Miller.....	28
Figura 4. Fluxograma do protocolo experimental.	35
Figura 5. Perfil cromatográfico obtido por HPLC-UV de alta eficiência a 254 nm do EHPA das folhas de <i>Persea americana</i>	41
Figura 6. Avaliação de atividade motora / deambulação forçada com Rotarod Test no grupo tratamento imediato.	43
Figura 7. Avaliação de atividade motora / deambulação forçada com Rotarod Test no grupo tratamento tardio.	44
Figura 8. Avaliação de sensibilidade tátil com Von Frey Test no grupo tratamento imediato.....	45
Figura 9. Avaliação de sensibilidade tátil com Von Frey Test. no grupo tratamento tardio.	46
Figura 10. Avaliação de hiperalgesia mecânica com Randall Selitto Test no grupo tratamento imediato.....	47
Figura 11. Avaliação de hiperalgesia mecânica com Randall Selitto Test no grupo tratamento tardio.	48
Figura 12. Avaliação radiográfica através do grau radiológico de osteoartrose de Kellgren e Lawrence no grupo tratamento imediato.	52
Figura 13. Radiografia do grupo tratamento imediato..	53
Figura 14. Avaliação da análise radiográfica através do grau radiológico de osteoartrose de Kellgren e Lawrence no grupo tratamento tardio.....	54
Figura 15. Radiografia do grupo tratamento tardio.....	55
Figura 16. Avaliação histopatológica de acordo com os critérios da OARSI no grupo tratamento imediato.....	56
Figura 17. Avaliação histopatológica de acordo com os critérios da OARSI no grupo tratamento tardio.	57

Figura 18. Sessões da cartilagem articular com diferentes graus de lesão cartilaginosa utilizando o escore de OARSI.	57
---	----

RESUMO

Osteoartrite é uma doença crônica degenerativa de grande impacto mundial. Aproximadamente 250 milhões de pessoas apresentam osteoartrite de joelho em todo o mundo. Dessa forma, encontrar novas formas de tratamento dessa doença é de fundamental importância. O estudo teve por objetivo avaliar os efeitos do extrato hidroetanólico das folhas de *Persea americana* Mill. em modelo experimental de osteoartrite em joelhos de ratos. Para caracterização química do extrato utilizou-se screening fitoquímico e perfil cromatográfico obtido por HPLC-UV de alta eficiência a 254 nm, identificação por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS) e análise da injeção de fluxo (FIA-MS). Utilizou-se quarenta e oito ratos machos da linhagem *Wistar* divididos em dois grupos (tratamento imediato e tardio), onde cada um desses dois grupos foram divididos em quatro subgrupos com seis animais: EHPA (500mg/kg), solução salina (0,1mL/kg), meloxicam (0,1mg/kg) e subgrupo sadio que não possuiu intervenção cirúrgica e tratamento. Para avaliação de atividade motora foi utilizado o teste de deambulação forçada, para quantificar a dor espontânea foi utilizado o teste de Von-Frey, e a resposta frente a hiperalgesia mecânica foi avaliada pelo teste de Randall Selitto. Realizou-se dosagens de marcadores bioquímicos, tais como glicemia em jejum, colesterol total, triglicerídeos, Creatinina, Ureia, Gama GT, Transaminase Oxalacética (AST) e Transaminase Piruvica (ALT), além do hemograma completo. Também foram realizadas análises histológicas da articulação do joelho utilizando os critérios da OARSI e análise radiográfica seguindo os parâmetros de grau osteoartrose de Kellgren e Lawrence. O screening fitoquímico qualitativo mostrou a presença de compostos fenólicos, alcaloides, esteroides triterpenóides, taninos e saponinas. A caracterização química por LC-MS e FIA-MS revelou a presença de taninos condensados como componentes majoritários, além de ácidos fenólicos, flavonoides agliconas, glicosilados e triterpenos. A administração do extrato na dose de 500mg/kg, via oral, melhorou a deambulação forçada, reduziu a sensibilidade tátil e mostrou atividade antinociceptiva no teste de hiperalgesia mecânica em ambos protocolos experimentais. O extrato não alterou as funções hepáticas, renais e hematopoiéticas. As análises histológicas e radiológicas mostraram que o extrato atuou como um protetor da cartilagem no processo inflamatório. Conclui-se que o extrato hidroetanólico de *Persea americana* Mill. reduziu a sensibilidade a dor devido aos efeitos antinociceptivos semelhantes ao meloxicam, droga comumente utilizada na clínica médica.

Palavras-chave: *Persea americana*; Osteoartrite; Dor.

ABSTRACT

Osteoarthritis is a worldwide degenerative chronic disease. Approximately 250 million people perform worldwide. Thus, the new forms of treatment are the disease of fundamental importance. The objective of this study was to evaluate the hydroethanolic extraction of leaves of *Persea americana* Mill in an experimental model of osteoarthritis in rat knees. Chemical characterization of the extract using phytochemical screening and high efficiency HPLC-UV array ethnography at 254 nm, identification by Mass Spectrometry Coupled Liquid Chromatography (LC-MS) and fluid flow analysis (FIA-MS). Use and control of Wistar male males divided into two groups: EHPA (500mg / kg), saline (0.1mL) / kg), meloxicam (0.1mg / kg) and control subgroup that had no intervention.) For evaluation for motor activity the forced ambulation test was used. This was to quantify the frequency the Von-Frey test was used. A response to mechanical hyperalgesia was evaluated by the Randall Selitto test. Biochemical markers such as fasting glucose, total cholesterol, triglycerides, creatinine, urea, gamma GT, oxalacetic transaminase (AST) and pyruvic transaminase (ALT) were performed. They were also histological retrospectives of the knee joint using the OARSI criteria and radiographic analysis following the Kellgren and Lawrence osteoarthritis grade parameters. Qualitative phytochemical screening shows the presence of phenolic compounds, alkaloids, triterpenoid steroids, tannins and saponins. A chemical characterization by LC-MS and FIA-MSH. A presence of condensed tannins as major components, as well as phenolic acids, aglycone, glycosylated and triterpene flavonoids. Oral administration of the extract at a dose of 500mg / kg improved the dose of 500mg / kg orally and improved antinociceptive activity in the mechanical hyperalgesia test in both experiments. The extract did not alter liver, renal and hematopoietic functions. The histological and radiological analyzes that were extracted were a protector of cartilage in the combat process. Concluding the hydroethanolic extract of *Persea americana* Mill. reduced sensitivity to blood damage to adverse effects of meloxicam, a drug commonly used in medical practice.

Key-words: *Persea americana*; Osteoarthritis; Pain.

1. INTRODUÇÃO

A dor é um mecanismo complexo que engloba elementos sensoriais e afetivos. A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define dor como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada ao dano tecidual potencial ou real” (“IASP Terminology - IASP”, 2017).

Ela é iniciada na periferia por estímulos químicos, térmicos ou mecânicos e é conduzida pelas fibras A β , A δ e C até o corno dorsal da medula espinal. Os estímulos elétricos (potenciais de ação) gerados na periferia promovem a abertura dos canais de cálcio, liberação de neurotransmissores excitatórios como glutamato e aspartato no corno dorsal da medula espinal. Após isso, a informação é transmitida e modulada até o córtex (GRIFFIN; WOOLF, 2009).

Os nociceptores são os receptores responsáveis por captar os estímulos externos transformando-os em potencial de ação. Existem três tipos de nociceptores; mecânicos, térmicos e químicos (BARROS et al., 2011) que estão distribuídos por várias partes do corpo como pele, serosas, tecidos ósseos, articulações, vasos sanguíneos, músculos, tendões e vísceras (TRANQUILLI et al., 2011).

Dados epidemiológicos mostram que a população mundial está envelhecendo em ritmo acelerado e que, conseqüentemente, as doenças crônico-degenerativas vêm ganhando demasiada importância pela prevalência crescente. Nesse grupo de doenças, encontra-se a osteoartrite (REZENDE; CAMPOS, 2013).

A osteoartrite é caracterizada pela degeneração da cartilagem e outras estruturas da articulação, incluindo o osso subcondral. É a doença articular mais prevalente, sendo que até 40% das pessoas com mais de 65 anos apresentarão degeneração do joelho ou quadril. É diagnosticada com avaliação clínica e radiográfica, sendo a dor a queixa mais frequente durante a consulta médica (REGINSTER, 2014; TAT et al., 2010).

A sinóvia, o osso e a cartilagem são os três principais alvos atingidos pelos mecanismos patológicos da osteoartrite. Acomete principalmente as articulações dos joelhos, quadris, mãos e coluna vertebral. As principais manifestações clínicas são dor e rigidez (FIGUEIREDO NETO; QUELUZ; FREIRE, 2011).

Entre os mediadores pró-inflamatórios destacam-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6), que possuem um papel essencial no desenvolvimento da dor na OA (REZENDE; CAMPOS, 2013).

A dificuldade de realização de estudos em humanos levou à necessidade do desenvolvimento de modelos experimentais de artrites que apresentem semelhança com a fisiopatologia da doença humana (SILVA, 2009).

A espécie *Persea americana* Mill, pertencente à família Lauraceae tem o seu fruto conhecido como abacate. É originária da América Central e cultivada em todo o Brasil, preferindo os solos sílico argilosos, férteis e profundos (MEDINA et al., 1978).

É uma árvore de 6 (seis) a 15 (quinze) metros de altura, cujas folhas são alternas e as inflorescências são axilares, surgindo na base dos brotos foliares jovens, agrupadas na região terminal dos ramos. As flores são pequenas, bissexuais, verde-amarelas. O fruto, piriforme, ovalado ou arredondado, varia muito nas numerosas variedades existentes (CAVALCANTE, 1991).

Persea americana Mill é uma planta amplamente estudada na fitoterapia, tanto por sua importante qualidade nutricional quanto por seus efeitos medicinais na saúde humana. É utilizada como tratamento para diversas enfermidades, como a anemia, helmintíases, doenças renais, reumatismo, e ajuda na prevenção de câncer (PAMPLORA et al., 2005).

Investigações fitoquímicas dessa espécie identificaram diferentes classes de compostos químicos, tais como monoterpenóides, sesquiterpenóides, triterpenóides, flavonóides e alcaloides sugerindo desta forma potencial para redução da dor (CHAVERRI, 2010). A atividade analgésica e anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas de *P. americana* foi avaliada por meio de testes in vitro em modelos experimentais (ADEYEMI et al., 2002).

A hipótese estabelecida para este estudo é: o extrato hidroetanólico das folhas de *Persea americana* Mill. possui eficácia em modelo experimental de osteoartrite de joelho induzida por monoiodoacetato de sódio em ratos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Osteoartrite de joelho

A Osteoartrite (OA) é a forma mais comum de doença articular, que afeta diferentes componentes de toda a articulação e pode se manifestar em uma ou mais articulações, envolvendo principalmente quadris, joelhos, mãos e pés (MARTELL-PELLETIER et al., 2016). É uma condição clínica cada vez mais prevalente devido ao processo de envelhecimento e ao aumento das taxas de obesidade na população mundial (NEOGI; ZHANG, 2013) sendo estimado que cerca de 250 milhões de pessoas são acometidas pela OA (HUNTER; BIERMA-ZEINSTRA, 2019). Essa alta incidência indica que a probabilidade de desenvolver OA no joelho ao longo da vida é de aproximadamente 39,8% em homens e de 46,8% em mulheres (MURPHY, 2008).

A incidência de OA aumenta a partir dos 40 anos de idade, manifestando-se aproximadamente em 50% dos idosos com mais de 65 anos e em 80% dos que possuem mais de 75 anos. É uma das principais causas de dor e limitação funcional nessa população (LARSEN et al., 2013).

Sua causa pode ser dividida em primária, quando não há causa conhecida, ou secundária, quando se sabe a causa, que pode ser desde defeitos das articulações, como os joelhos com desvios de direção (valgo ou varo), até alterações metabólicas. A participação da hereditariedade é importante, principalmente em certas apresentações clínicas, como os nódulos dos dedos das mãos, chamados de nódulos de Heberden (na junta da ponta dos dedos) ou Bouchard, na junta do meio dos dedos (SOC. BRAS. REUM., 2017).

Outros fatores estão relacionados com a gênese da OA, tais como, genética, metabolismo, fatores mecânicos, e envelhecimento. Estes interagem através de mecanismos moleculares regulando a composição biológica dos tecidos articulares (HERRERO-BEAUMONT et al., 2017).

Não existe cura para a osteoartrite. A patologia resulta em um impacto direto na economia em decorrência dos elevados gastos públicos com hospitais e medicamentos (OLALEKAN AU et al., 2013). É a segunda doença a justificar o auxílio doença inicial, totalizando 7,5% desse tipo de auxílio e é também a segunda causa a

justificar a prorrogação do benefício, totalizando 10,5% dos casos. É a quarta causa a justificar a aposentadoria precoce por invalidez (SOC. BRAS. REUM., 2017).

Dentre as alterações fisiopatológicas que ocorrem na osteoartrite destaca-se a modificação na estrutura e na função do osso subcondral. Esse processo inicia-se precocemente, resultando indiretamente em prejuízos para a cartilagem adjacente. Outro fator importante é que os condrócitos, assim como os osteoclastos e osteoblastos também possuem receptores sensíveis ao cálcio, participando assim, de mecanismos físico-químicos semelhantes (YU et al., 2013).

O quadro clínico desta patologia é caracterizado por dor, estreitamento do espaço articular, atrofia muscular, crepitação óssea, osteófitos, esclerose do osso subcondral, formações de cistos, perda do tônus muscular e derrame articular, levando ao déficit proprioceptivo, alteração do padrão álgico de marcha e incapacidade na realização das atividades funcionais (SANGHI et al., 2011; AN et al., 2011). A figura 1 mostra como essas características fisiopatológicas se manifestam nos joelhos.

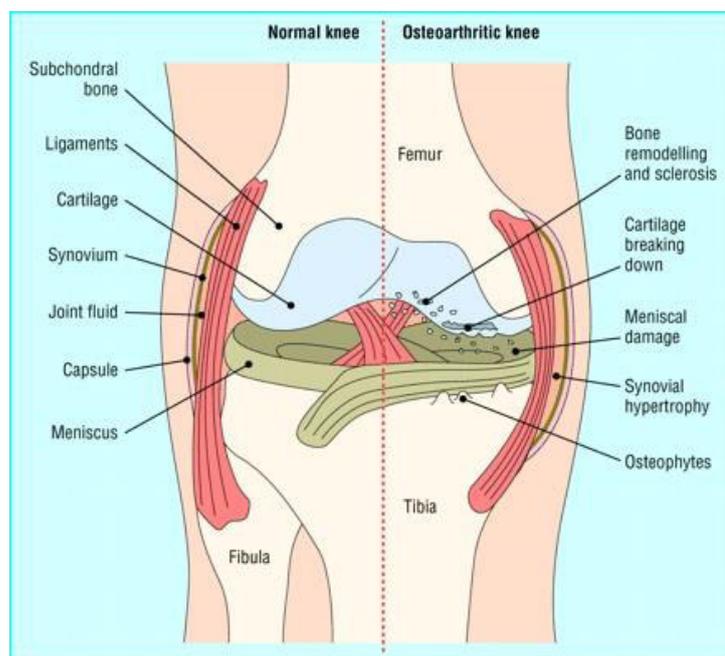


Figura 1. Comparação entre joelho em condições normais e joelho osteoartítico. O joelho normal possui o osso subcondral preservado, ligamentos, cartilagens e sinóvia íntegras. Não há degeneração óssea. Ao lado direito observa-se a formação dos osteófitos e demais degradações articulares que estão envolvidas no quadro patológico de osteoartrite de joelho. Fonte: Hunter (2006)

A redução do espaço articular é uma das principais características radiológicas iniciais na osteoartrite, uma vez que a sobrecarga associada com a diminuição da cartilagem articular favorece essa redução (GARRIDO, 2011). O tênue equilíbrio entre formação e destruição da matriz cartilaginosa é regulado por uma interação anabólica (fatores de crescimento semelhantes à insulina [IGF] I e II) e catabólica (interleucina-1, fator de necrose tumoral alfa [TNF- α] e proteinases). Inicialmente, estes mecanismos são capazes de eliminar ou compensar os efeitos nocivos da OA por meio da estimulação dos condrócitos. Porém, quando esta situação excede a habilidade do sistema de equilibrar os danos, ocorre a degradação da matriz. Este é o primeiro passo para o desenvolvimento da doença (TSAUO et al., 2008).

Os agentes oxidantes como o óxido nítrico, por exemplo, promovem apoptose de condrócitos, resultando na degeneração da matriz. Dessa forma, são responsáveis por dois eventos patogênicos característicos dos condrócitos osteoartríticos – apoptose e senescência prematura, que é caracterizada por telômeros encurtados, aumento de B-galactosidase e decréscimo da produção de adenosina trifosfato (ATP) por disfunção mitocondrial (LOESER, 2009).

Os condrócitos e células sinoviais produzem um grande número de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e o TNF-alfa, que são capazes de estimular as metaloproteinases e outras interleucinas, como IL-6 e IL8, prostaglandina E2 e óxido nítrico. Uma proteína chave no processo patológico da OA é o receptor de membrana CD44, encontrado na superfície de condrócitos, sinovioblastos e macrófagos. Esta proteína é capaz de inibir a síntese de citocinas inflamatórias (YASUDA, 2010).

A primeira citocina liberada após uma lesão tecidual é a TNF- α que desencadeia a liberação de IL-1 β e IL-6, as quais são responsáveis pela estimulação da síntese de prostaglandinas e liberação de aminas simpáticas. Estas citocinas possuem efeito catabólico, levando à destruição da cartilagem articular pela liberação de enzimas líticas zinco-dependentes, conhecidas como metaloproteinases (colagenase, gelatinase, estromelina), além da diminuição de produção de agentes inibitórios teciduais das metaloproteinases e dos inibidores do plasminogênio (FITZGERALD et al., 2006). A IL-1 β e o TNF- α inibem a síntese de componentes da matriz extracelular, sendo que a IL-1 β inibe a síntese de agreganos e suprime a síntese dos colágenos II e IX, que são constituintes próprios da cartilagem, e

aumentaria a produção dos colágenos I e III, resultando numa reparação tecidual deficiente (SILVA et al., 2008).

Diversas substâncias são responsáveis pela ativação ou sensibilização dos nociceptores na resposta inflamatória após lesão tissular, dentre as quais: bradicinina, substância P, serotonina, histamina, íons hidrogênio e potássio, adenosina-trifosfato (ATP), prostaglandinas (PGE-2, PGE-1, PGF-2-alfa), leucotrieno B-4, interleucinas (IL-6, IL-8), fator de necrose tumoral alfa (TFN-alfa), fator de crescimento neural (NGF), noradrenalina, óxido nítrico e adenosina (INOUE et al, 1999)

Em relação aos aspectos histológicos, as mudanças da sinóvia incluem hipertrofia e hiperplasia sinovial com aumento do número de fileiras de células e infiltração de focos dispersos de linfócitos. A articulação do joelho é a mais acometida pela doença, apresentando alto potencial de incapacidade funcional, além da degeneração da superfície articular (ISSA; GRIFFIN, 2012).

A osteoartrite de joelho pode ocorrer nos compartimentos medial, lateral e femoropatelar. Porém, na maioria das vezes é observada no compartimento medial. Assim, afeta a cartilagem articular do platô tibial medial e do côndilo femoral medial, causando uma deformidade óssea no joelho. O compartimento lateral também pode ser afetado atingindo o platô tibial lateral e o côndilo femoral lateral (SNIDER, 2010).

Não há consenso a respeito do tratamento ideal para a osteoartrite. Várias alternativas terapêuticas têm sido utilizadas visando à melhoria da dor e do padrão funcional dos pacientes. Dentre esses métodos destacam-se os farmacológicos, os agentes físicos, os de terapia alternativa (homeopatia, acupuntura e medicamentos fitoterápicos) e os cirúrgicos (LOPES JUNIOR; INACIO 2013, BIJLSMA et al., 2011)

2.2 Dor

O alívio das condições dolorosas sempre foi relevante na condição humana, visto se tratar de experiência sensorial incapacitante e desagradável, sendo um problema comum na clínica médica. Aristóteles já afirmava “a dor perturba a natureza da pessoa que a sente”, porém a definição plena da dor é de difícil acesso, visto que ela é multifatorial e envolve aspectos físicos, sociais, psicológicos, morais e culturais tornando-a complexa e subjetiva (DELGADO et al., 1998).

A palavra “dor” deriva da palavra latina “*dolor*” que significa sofrimento. Habitualmente este termo está relacionado com sofrimento físico e desgaste emocional. Entretanto, apesar disso, a função primordial da dor no organismo é alertar sobre um perigo real ou potencial, como a quebra da homeostase (PORTNOI, 2014).

A dor é útil para prevenção de lesão futura em que há o aprendizado para evitar situações de perigo ou objetos nocivos e sinalizador de lesões articulares, infecções abdominais ou ferimentos graves e que limitam a atividade e requerem repouso para haver a recuperação natural (MELZACK, R.; WALL, P, 1982) Apesar da conceitualização da dor como entidade homogênea ser fácil e de natureza simplista, existe na realidade diferentes tipos de dor, cada uma com mecanismos neurobiológicos e fisiopatológicos próprios (COHEN; MAO, 2014).

A dor é um sério problema de saúde, com implicações sociais e econômicas. Estima-se que nos Estados Unidos a prevalência de dor crônica seja de 30% na população local, gerando um custo de aproximadamente 650 bilhões de dólares por ano (GILRON et al., 2013).

Na cidade de São Luís, capital do Maranhão, Brasil, um estudo utilizou 1597 voluntários e estimou que a prevalência de dor crônica seja de 42% e que 10% da população apresente algum tipo de dor neuropática (VIEIRA, 2012).

De acordo com a Agência Americana de Pesquisa e Qualidade em Saúde Pública e a Sociedade Americana de Dor, a dor é o quinto sinal vital, dessa forma, deve sempre ser registrado ao mesmo tempo e no mesmo ambiente clínico em que são avaliados os outros sinais vitais, como pulso, respiração e pressão arterial (NASCIMENTO; KRELING, 2011).

A dor pode ser classificada: em aguda (inferior a 30 dias), quando possui caráter fisiológico, podendo ser ocasionadas por lesão corporal, queimaduras, infecções, entre outras; ou crônica, quando sua ocorrência é superior a 30 dias. (CUSTODIO, 2008)

Quando a dor ocorre através da ativação fisiológica dos nociceptores, diz-se que a dor é nociceptiva. Porém, os nociceptores também podem ser ativados por componentes psicológicos e subjetivos, ou seja, cada ser humano reage à dor de maneira diferente e com intensidades variadas (PEIXOTO et al., 2011).

Em relação à dor aguda, as principais alterações fisiológicas são: aumento de cortisol, contração muscular, sudorese, agitação, ansiedade, diminuição do apetite e na oferta de sangue aos tecidos, irritabilidade (SALLUM et al., 2010). A dor crônica merece maior destaque e cuidado por parte dos profissionais de saúde, pois influencia o cotidiano do indivíduo, podendo estar associada a processos patológicos crônicos (CELICH; GALON, 2009).

A nocicepção se caracteriza como um elemento fisiológico da dor, composto pelos métodos de modulação, transmissão e transdução dos sinais neurais provocados por impulsos nocivos externos. É uma ligação entre três-neurônios, distribuídos em primeira, segunda e terceira ordem. A primeira ordem tem início na periferia e término na medula espinhal, a segunda ordem sobe pela medula espinhal e a terceira ordem impulsiona para o córtex cerebral (KLAUMANN et al., 2008).

A Figura 2 mostra a transmissão do potencial de ação gerado pela injúria tecidual até o córtex. As terminações nervosas das fibras A δ e C possuem a aptidão para traduzir estímulos agressivos de natureza térmica, chamados de termocetores. Quando traduzem estímulos químicos denominam-se quimioceptores, e quando traduzem estímulos mecânicos, mecanocetores. As fibras A δ são mielinizadas e as C amielínicas (sem mielina) e conduzem estímulos dolorosos em velocidades distintas. As que possuem bainha de mielina conduzem mais rapidamente a informação, enquanto as sem mielina conduzem de maneira mais lenta. Os receptores levam a informação até o sistema nervoso central e o córtex cerebral fará a interpretação como dor. Simultaneamente a isso corre imunomodulação com a vasodilatação e liberação de substâncias como bradicinina, histamina e prostaglandinas (ROCHA et al., 2007).

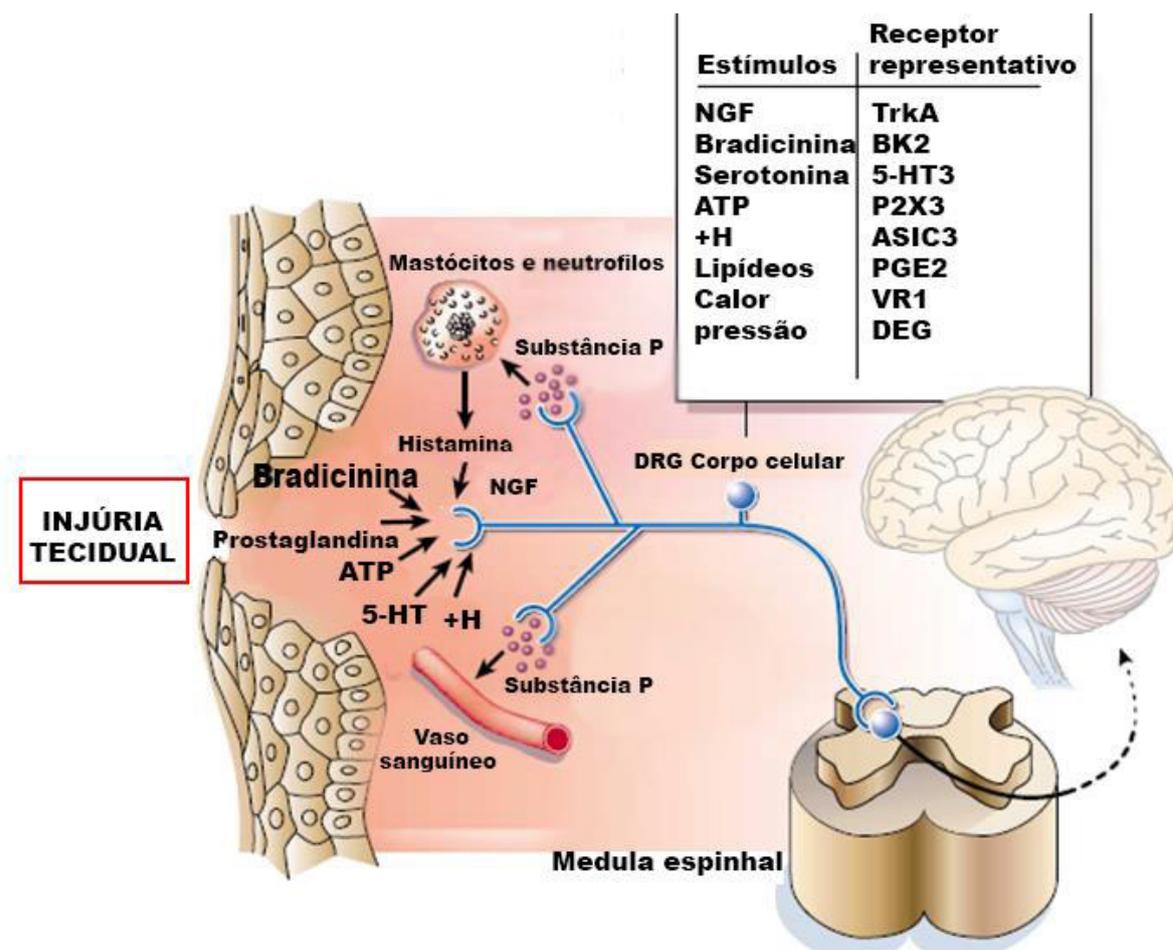


Figura 2. Ilustração do processo fisiopatológico da transmissão da dor. Fonte: Griffin e Woolf (2009)

Levando-se em consideração a importância da dor, o conhecimento de instrumentos de avaliação visando o correto diagnóstico e a reavaliação da resposta ao tratamento são de extrema importância. O manuseio ideal da dor exige uma completa avaliação para que as intervenções venham ser eficientes (BROWN; FOREST, 2006) Dessa forma, entender o funcionamento da dor no organismo vai além de uma questão singularmente técnica, já que também é preciso reconhecer suas características bioéticas, de forma que haja a superação dos conflitos éticos visando sempre o bem-estar do paciente (CHRISTOFFEL et al., 2009).

2.3 Espécie vegetal: *Persea americana* Mill.

Persea americana Miller (Figura 3) é uma planta dicotiledônea, da família Lauraceae, gênero *Persea*. É uma árvore frutífera perene nativa das regiões tropicais e subtropicais da Guatemala, Costa do Pacífico da América Central e México. No Brasil é conhecida como abacateiro (ALCARAZ et al., 2013).

A gênese do nome abacate vem de “ahuacatl”, que significa “testículo”, devido ao formato físico de suas sementes. Os povos mesoamericanos cultuavam a idéia de que o consumo do fruto de *Persea americana* aumentava a fertilidade masculina e a libido sexual (POPENOE, 1963).

A família Lauraceae, possui rara incidência nas regiões temperadas e encontra-se amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. É constituída de 50 gêneros, onde 22 são encontrados no Brasil. Em geral, as plantas dessa família são popularmente conhecidas como “canelas” e possuem alto valor ecológico e econômico (BARROSO et al., 2002).

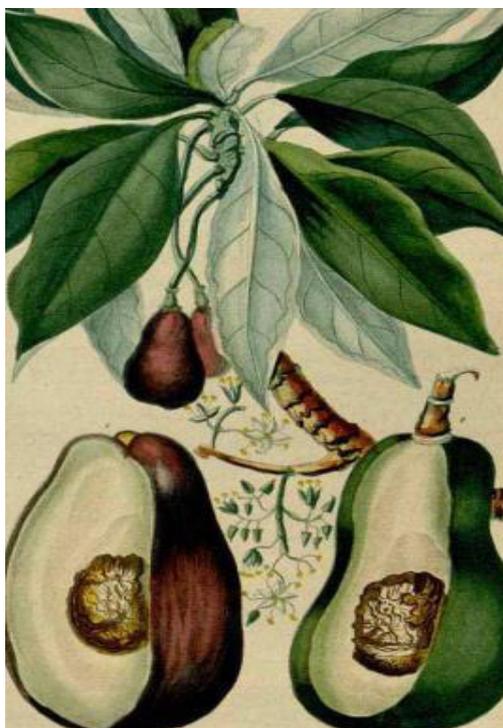


Figura 3. Ilustração botânica de *Persea americana* Miller. Fonte DESCOURTILZ, 1829.

O gênero *Persea* compreende cerca de 190 espécies (MADRINAN, 1996; ALVAREZ et al., 2016), distribuídas principalmente nas Américas e no Sudeste Asiático (SCORA; BERGH, 1990). Plantas pertencentes a este gênero são utilizadas na medicina tradicional para tratar a hipertensão, distúrbios gastrointestinais (MOHAGHEGHZADEH et al., 2006), infecções e inflamações (SCHLEMPER et al., 2001).

O abacateiro possui porte médio-alto, variando de 6 (seis) a 15 (quinze) metros de altura. A planta possui caule cilíndrico e lenhoso com coloração cinza escuro. Suas folhas não possuem estipulas, têm pecíolo curto, e são alternadas, além de possuírem vários formatos como elíptico lanceoladas, oblongas, oblongo-lanceoladas ou ovais, podendo variar de 7 a 41 cm de comprimento. A cor da folha vai de bronzeada, quando nova, e, aos poucos, vai se tornando verde. O fruto é uma baga com uma semente grande, cercada por uma polpa amanteigada (TEIXEIRA; CULTURA, 1995; KOLLER 2002). As flores são hermafroditas, pequenas, com coloração branca ou verde amarelada. São produzidas em abundância e possuem diâmetro de 0,5 a 1,5 cm, dispostas em panículas terminais nos ramos mais novos (ALMEIDA, 2013).

Todas as variedades cultivadas de abacateiros pertencem à mesma espécie botânica e, segundo as características, foram classificadas em três subespécies (POPENOE, 1924).

- **Subespécie mexicana:** plantas nativas do México, com maturação do fruto no verão, possuem maior resistência ao frio; frutos pequenos com; casca delgada, suave e lisa e de semente relativamente grande. Os principais representantes não possuem cultivo no Brasil, pois as características de seus frutos não satisfazem o mercado interno (CAMPOS, 1985).
- **Subespécie guatemalense:** plantas nativas de regiões da Guatemala e sul do México, seu amadurecimento se dá no inverno e primavera, possui menos resistência ao frio, os frutos têm tamanho mediano, a casca é grossa, dura, de superfície áspera e rugosa. As suas folhas não possuem odor particular e é cultivada no Brasil (CAMPOS, 1985 E KOLLER, 1992).
- **Subespécie antilhana:** plantas provenientes das regiões baixas dos trópicos, que possuem maturação no verão e outono, e são mais suscetíveis ao frio,

além de terem o fruto de tamanho médio a grande, com a casca lisa e suave (CAMPOS, 1985).

O México é o maior produtor mundial de abacate, produzindo anualmente cerca de 1.264.140 toneladas, seguido do Chile (368.568t), República Dominicana (295.081t) e Indonésia (275.953t) (AGRIANUAL, 2014).

A produção nacional em 2016 foi de 195 mil toneladas, em área de 10,8 mil hectares (IBGE, 2016).

No Brasil a produção se distribui nas regiões sudeste, sul e nordeste, sendo o estado de São Paulo o maior produtor (47,5% do total), seguido de Minas Gerais (19%) e Paraná (11,2%). A região Nordeste produziu, segundo fontes da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) no ano de 2008, 15.403 toneladas, O estado do Maranhão foi responsável por 7.058 toneladas, se consagrando como o maior produtor da região. O cultivo do abacateiro na região Nordeste ocupa apenas 15,6 % da área plantada, mas os maiores rendimentos estão no Distrito Federal, São Paulo e Pará (CORREIA et al.,2010).

A *Persea americana* Mill. é indicada para redução de lipídeos em modelos animais, observando-se o efeito hipolipidêmico em ratos submetidos a uma dieta a base da polpa do abacate (MOHAMED, 2011), como também em ratos tratados com extrato hidroetanólico da polpa do abacate (MONIKA; GEETHA, 2014). Entretanto, no estudo realizado por PADMANABHAN e ARRUMUGAM (2014) ratos tratados com o extrato hidroetanólico da polpa do abacate apresentaram aumento significativo das lipoproteínas de alta densidade (HDL).

A espécie foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Tendo em vista a quantidade de propriedades e constituintes presentes na *Persea americana*, é necessário que haja estudos experimentais com a finalidade de validar as informações acerca da espécie.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do extrato hidroetanólico das folhas de *Persea americana* Mill. em modelo experimental de osteoartrite em joelhos de ratos.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do extrato hidroetanólico das folhas de *Persea americana* sobre a incapacitação articular.
- Analisar o efeito do extrato hidroetanólico das folhas de *Persea americana* na remodelação articular.
- Examinar histologicamente o efeito do extrato hidroetanólico das folhas de *Persea americana* sobre as lesões da cartilagem articular dos joelhos.
- Analisar a influência da administração oral do extrato hidroetanólico de *Persea americana* sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos.

4. MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Maranhão sob processo número 23115.012978/2017-89 (Anexo 1).

4.2 Espécie Vegetal

Foram usadas folhas adultas frescas e secas de abacateiro (*Persea americana*) coletadas de um espécime localizado no município de Raposa, Maranhão, nas coordenadas geográficas 2°28'21.6"S 44°09'14.3"W.

Para fins de certificação, realizou-se exsicata que confirmou a identificação da espécie que foi registrada com o nº de tomo **10.960** no Herbário do Maranhão (MAR) da Universidade Federal do Maranhão (Anexo 2).

A espécie vegetal foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o número **ADF3144** (Anexo 3).

4.3 Preparação do extrato vegetal

As folhas de *Persea americana* foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar a temperatura limite máxima de 38°C. Após esse processo foram trituradas em moinho de facas (tipo Willey, DeLeo®, EBD), até a obtenção de um pó moderadamente grosso (BRASIL, 2010).

O pó obtido foi submetido à processo extrativo por maceração utilizando como solvente solução hidroetanólica a 70% no hidromódulo 1:3 e mantido sob agitação constante. Após 72 horas o material foi filtrado e o resíduo foi posto novamente sob maceração. Esse procedimento foi repetido por três vezes e os filtrados foram reunidos e concentrados em evaporador rotativo à baixa pressão e temperatura (60°C) obtendo-se o extrato hidroetanólico de *Persea americana*.

4.4 Caracterização química do extrato vegetal

4.4.1 Abordagem fitoquímica do extrato

O extrato foi submetido à triagem fitoquímica preliminar para detecção das principais classes de metabólitos secundários através de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado, característico para cada classe de substâncias (MATOS, 1997).

4.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta-visível (CLAE- UV-Vis)

A análise cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (SHIMADZU, Kyoto, Japão) acoplado a detector de ultravioleta-visível (CLAE-UV-Vis). Foi utilizada uma coluna analítica ACE 5 C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm, 5 μ m). Os compostos foram separados em temperatura ambiente usando gradiente de eluição com um fluxo de 1 mL/min. As fases móveis consistiram de água mili-Q contendo 0,1% de ácido acético (A) e acetonitrila (B). O gradiente utilizado foi: 0-5 min, 20% de B; 5-10 min, 25% de B; 10-15 min, 25-23% de B, 15-20 min, 23-21% de B; 20-25 min, 21-18% de B; 25-30 min, 18- 15% de B, 30-35 min, 15-0% de B. O volume de injeção no sistema de CLAE foi de 10 μ L e a detecção no UV- Vis foi realizada em 254 nm.

4.5 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem WISTAR, adultos com aproximadamente 45 dias de idade, machos, obtidos do Biotério Central da UFMA. Os animais foram alimentados com ração padrão e mantidos em caixas de policarbonato, em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo alternado de claro e escuro de 12 horas, e umidade de ar 40 a 60%.

4.6 Protocolo experimental

Os animais foram separados em dois grupos principais, com 24 animais em cada grupo. Essa divisão ocorreu com base no tempo de início do tratamento (Tratamento imediato e tratamento tardio).

O grupo **tratamento imediato** iniciou o tratamento após 48 horas da indução de osteoartrite e foi avaliado nos dias 0,7,14,21 e 28. Os animais foram eutanasiados no dia 30. O grupo **tratamento tardio** iniciou o tratamento após 14 dias da indução de osteoartrite e foi avaliado nos dias 0, 21, 28, 35 e 42. Os animais foram eutanasiados no dia 44.

Em cada um desses dois grupos, os animais foram divididos em 4 subgrupos compostos por 6 animais.

No subgrupo **EHPA** realizou-se a indução de osteoartrite e os animais receberam diariamente, por 30 dias, a dose de 500 mg/Kg de EHPA via oral por gavagem.

No subgrupo **SALINA** realizou-se a indução de OA e os animais receberam diariamente por 30 dias a dose de *NaCl* 0,9% (0,1mL/Kg) via oral por gavagem.

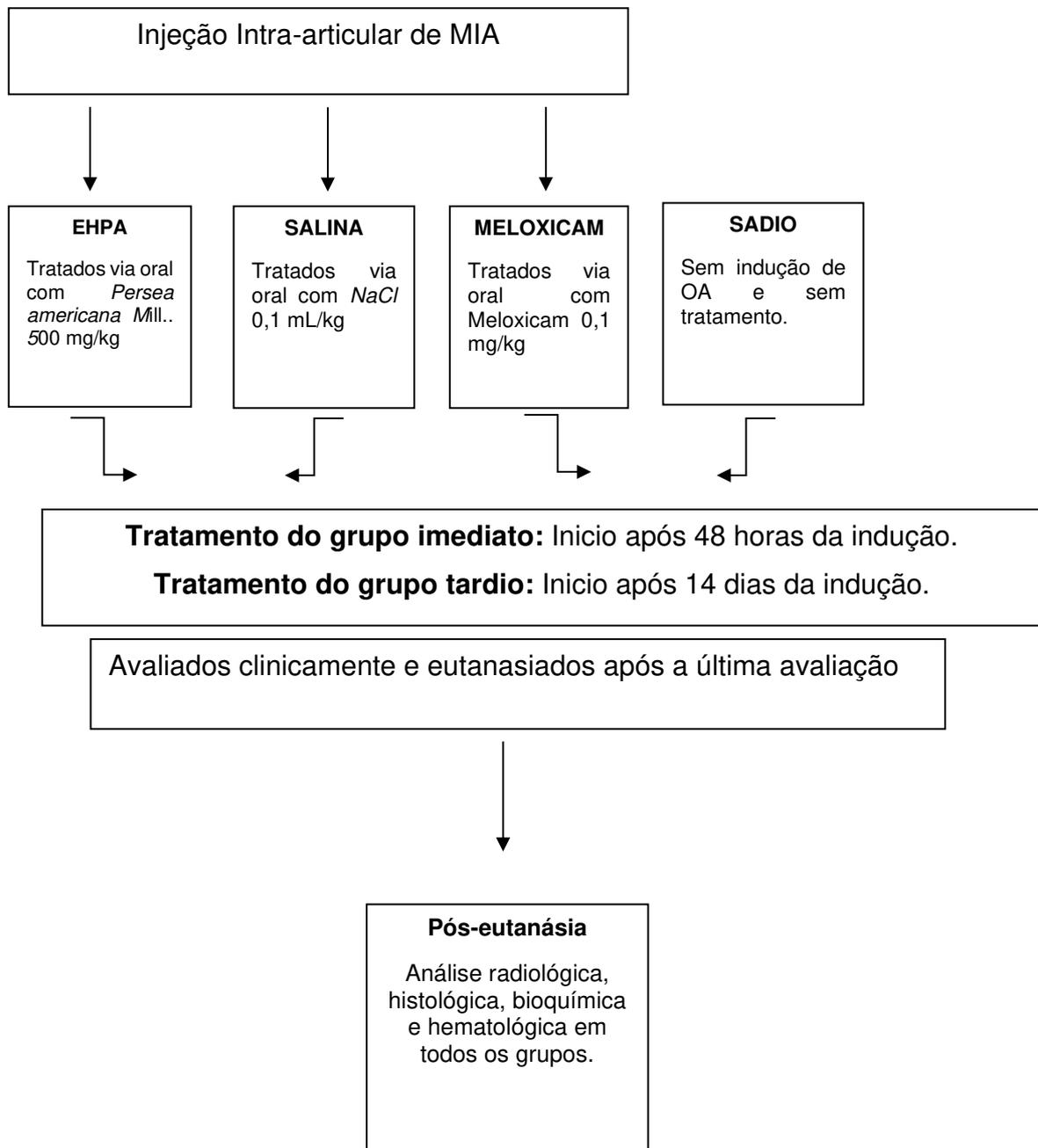
O subgrupo **SADIO** não sofreu nenhum tipo de intervenção cirúrgica.

No subgrupo **MELOXICAM** realizou-se a indução de osteoartrite e os animais receberam diariamente por 30 dias a medicação meloxicam (0,1mg/Kg) via oral por gavagem.

Após o fim do experimento e da eutanasiada dos animais analisou-se os parâmetros histológicos, radiológicos, bioquímicos e hematológicos.

O protocolo experimental está ilustrado na figura 4.

Ratos Wistar: 2 grupos (tratamento imediato e tardio) subdivididos em 4 subgrupos com 6 animais. (Total = 48 animais)



O grupo tratamento imediato foi avaliado nos dias **0, 7, 14, 21 e 28**.

O grupo tratamento tardio foi avaliado nos dias **0, 21, 28, 35 e 42**.

Figura 4. Fluxograma do protocolo experimental. Fonte: AUTOR, 2019.

4.7 Modelo de osteoartrite induzida por monoiodoacetato de sódio (MIA)

Os animais foram submetidos a medicação anestésica (Associação de 60 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina). Após certificação do plano anestésico, foi realizada a tricotomia do joelho direito, e assepsia local com solução tópica de polividona Iodo (10%). A lesão articular foi induzida por uma única injeção intra-articular de 2 mg de monoiodoacetato de sódio (MIA) no joelho, em um volume de 25 µL de solução.

Com a pata flexionada, na altura do joelho, em um ângulo de aproximadamente 90 °, a solução de MIA foi injetada através do ligamento patelar, no espaço intra-articular entre tíbia e fêmur (modificado de FERNIHOUGH, J. 2004).

4.8 Avaliação de Atividade Motora/Deambulação Forçada (*RotaRod Test*)

Para avaliação de atividade motora, os animais foram colocados no aparelho Rotarod (IITC Life Science, Califórnia, Estados Unidos) na velocidade de 16 rpm, por um período de 300 segundos. A utilização do membro afetado foi avaliada pela deambulação forçada. O uso da pata foi graduado em uma escala numérica que variou de 5 a 1, em que: 5= uso normal do membro; 4= claudicação leve; 3= claudicação grave; 2= intermitente desuso da pata afetada; 1= completo desuso da pata afetada (MONVILLE; TORRES; DUNNETT, 2006).

4.9 Quantificação de dor espontânea e avaliação da alodinia mecânica (*Von Frey Test*)

Para avaliação da alodinia mecânica foi utilizado o teste de Von Frey. Os animais foram colocados em caixas individuais de acrílico transparente sobre plataforma elevadas que permitiam o acesso à parte inferior dos seus corpos. Ao tocar o filamento na parte medial da superfície plantar das patas posteriores do animal, forçou-se o filamento sobre a pata somente até que ele se encurvasse, retirando esse

contato em seguida. A resposta da frequência de retirada da pata ao estímulo com filamento foi medida em 10 aplicações com duração de 1 segundo cada, realizado sempre pelo mesmo avaliador.

Utilizou-se diversos filamentos, onde para cada um foi determinado um escore crescente de acordo com a sensibilidade. Dessa forma, foi possível avaliar a sensibilidade periférica em relação ao limiar da retirada de pata. (Filamento 0,05g = Escore 2, Filamento 0,2g = Escore 4, Filamento 2g = Escore 6, Filamento 4g = Escore 8, Filamento 10,0g = Escore 10).

A frequência de retirada foi determinada antes da indução da resposta inflamatória (resposta basal) para obter dados referentes à resposta normal dos animais e após a injeção de MIA (resposta inflamatória), sendo observada no decorrer de todos os dias de experimento (SILVA, 2008).

4.10 Hiperalgisia Mecânica (*Randall Selitto Test*)

Para avaliação da hiperalgisia mecânica utilizou-se o limiar nociceptivo de retirada de pata dos animais medido com um analgesimêtro em formato de cunha, com área de 1,75mm² (Modelo IITC Life Science, Califórnia, Estados Unidos) (RANDALL; SELITTO, 1957; SANTOS-NOGUEIRA et al., 2012). Aplicou-se à superfície plantar das patas traseiras uma pressão linear progressiva até que o animal respondesse com a retirada de pata.

Foram realizadas três medições com um limiar de corte de 250g, para evitar danos aos animais. (RANDALL; SELITTO, 1957; SANTOS-NOGUEIRA et al., 2012). O limiar nociceptivo de retirada de pata (LNRP) foi registrado em gramas (g) e registrado como percentual a partir da seguinte fórmula:

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

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

4.11 Análises bioquímicas e hematológicas

Coletou-se o sangue em dois momentos: antes da indução e após o último dia de tratamento. Foram dosados os seguintes parâmetros: Glicemia em jejum, Colesterol total, Triglicérides, Creatinina, Ureia, Gama GT, Transaminase Oxalacética (AST), Transaminase Piruvica (ALT). Além disso, foram analisados as séries vermelhas e brancas em hemograma completo, além de lâmina para avaliação microscópica complementar. As dosagens bioquímicas foram realizadas no analisador bioquímico automático (Sinnova SX 160) e o hemograma completo foi realizado no equipamento (ABX Pentra 60).

4.12 Análise radiográfica

Após a eutanásia o joelho direito dos animais foram amputados e submetidos à radiografia. Foram realizadas imagens de perfil e da face anteroposterior. Os critérios de avaliação utilizados nas análises radiológicas foram os propostos por Kellgren e Lawrence e estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Critérios de avaliação radiológica de osteoartrose.

Grau da Lesão	Critérios de avaliação
0	Normal
1	Estreitamento duvidoso do espaço articular e possíveis osteófitos.
2	Possível estreitamento do espaço articular e osteófitos definidos
3	Estreitamento do espaço articular, múltiplos osteófitos, alguma esclerose subcondral
4	Notável estreitamento do espaço articular, severa esclerose subcondral, definida deformidade do contorno ósseo e presença de grandes osteófitos

4.13 Análise histopatológica da articulação do joelho

As articulações do joelho foram extraídas e fixadas em formalina a 10% (v/v) por 24 horas, seguida de desmineralização em solução de ácido fórmico 10% em pH 4,5, sob vácuo moderado por 10 dias. Em seguida foram lavadas com água corrente, desidratadas em soluções crescentes de álcool, diafanização em xilol e incluídos em blocos de parafina.

Os compartimentos foram separados longitudinalmente, e encaminhados para preparação histológica e corados por hematoxilina e eosina (HE). Os cortes foram colocados em moldes retangulares, formando blocos que foram subsequentemente seccionados em micrótomo na espessura de 4 µm.

A avaliação histopatológica foi realizada de acordo com as diretrizes da Sociedade Internacional para Pesquisa da Osteoartrite (OARSI). As lâminas foram avaliadas em um escore de 0 a 6, de acordo com a severidade da cartilagem articular. A classificação considera a lesão mais grave observada nas lâminas, independente da extensão da lesão. Grau 0 indica que a morfologia da cartilagem está intacta, o Grau 1 indica a superfície articular intacta com possível lesão ou abrasão, o Grau 2 indica uma descontinuidade na superfície articular, o Grau 3 indica severas fissuras verticais, o Grau 4 indica a presença de erosões, o Grau 5 indica a denudação óssea ou reparo de tecido fibrocartilaginoso, ou ambos, e o Grau 6 indica deformação e remodelação óssea com severas alterações no contorno da superfície articular (PRITZKER et al., 2016).

4.14 Análise Estatística

A comparação das médias de diferentes grupos experimentais foi realizada com análise de variância bivariada (TWO-way ANOVA). O valor de $p < 0,05$ foi considerado como indicativo de significância e os dados obtidos foram analisados através do software "Graph pad InStat® 7.0 (GraphPad software, San Diego, CA).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização química do extrato vegetal

O ensaio fitoquímico (Tabela 2) com análise qualitativa dos constituintes demonstrou a presença de compostos fenólicos, alcaloides, esteroides triterpenóides, e taninos no extrato vegetal.

Tabela 2. Classes de metabólitos secundários presentes no extrato bruto das folhas de *Persea americana*

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	RESULTADOS
Taninos	+++
Fenóis	++
Flavonóides	++
Alcalóides	+
Esteróides	+

Forte (+++); Moderado (++); Fraco (+); Traços (-)

O perfil cromatográfico obtido por HPLC-UV do extrato corrobora com o ensaio de prospecção fitoquímica realizado pela metodologia de Matos (Figura 5). É possível observar a presença de taninos de 10 a 20 minutos, flavonoides de 20 a 25 minutos e terpenos de baixa absorção no UV ao final do cromatograma.

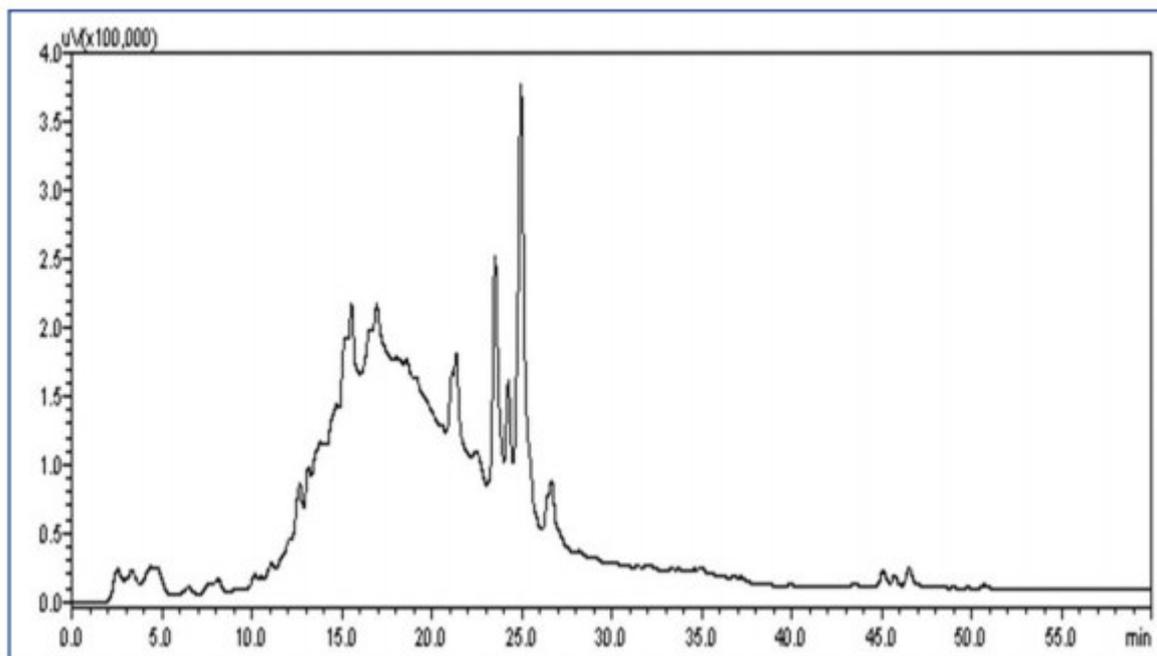


Figura 5. Perfil cromatográfico obtido por HPLC-UV de alta eficiência a 254 nm do EHPA das folhas de *Persea americana*.

A caracterização química por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) revelou a presença de taninos condensados como componentes majoritários além de ácidos fenólicos, flavonóides, agliconas, glicosilados e triterpenos.

A composição química detalhada do extrato hidroetanólico de *Persea americana* encontra-se descrita na Tabela 3.

Tabela 3. Composição química do extrato hidroetanólico das folhas de *Persea americana*.

	[M-H]⁻	Fragmentos MSⁿ	Substância proposta
1	179	161	Ácido Cafeico
2	1153	865; 577; 289	Tetrâmero de catequina
3	1151	863; 575; 289	Procianidina Tipo-A
4	1441	1153; 865; 577; 289	Pentâmero de catequina
5	1729	1441; 1153; 865; 577; 289	Hexâmero de catequina
6	755	609; 300	Quercetina 3- <i>O</i> -[6"- <i>O</i> - (ramnosideo) glucosideo] 7- <i>O</i> - ramnosideo)
7	609	301	Rutina
8	593	431; 283	Kaempferol 3- <i>O</i> -glicosideo 7- <i>O</i> - ramnosideo
9	433	301	Quercetina- <i>O</i> -pentosideo
10	447	300; 271; 255	Quercetina- <i>O</i> -deoxisosideo
11	431	285	Kaempferol 3- <i>O</i> -ramnosideo
12	271	151	Naringenina
13	285	151	Kaempferol
14	425	218	β-amirina

5.2 Avaliação de Atividade Motora/Deambulação Forçada (*RotaRod Test*)

A Figura 6 ilustra os resultados obtidos no grupo tratamento imediato. No dia 0 não houveram diferenças significativas entre nenhum dos subgrupos estudados. No dia 7 os animais aos quais a osteoartrite foi induzida (EHPA, Salina e Meloxicam) tiveram uma diminuição significativa no escore de marcha, comprovando a eficácia da indução, mas não houve significância estatística. No 14º dia os subgrupos tratados (EHPA e Meloxicam) mostraram uma melhora significativa ($p < 0,0001$) na atividade motora em relação ao subgrupo salina. O resultado se manteve semelhante no dia 21 e no dia 28, mostrando que o tratamento com EHPA melhorou a atividade motora dos animais.

Em nenhum dos dias de avaliação houve diferença significativa quando se comparou o subgrupo tratado com meloxicam e o subgrupo tratado com o extrato de *Persea americana*.

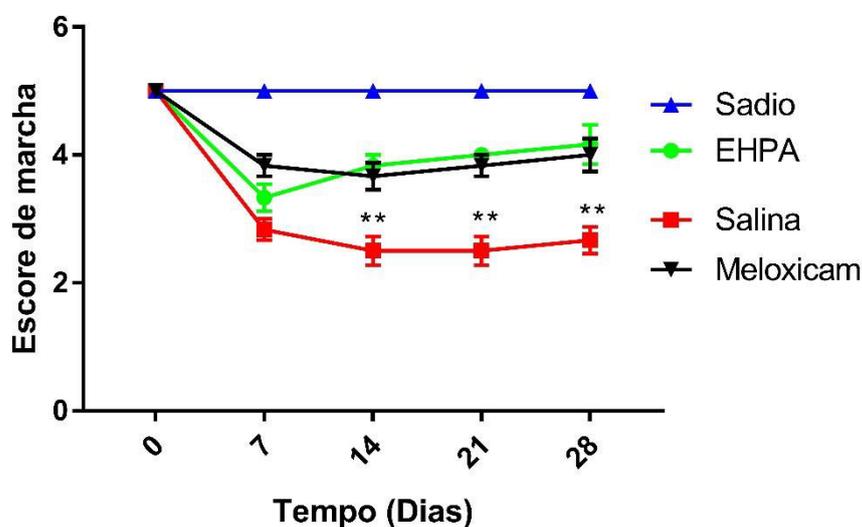


Figura 6. Avaliação de atividade motora / deambulação forçada com Rotarod Test no grupo tratamento imediato. Os animais com osteoartrite induzida pela injeção intra-articular de MIA foram avaliados nos dias (0, 7, 14, 21 e 28) após a indução. EHPA: Administração de extrato de *Persea americana*, via oral (500mg/Kg), Salina: administração de NaCl 0,9% via oral (0,1mL/Kg), Meloxicam: administração de meloxicam, via oral (1mg/Kg). O subgrupo sadio não foi induzido e não foi tratado. Resultados expressos em média \pm erro padrão das médias (SEM). (**) Valor $p < 0,0001$ em relação aos subgrupos EHPA e salina. Teste de two-way anova.

A Figura 7 mostra que o tratamento tardio apresentou resultados semelhantes ao grupo que realizou o tratamento imediato após a indução. Não houve diferença significativa no ponto de partida do experimento (D0) e no dia 21. Durante a avaliação do dia 28 o subgrupo EHPA mostrou diferença estatística significativa em relação ao subgrupo salina ($p < 0,001$). Essa significância manteve-se até último dia de avaliação.

Em nenhum dos dias de avaliação houve diferença significativa quando se comparou o subgrupo meloxicam e o subgrupo tratado com o extrato de *Persea americana*.

Esses resultados mostram que em ambos protocolos experimentais o extrato vegetal mostrou-se um bom tratamento frente ao teste de deambulação forçada.

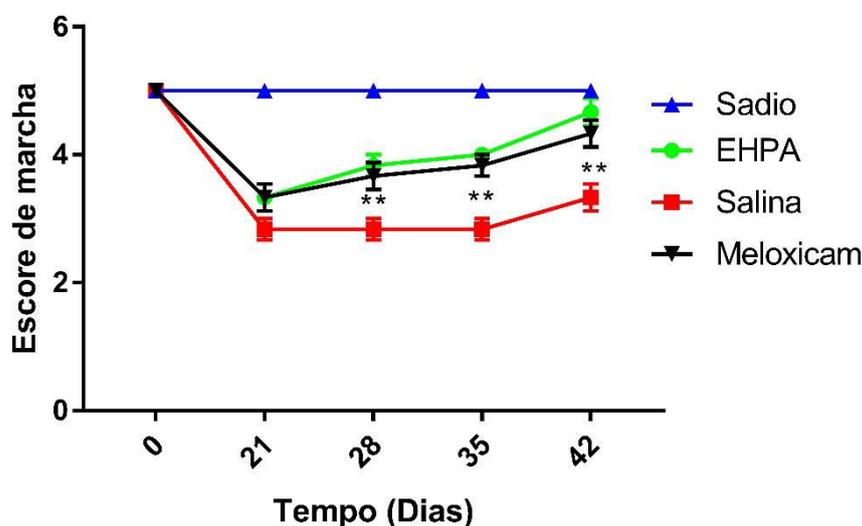


Figura 7. Avaliação de atividade motora / deambulação forçada com Rotarod Test no grupo tratamento tardio. Os animais com osteoartrite induzida pela injeção intra-articular de MIA foram avaliados nos dias (0, 21, 28, 35 e 42) após a indução. EHPA: Administração de extrato de *Persea americana*, via oral (500mg/Kg), Salina: administração de NaCl 0,9% via oral (0,1mL/Kg), Meloxicam: administração de meloxicam, via oral (1mg/Kg). O subgrupo sadio não foi induzido e não foi tratado. Resultados expressos em média \pm erro padrão das médias (SEM). (**) Valor $p < 0,0001$ em relação aos subgrupos EHPA e salina. Teste de two-way anova.

5.3 Quantificação de dor espontânea e avaliação da alodinia mecânica (*Von Frey Test*)

A Figura 8 mostra que, como esperado devido ao fato de os animais estarem sob as mesmas condições, não houve diferença estatística significativa no teste basal (D0). Após 7 dias de protocolo houve resultado significativo entre o subgrupo EHPA e o subgrupo salina ($p < 0,05$). Houve uma brusca decaída no valor do escore nos subgrupos a partir da primeira semana, comprovando que a indução de osteoartrite foi eficiente em todos os subgrupos propostos. No dia 14 manteve-se a diferença estatística entre o subgrupo EHPA e salina ($p < 0,05$).

A partir do dia 21 até o último dia de tratamento a significância estatística entre o subgrupo EHPA e salina foi de ($p < 0,0001$).

Não houve diferença estatística em nenhum dia ao se comparar os subgrupos EHPA e meloxicam. Dessa forma, observa-se que os animais tratados com o meloxicam, droga preconizada na clínica, tiveram uma resposta estatisticamente semelhante aos animais tratados com o extrato hidroetanólico de *Persea americana*.

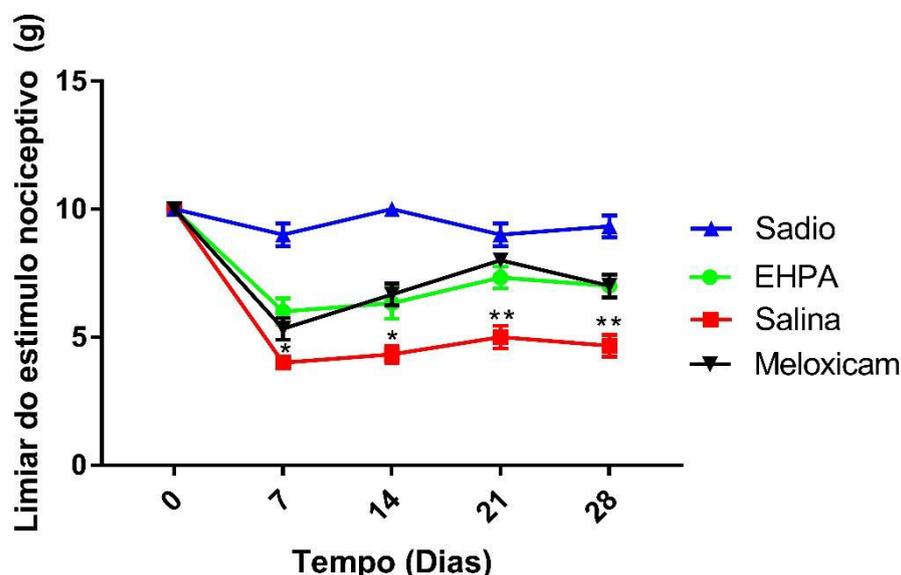


Figura 8. Avaliação de sensibilidade tátil com Von Frey Test no grupo tratamento imediato. Os animais com osteoartrite induzida pela injeção intra-articular de MIA foram avaliados nos dias (0, 7, 14, 21 e 28) após a indução. EHPA: Administração de extrato de *Persea americana*, via oral (500mg/Kg), Salina: administração de NaCl 0,9% via oral (0,1mL/Kg), Meloxicam: administração de meloxicam, via oral (1mg/Kg). O subgrupo sadio não foi induzido e não foi tratado. Resultados expressos em média \pm erro padrão das médias (SEM). (*) Valor $p < 0,05$ em relação aos subgrupos EHPA e salina. (**) Valor $p < 0,0001$ em relação aos subgrupos EHPA e salina. Teste de two-way anova.

A figura 9 ilustra que os animais que realizaram tratamento tardio não mostraram diferenças significativas no D0, mostrando que iniciaram o protocolo experimental sob as mesmas condições clínicas.

Em todos os dias de avaliação (D21, D28, D35 e D42) houveram significância ao se comparar os subgrupos EHPA e salina ($p < 0,0001$).

Não houve diferença estatística em nenhum dia ao se comparar os subgrupos EHPA e meloxicam. Dessa forma, observa-se que os animais tratados com o meloxicam, droga preconizada na clínica, tiveram uma resposta estatisticamente semelhantes aos animais tratados com o extrato hidroetanólico de *Persea americana* sugerindo que ambos atuem similarmente no protocolo experimental em modelo de osteoartrite em joelho de ratos.

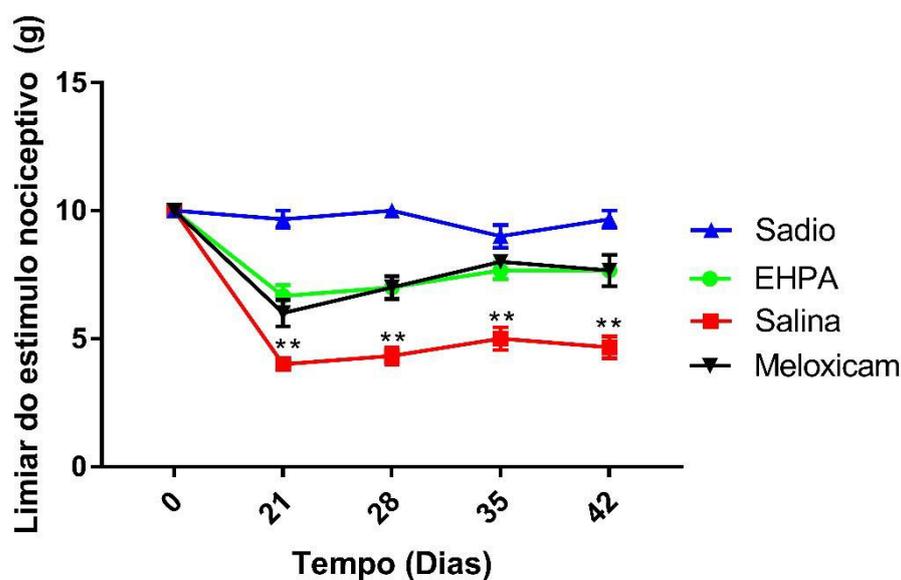


Figura 9. Avaliação de sensibilidade tátil com Von Frey Test. no grupo tratamento tardio. Os animais com osteoartrite induzida pela injeção intra-articular de MIA foram avaliados nos dias (0, 21, 28, 35 e 42) após a indução. EHPA: Administração de extrato de *Persea americana*, via oral (500mg/Kg), Salina: administração de NaCl 0,9% via oral (0,1mL/Kg), Meloxicam: administração de meloxicam, via oral (1mg/Kg). O subgrupo sadio não foi induzido e não foi tratado. Resultados expressos em média \pm erro padrão das médias (SEM). (**) Valor $p < 0,0001$ em relação aos subgrupos EHPA e salina. Teste de two-way anova.

5.4 Avaliação de Hiperalgisia Mecânica (Randall Selitto Test)

Nos animais que receberam tratamento imediato (figura 10) durante a avaliação basal (D0) não houveram diferenças estatísticas significantes em nenhum dos quatro subgrupos.

Houve ausência de significância ao se comparar os subgrupos EHPA e salina no (D7) e no (D14). Porém, a partir do (D21) obteve-se significância de ($p < 0,0001$) ao se comparar esses mesmos subgrupos. No último dia de tratamento, onde finalizou-se o protocolo experimental, a significância entre os subgrupos EHPA e Salina manteve-se em ($p < 0,001$).

Não houve diferença estatística em nenhum dia ao se comparar os subgrupos EHPA e meloxicam.

Dessa forma, no grupo tratamento imediato, o extrato de *Persea americana* na dose de 500mg/kg, via oral, mostrou resultados positivos em relação a atividade anti-nociceptiva frente ao teste de hiperalgisia mecânica além de possuir ação anti-inflamatória semelhante ao meloxicam corroborando com os outros testes comportamentais citados anteriormente.

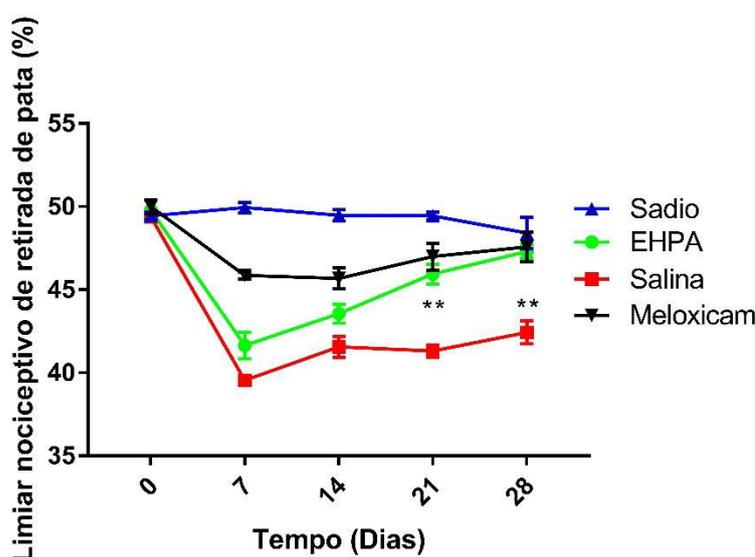


Figura 10. Avaliação de hiperalgisia mecânica com Randall Selitto Test no grupo tratamento imediato. Os animais com osteoartrite induzida pela injeção intra-articular de MIA foram avaliados nos dias (0, 7, 14, 21 e 28) após a indução. EHPA: Administração de extrato de *Persea americana*, via oral (500mg/Kg), Salina: administração de NaCl 0,9% via oral (0,1mL/Kg), Meloxicam: administração de meloxicam, via oral (1mg/Kg). O subgrupo sadio não foi induzido e não foi tratado. Resultados expressos em média \pm erro padrão das médias (SEM). (**) Valor $p < 0,0001$ em relação aos subgrupos EHPA e salina. Teste de two-way anova.

Os resultados do grupo tratamento tardio (figura 11) comprovaram a indução devido à brusca queda nos escores. No dia 21 houve diferença estatisticamente significativa entre o subgrupo tratado com extrato de *Persea americana* e o subgrupo tratado com solução salina ($p < 0,05$). Resultados semelhantes foram obtidos no dia 28.

Nos últimos dois dias de avaliação, (D35) e (D42), onde se finalizou o protocolo experimental, o valor da significância foi ($p < 0,0001$). Assim sendo, as avaliações mostraram que o grupo tratamento tardio também apresentou resultados positivos frente a atividade anti-nociceptiva no teste de hiperalgesia mecânica.

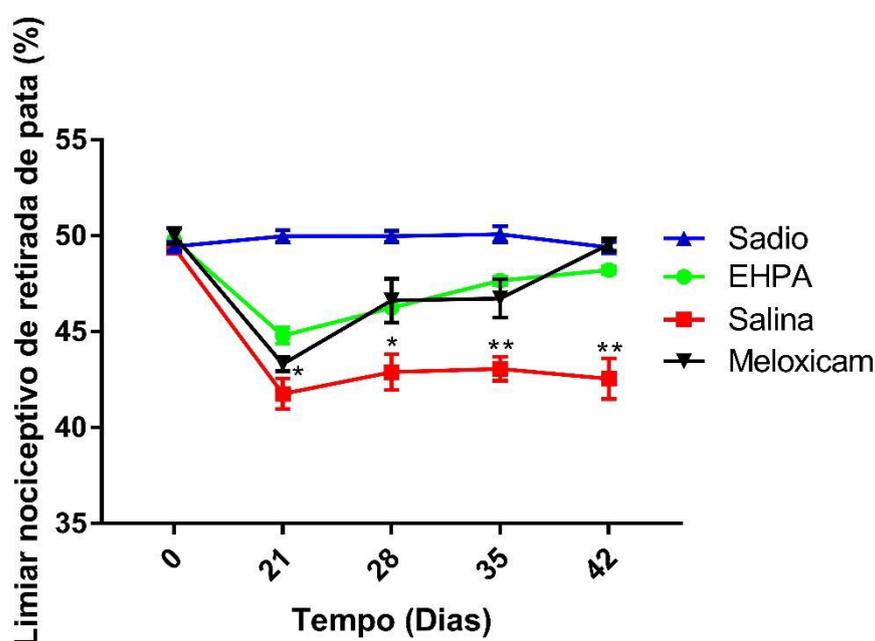


Figura 11. Avaliação de hiperalgesia mecânica com Randall Selitto Test no grupo tratamento tardio. Os animais com osteoartrite induzida pela injeção intra-articular de MIA foram avaliados nos dias (0, 21, 28, 35 e 42) após a indução. EHPA: Administração de extrato de *Persea americana*, via oral (500mg/Kg), Salina: administração de NaCl 0,9% via oral (0,1mL/Kg), Meloxicam: administração de meloxicam, via oral (1mg/Kg). O subgrupo sadio não foi induzido e não foi tratado. Resultados expressos em média \pm erro padrão das médias (SEM). (*) Valor $p < 0,05$ em relação aos subgrupos EHPA e salina. (**) Valor $p < 0,0001$ em relação aos subgrupos EHPA e salina. Teste de two-way anova.

5.5 Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos

Ao se comparar os subgrupos EHPA e salina, do grupo tratamento imediato, não houveram diferenças significativas em relação ao número de hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, leucócitos ou linfócitos. Em relação ao número de plaquetas, houve diferença estatística significativa entre os grupos salina e EHPA ($p < 0,05$). Assim sendo, a quantidade do número de plaquetas do subgrupo EHPA se aproximou do valor de referência utilizado. (Tabela 4)

Em relação aos marcadores bioquímicos dos animais do subgrupo EHPA, cujo tratamento foi imediato, a dosagem de colesterol total, creatinina, Gama GT, AST, ALT e Ureia, não mostraram diferenças significativas em relação ao subgrupo sadio. (Tabela 5) Sugerindo dessa forma que a utilização do extrato não possui, na dose de 500mg/kg, toxicidade a nível hepático e renal.

Houveram diferenças significativas entre os níveis de glicemia em jejum. Comparando os subgrupos EHPA com Salina, obteve-se a significância de ($p < 0,0001$). Relacionando o subgrupo tratado com o sadio, obteve-se ($p < 0,05$) e em relação ao subgrupo meloxicam, obteve-se a significância de ($p < 0,0001$)

Ou seja, o grupo que recebeu diariamente o extrato vegetal apresentou os menores níveis de glicemia em jejum.

Em relação ao grupo que foi tratado tardiamente, em todos os subgrupos estudados, também se avaliou resposta semelhante frente ao número de células sanguíneas, não havendo diferenças significativas entre o número de hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, leucócitos, linfócitos e plaquetas ao comparar o subgrupo EHPA e Sadio. (Tabela 4)

As dosagens de Creatinina, Gama GT, AST, ALT e Ureia não divergiram significadamente entre os subgrupos EHPA e Sadio. (Tabela 5). O nível sérico de colesterol total mostrou significância de ($p < 0,05$). Onde o subgrupo que recebeu o extrato vegetal de *Persea americana* apresentou os menores níveis de colesterol total.

Em relação a glicemia em jejum, os animais que foram tratados tardiamente apresentaram resultados semelhantes aos que foram tratados imediatamente, possuindo significância entre os subgrupos EHPA e Salina ($p < 0,0001$), onde os animais tratados com o extrato vegetal mostraram os menores valores.

Tabela 4. Números de células sanguíneas dos animais de ambos os protocolos de tratamento expressos em média aritmética \pm desvio padrão. EHPA: Administração de extrato de *Persea americana*, via oral (500mg/Kg), Salina: administração de NaCl 0,9% via oral (0,1mL/Kg), Meloxicam: administração de meloxicam, via oral (1mg/Kg). O subgrupo sadio não foi induzido e não foi tratado. (*) Valor $p < 0,05$ em relação aos subgrupos EHPA e salina.

Parâmetros hematológicos	Salina		Meloxicam		Sadio		EHPA		Valor de referência (LIMA et al., 2014)
	Imediato	Tardio	Imediato	Tardio	Imediato	Tardio	Imediato	Tardio	
Hemácias ($10^{12}/l$)	8,5 \pm 0,23	7,72 \pm 0,18	8,29 \pm 0,11	7,72 \pm 0,24	8,17 \pm 0,19	7,83 \pm 0,26	8,39 \pm 0,13	7,6 \pm 0,21	8,65 \pm 1,11
Hemoglobina (g/dl)	16,97 \pm 0,30	15,55 \pm 0,43	16,26 \pm 0,44	15,88 \pm 0,25	16,63 \pm 0,28	15,6 \pm 0,45	17 \pm 0,26	14,9 \pm 0,38	15,00 \pm 1,45
Hematócrito (%)	46,02 \pm 1,18	43,68 \pm 0,97	42,88 \pm 1,6	43,9 \pm 0,83	44,45 \pm 0,86	44,2 \pm 1,43	45,5 \pm 0,51	42,5 \pm 1,17	43,30 \pm 3,51
Volume corpuscular médio (fl)	54,4 \pm 0,50	56,66 \pm 0,74	52 \pm 1,52	57 \pm 1,52	54,66 \pm 1,10	56,16 \pm 0,89	54 \pm 1,29	55,83 \pm 0,68	47,75 \pm 2,89
Leucócitos ($10^9/l$)	4,1 \pm 1,08	7,2 \pm 1,01	3,73 \pm 0,44	2,9 \pm 1,21	4,05 \pm 1,24	5,36 \pm 2,08	5,9 \pm 0,87	6,58 \pm 1,78	7,63 \pm 2,37
Linfócitos (%)	82,07 \pm 4,98	84,31 \pm 1,68	77,7 \pm 8,01	78,4 \pm 6,59	86,31 \pm 2,21	85,28 \pm 2,99	80 \pm 2,96	81,1 \pm 5,63	67,36 \pm 15,31
Plaquetas ($10^9/l$)	658,6 \pm 47,81 *	463,6 \pm 33,36 *	564 \pm 20,68	797 \pm 85,75	542,66 \pm 87,21	681,33 \pm 156,66	744 \pm 50,02	642,2 \pm 64,86	982,34 \pm 167,05

Tabela 5. Dosagens bioquímicas dos animais de ambos os protocolos de tratamento expressos em média aritmética \pm desvio padrão. EHPA: Administração de extrato de *Persea americana*, via oral (500mg/Kg), Salina: administração de NaCl 0,9% via oral (0,1mL/Kg), Meloxicam: administração de meloxicam, via oral (1mg/Kg). O subgrupo sadio não foi induzido e não foi tratado. (*) Valor $p < 0,05$ em relação aos subgrupos EHPA e salina. (**) Valor de $p < 0,0001$ em relação aos subgrupos EHPA e salina.

Parâmetros Bioquímicos	Salina		Meloxicam		Sadio		EHPA		Valor de referência (LIMA et al., 2014)
	Imediato	Tardio	Imediato	Tardio	Imediato	Tardio	Imediato	Tardio	
Colesterol Total (mg/dl)	49,5 \pm 6,29	41 \pm 1,01 *	53,66 \pm 6,96	69 \pm 0,81	52,33 \pm 5,96	71,66 \pm 1,59	60,5 \pm 1,70	52,16 \pm 1,21	60,68 \pm 6,51
Creatinina (mg/dl)	0,37 \pm 0,004	0,41 \pm 0,01	0,65 \pm 0,11	0,60 \pm 0,167	0,36 \pm 0,05	0,35 \pm 0,03	0,47 \pm 0,05	0,511 \pm 0,08	0,58 \pm 0,24
Gama GT (U/l)	2,5 \pm 0,50	2 \pm 0,01	6,33 \pm 3,68	4,83 \pm 1,67	2,16 \pm 0,37	3,33 \pm 0,47	1,5 \pm 0,50	3,5 \pm 0,50	3,47 \pm 1,74
Glicemia em jejum (mg/dl)	340 \pm 13,88 **	360,16 \pm 3,57 **	351,5 \pm 7,52	249,66 \pm 33,07	253 \pm 25,94	296,66 \pm 11,41	199 \pm 34,82	131,66 \pm 10,67	138,72 \pm 30,17
Transaminase Oxalaxética (AST) (U/l)	134 \pm 5,71	124,33 \pm 5,15	98,33 \pm 10,20	130,33 \pm 20,00	103,5 \pm 8,20	125,83 \pm 14,56	116 \pm 11,66	119,33 \pm 3,29	131,33 \pm 43,98
Transaminase Pirúvica (ALT) (U/l)	64 \pm 3,26	68,16 \pm 4,41	56 \pm 8,16	62 \pm 1,52	58 \pm 4,47	52,5 \pm 1,60	55 \pm 5	63,66 \pm 4,53	57,55 \pm 11,95
Triglicerídeos (mg/dl)	73,5 \pm 3,47	57,5 \pm 0,76	127,5 \pm 18,37	68 \pm 1,79	60 \pm 7,89	52,16 \pm 2,19	66,83 \pm 29,91	51 \pm 0,81	46,87 \pm 18,73
Ureia (mg/dl)	48,6 \pm 5,34	43,5 \pm 3,25	47,5 \pm 0,50	52 \pm 1,63	53,66 \pm 4,06	41,83 \pm 1,34	52,16 \pm 3,587	46,16 \pm 3,02	39,97 \pm 6,78

5.6 Avaliação radiográfica

No grupo tratamento imediato (Figura 12), após os vinte e oito dias de protocolo experimental, a análise radiográfica mostra que os animais do subgrupo salina possuíram o maior grau de lesão articular e óssea. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os subgrupos salina e EHPA.

Não houve diferença estatística em comparação entre os subgrupos EHPA e meloxicam. A figura 13 ilustra a radiografia do grupo tratamento imediato.

Dessa forma, sugere-se que o tratamento com *Persea americana* na dose de 500mg/kg, via oral, atue melhorando a remodelação óssea e cartilaginosa.

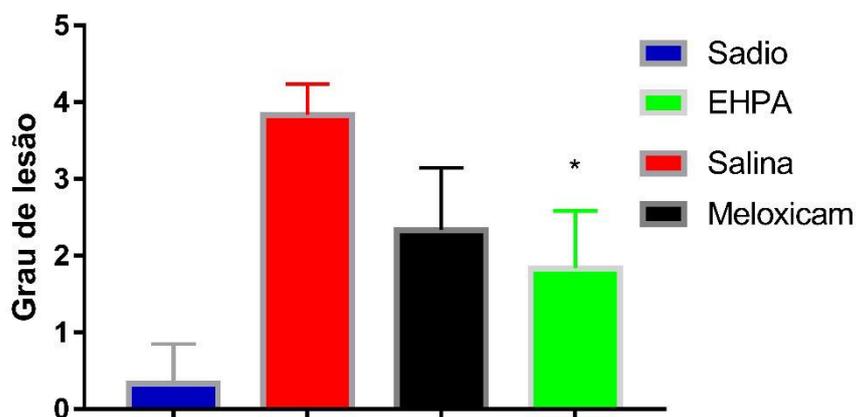


Figura 12. Avaliação radiográfica através do grau radiológico de osteoartrite de Kellgren e Lawrence no grupo tratamento imediato. Os animais com osteoartrite induzida pela injeção intra-articular de MIA foram avaliados nos dias (0, 7, 14, 21 e 28) após a indução. EHPA: Administração de extrato de *Persea americana*, via oral (500mg/Kg), Salina: administração de NaCl 0,9% via oral (0,1mL/Kg), Meloxicam: administração de meloxicam, via oral (1mg/Kg). O subgrupo sadio não foi induzido e não foi tratado. (*) Valor $p < 0,05$ em relação aos subgrupos EHPA e salina. Teste de one-way anova.



Figura 13. Radiografia do grupo tratamento imediato. Avaliação considerou o grau radiológico de osteoartrite (Kellgren e Lawrence). Os animais com osteoartrite induzidos pela injeção intra-articular de MIA foram avaliados nos dias (0, 7, 14, 21 e 28) após a indução. (A) Administração de extrato de *Persea americana*, via oral (500mg/Kg), (B) Administração de NaCl 0,9% via oral (0,1mg/Kg), (C) Subgrupo sadio que não foi induzido e não foi tratado, (D) Administração de meloxicam, via oral (1mg/Kg). Na figura A e na figura C não se observa formação de osteófitos e nem degradação óssea e articular, mostrando um leve estreitamento do espaço articular e leve formação de osteófitos. A figura B mostra a formação de osteófitos de grandes dimensões e grave deformidade articular. A figura D mostra estreitamento articular e leve deformação articular.

Em relação ao grupo que realizou o tratamento tardio (Figura 14), após os 44 dias de protocolo experimental, os resultados foram semelhantes ao grupo que recebeu tratamento imediato após indução. Os animais do subgrupo salina também possuíram o maior grau de lesão articular e óssea. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre os subgrupos salina e EHPA, sugerindo que o tratamento via oral atue na remodelação óssea e cartilaginosa.

Igualmente não houve diferença estatística em comparação entre os subgrupos EHPA e meloxicam. A figura 15 ilustra a radiografia deste grupo.

Os resultados mostraram que, independente do tratamento via oral com o extrato hidroetanólico de *Persea americana* Mill. ter sido realizado imediatamente após a indução de osteoartrite, ou ter sido realizado depois de 14 dias, resultados positivos foram obtidos frente a análise radiológica, sugerindo que o tratamento com extrato vegetal atue de maneira protetora nos ossos e cartilagens relacionados no processo patológico de osteoartrite de joelho.

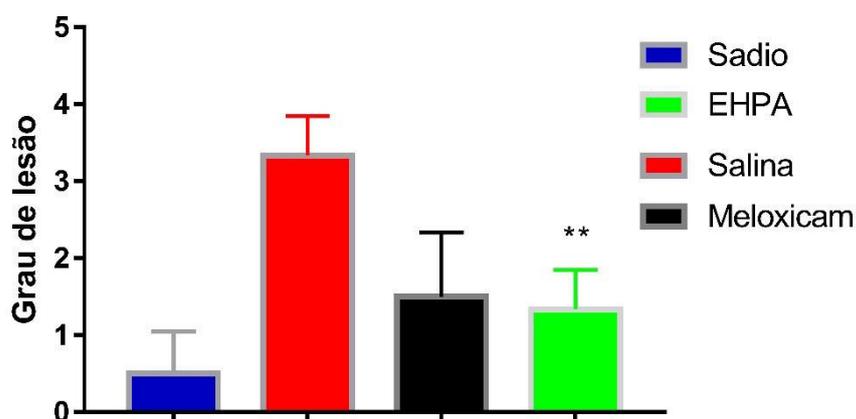


Figura 14. Avaliação da análise radiográfica através do grau radiológico de osteoartrose de Kellgren e Lawrence no grupo tratamento tardio. Os animais com osteoartrite induzida pela injeção intra-articular de MIA foram avaliados nos dias (0, 21, 28, 35 e 42) após a indução. EHPA: Administração de extrato de *Persea americana*, via oral (500mg/Kg), Salina: administração de NaCl 0,9% via oral (0,1mL/Kg), Meloxicam: administração de meloxicam, via oral (1mg/Kg). O subgrupo sadio não foi induzido e não foi tratado. (**) Valor $p < 0,0001$ em relação aos subgrupos EHPA e salina. Teste de one-way anova.

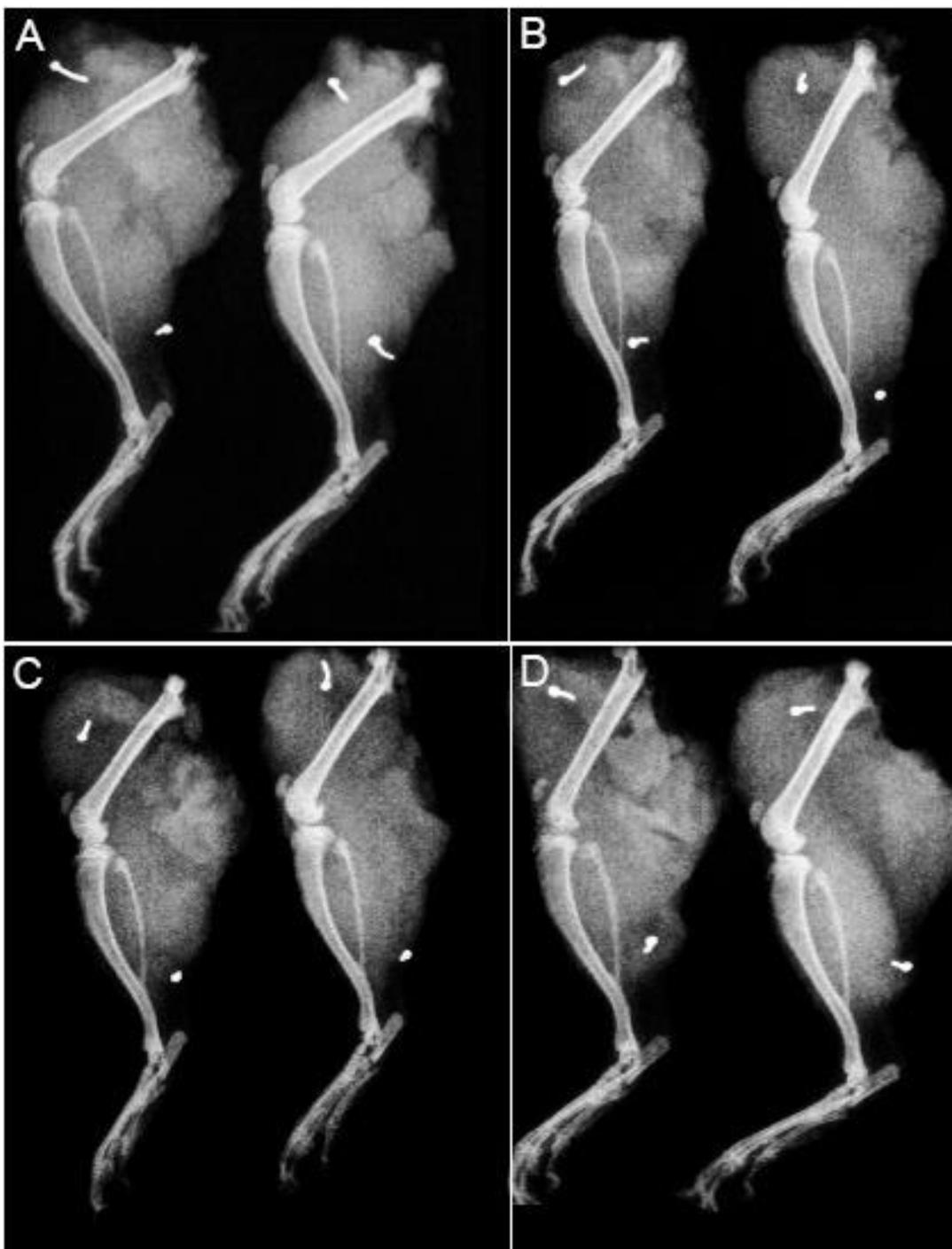


Figura 15. Radiografia do grupo tratamento tardio. Avaliação considerou o grau radiológico de osteoartrose (Kellgren e Lawrence). Os animais com osteoartrite induzida pela injeção intra-articular de MIA foram avaliados nos dias (0, 21, 28, 35 e 42) após a indução. (A) Administração de extrato de *Persea americana*, via oral (500mg/Kg), (B) Administração de NaCl 0,9% via oral (0,1mg/Kg), (C) Subgrupo sadio que não foi induzido e não foi tratado, (D) Administração de meloxicam, via oral (1mL/Kg). As figuras A e C mostram que as características anatômicas da cartilagem articular encontram-se preservadas, porém com um leve estreitamento do espaço articular. A figura B mostra a formação de osteófitos de grandes dimensões e grave deformidade articular. A figura D mostra estreitamento articular e leve deformação articular.

5.7 Avaliação histopatológica da articulação dos joelhos

As figuras 16 e 17 retratam respectivamente a avaliação histopatológica dos grupos tratamento imediato e tratamento tardio, utilizando os critérios da OARSI. Os resultados obtidos sugerem que o tratamento com o extrato hidroetanólico de *Persea americana*, em ambos protocolos de tratamento, foi capaz de reduzir a degradação da matriz cartilaginosa provocada pela indução de OA.

O subgrupo tratado com solução salina foi o que possuiu maior escore tanto no tratamento imediato, quanto no tardio.

A significância ao se comparar os subgrupos salina e EHPA, no grupo tratamento imediato, foi de ($p < 0,05$). Resultados semelhantes foram obtidos no grupo tratamento tardio.

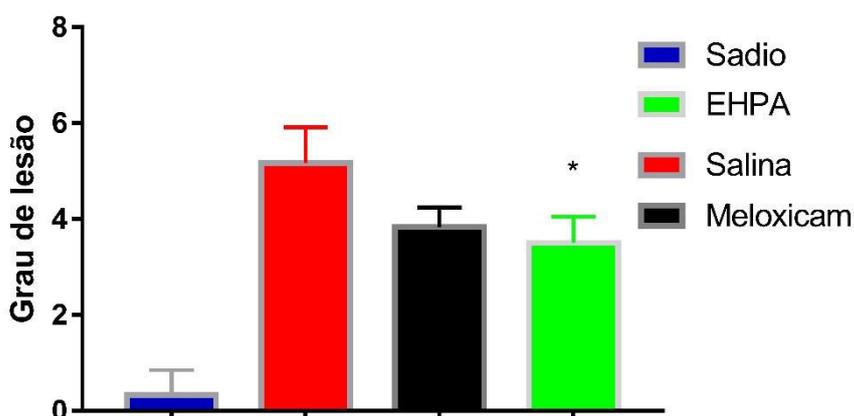


Figura 16. Avaliação histopatológica de acordo com os critérios da OARSI no grupo tratamento imediato. Os animais com osteoartrite pela injeção intra-articular de MIA foram avaliados nos dias (0,7, 14, 21 e 28) após a indução. EHPA: Administração de extrato de *Persea americana*, via oral (500mg/Kg), Salina: administração de NaCl 0,9% via oral (0,1mL/Kg), Meloxicam: administração de meloxicam, via oral (1mg/Kg). O subgrupo sadio não foi induzido e não foi tratado. (*) Valor $p < 0,05$ em relação aos subgrupos EHPA e salina. Teste de one-way anova.

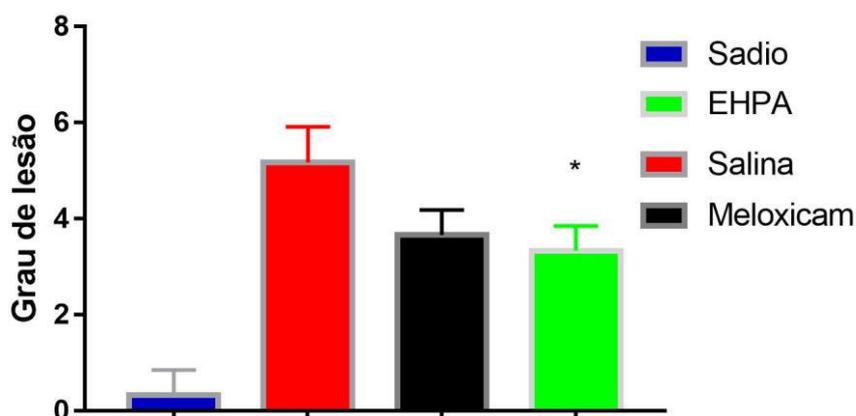


Figura 17. Avaliação histopatológica de acordo com os critérios da OARSI no grupo tratamento tardio. Os animais com osteoartrite pela injeção intra-articular de MIA foram avaliados nos dias (0, 21, 28, 35 e 42) após a indução. EHPA: Administração de extrato de *Persea americana*, via oral (500mg/Kg), Salina: administração de NaCl 0,9% via oral (0,1mL/Kg), Meloxicam: administração de meloxicam, via oral (1mg/Kg). O subgrupo sadio não foi induzido e não foi tratado. (*) Valor $p < 0,05$ em relação aos subgrupos EHPA e salina. Teste de one-way anova.

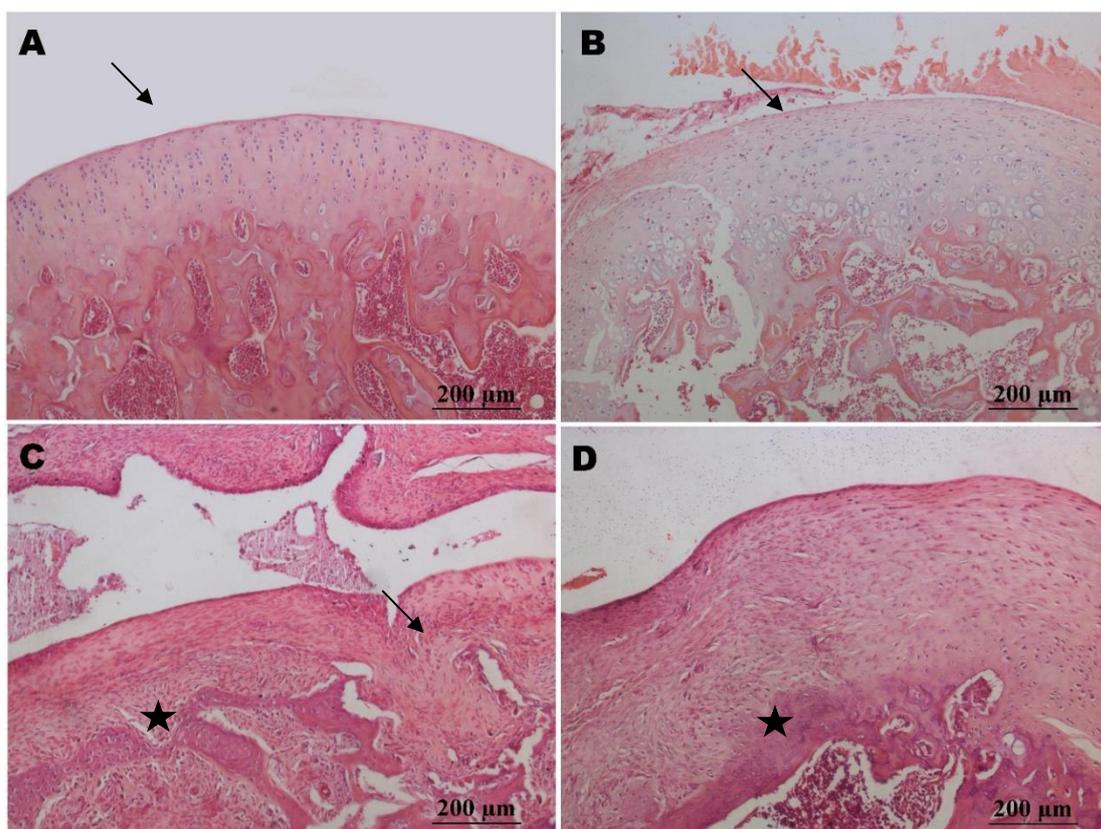


Figura 18. Sessões da cartilagem articular com diferentes graus de lesão cartilaginosa utilizando o escore de OARSI. A figura (A) ilustra o escore 0 de animais do subgrupo Sadio. A figura (B) ilustra o escore 1 de animais do subgrupo EHPA, A figura (C) ilustra o escore 4 dos animais do subgrupo salina com presença de infiltrado inflamatório (estrela) e a figura (D) ilustra o escore 3 com presença de infiltrado inflamatório (estrela) dos animais do subgrupo Meloxicam

6. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a ação antinociceptiva do extrato hidroetanólico de *Persea americana* Mill. em modelo experimental de osteoartrite em ratos. Trata-se de trabalho inédito e inovador, com escopo valorizador da flora local, haja vista a utilização de folhas de uma espécie vegetal amplamente distribuída no Brasil.

A atividade anti-inflamatória da espécie utilizada já fora avaliada previamente, mediante a utilização do extrato hidroetanólico das folhas de *Persea americana* para avaliar o efeito da exposição de raio-X em ratos, obtendo-se assim a redução dos efeitos clastogênicos provocados pela exposição à radiação (KUMAR et al., 2017).

Estudos denotaram a atividade analgésica e anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas de *P. americana* na dose de 800mg/kg (ADEYEMI et al., 2002), corroborando outras pesquisas que evidenciaram ação do extrato das folhas de *Persea americana* em modelo de dor experimental (contorções abdominais induzidas por ácido acético) (ABUBAKAR; ADAMU, 2013), bem como estudos que evidenciaram a ação analgésica periférica e central de *Persea americana* (HERNANDEZ et al., 2014).

Outras pesquisas utilizando o gênero *Persea* também já foram realizadas, em que as avaliações com *Persea cordata* comprovaram a ação anti-edematogênica em testes utilizando os agentes flogísticos, dextrana e carragenina (SCHLEMPER; et al., 2013).

Testes com *Ximenia americana*, espécie rica em compostos semelhantes ao da *Persea americana* (canferol, quercitrina e ácido cafeico) evidenciaram ação anti-edematogênica da espécie (SILVA et al., 2017). Os compostos químicos apresentados nesse estudo corroboram os estudos conduzidos por FERREIRA et al., (2018), ALONSO (2014), ASAOLU (2010), ADEYEMI et al., (2002) e DE ALMEIDA et al. (1998), que também detectaram a presença de catequinas, quercetina, keampferol, derivados dos ácidos cumárico e clorogênico, cianidina, abacatina, persiteol, taninos, persina e tiramina.

Os estudos em epígrafe servem como pilares para a hipótese da presente investigação, vez que se almejou quantificar a atividade antinociceptiva do extrato vegetal de *Persea americana* em modelo experimental de osteoartrite em ratos.

Todos os resultados da caracterização química foram feitos em parceria com o projeto denominado “Avaliação Pré-clínica de *Persea americana* Mill: caracterização química, toxicidade e potencial farmacológico na modulação da dor neuropática em ratos”, vinculado ao laboratório de estudo experimental em dor (LEED) da Universidade Federal do Maranhão.

A utilização do modelo experimental de osteoartrite induzida por injeção intra-articular de MIA em ratos é amplamente utilizada (LITTLE, 2008) e suas principais vantagens são fato de que estes animais raramente sofrem de infecção pós-operatória (BENDELE, 2001), são facilmente manuseados e exigem um baixo custo de manutenção, além de possuírem genoma completo disponível para estudo. (GREGORY et al., 2012).

A indução de osteoartrite com 2 mg de MIA é capaz de produzir hiperalgesia e alodinia, sem efeitos sistêmicos relevantes sobre a saúde geral dos animais (modificado de FERNIHOUGH, J. et al, 2004).

Diversos estudos utilizam essa metodologia para indução de osteoartrite. RODRIGUES, em 2017, realizou tal modelo de indução em pesquisa que utilizou o ranelato de estrôncio em modelo experimental de osteoartrite em ratos.

Os animais não possuem a capacidade de comunicação, dificultando a avaliação da resposta frente a dor. Sendo assim, uma das formas de se estimar a resposta a um estímulo nociceptivo se dá pela avaliação de respostas comportamentais, motoras e fisiológicas (RODRIGUES, 2019).

Em todos os testes comportamentais (*Vonfrey test*, *rotarod test* e *randall selitto test*) houve uma brusca caída nos escores de avaliação, os quais foram gradualmente crescentes. Essa diminuição no escore indica que a indução foi corretamente realizada e a falta de sinais clínicos, tais como alteração na alimentação e hidratação, além de sinais flogísticos, indicam que não houveram efeitos sistêmicos nos animais.

O teste de deambulação forçada (*Rotarod test*), em ambos os protocolos experimentais, mostrou que a utilização do extrato de *Persea americana*, via oral, na dose de 500mg/kg melhorou a resposta à nocicepção. Isso foi evidenciado através das diferenças estatísticas entre os subgrupos salina e EHPA.

Resultados semelhantes foram obtidos nos demais testes comportamentais (*VonFrey Test* e *Randall Selitto Test*), comprovando assim o potencial do extrato hidroetanólico de *Persea americana* para redução de dor em osteoartrite

O meloxicam é um anti-inflamatório não esteróide potente, inibidor de tromboxanas e prostaglandinas, com excelente propriedade antipirética e analgésica, muito usado para tratar afecções musculoesqueléticas (SPINOSA et al., 1999). Além disso, detém características neuroprotetoras e estão associadas a mínimos efeitos colaterais (HAKAN et al., 2011). É uma droga amplamente utilizada na clínica médica e a falta de significância entre os subgrupos EHPA e Meloxicam em todos os testes comportamentais sugere que o extrato hidroetanólico de *Persea americana* tenha efeitos anti-inflamatórios similares a este fármaco.

A resposta positiva dos animais tratados com extrato hidroetanólico de *Persea americana* Mill frente aos testes de nocicepção corrobora com estudos que apontam que esse mesmo extrato possui ação anti-inflamatória em modelos experimentais agudos, demonstrado pela diminuição do edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos seja de natureza osmótica (dextrana) ou celular (carragenina) (LIMA, 2018).

Sabe-se que a atividade antinociceptiva do Extrato Hidroetanólico de *Persea americana* Mill. apresenta características de atividade predominantemente periférica, sendo evidenciada em estudos de redução do número de contorções abdominais e redução do tempo de resposta na fase inflamatória (LIMA, 2018).

Os resultados das análises bioquímicas e hematológicas mostraram que a utilização do extrato em ambos protocolos de tratamento não resultou em toxicidade hepática, renal e hematológica, uma vez que a quantidade das células do sistema hematopoiético e os marcadores bioquímicos estiveram dentro dos padrões de normalidade, corroborando os dados de LIMA et al que em 2014 determinou valores de referência para ser utilizado em ratos machos da linhagem *Wistar*.

Além disso, destaca-se que no subgrupo dos animais tratados com o extrato, houve redução do nível do HDL e triglicérides. Esses resultados confirmam os estudos de MOHAMED, 2011 e MONIKA, 2014 previamente apresentados neste trabalho.

A análise radiológica é de extrema importância para o diagnóstico de osteoartrite de joelho. Através dele se pode graduar e quantificar o comprometimento

das articulações, verificar a instabilidade ligamentar ou a perda óssea. (RODRIGUES et al., 2012) Além disso, é de fundamental importância para orientar sobre as possíveis alternativas de tratamento. Dentro desse contexto, a análise radiográfica de Kellgren e Lawrence é a mais utilizada (SCHIPHOF et al., 2011).

Estudos comparativos entre o uso de meloxicam por via intra-articular e sistêmica no controle da osteoartrite em coelhos, com o enfoque no processo de reparação da cartilagem, evidenciam que a droga se mostrou eficaz no controle do processo inflamatório articular, tanto por via sistêmica quanto por via articular, permitindo o remodelamento cartilaginoso (VIDOTTO et al., 2013). Estudos semelhantes apontam que doses altas e baixas de meloxicam resultaram em um efeito condroprotetor, além de mostrar que as doses mais altas estão relacionadas com um efeito protetor nas lesões ósseas. (NAGY et al., 2017) Outros estudos mostram que substâncias naturais, como o resveratrol, em associação ao meloxicam, melhoram as disfunções articulares do processo patológico de osteoartrite (HUSSAIN et al., 2018), justificando assim a utilização dessa droga no protocolo experimental.

Em relação as análises radiológicas, a maior diferença estatística foi obtida ao se comparar os subgrupos Sadio e Salina, tanto no grupo tratamento imediato, quanto no grupo tratamento tardio. Isso mostra que os animais que foram tratados com soro fisiológico foram os que possuíram maior estreitamento do espaço articular, severa esclerose subcondral, deformidade do contorno ósseo além da presença de osteófitos. Enquanto os subgrupos que receberam tratamento possuíram leve estreitamento articular e ausência de deformidades severas na cartilagem.

A utilização do meloxicam na remodelação articular já foi estudada, como dito anteriormente, trazendo bons resultados. Portanto, o fato de haver a diminuição dos escores na avaliação de osteoartrose de Kellgren e Lawrence nos subgrupos EHPA e Meloxicam e o fato de não haver diferenças estatisticamente significantes entre os dois subgrupos (EHPA e Meloxicam) sugere que tanto o extrato quanto a droga atuem na remodelação da articulação.

Radiografias possuem elevada acurácia na identificação de mudanças estruturais da OA, porém o diagnóstico pode se tornar difícil nos estágios iniciais da patologia. Neste sentido, avaliações histológicas são usadas em muitos estudos no acompanhamento da progressão da doença (CAMPOS et al., 2013).

A cartilagem dos joelhos forma o arcabouço de sustentação do osso subcondral. Os animais que foram tratados com solução salina demonstraram um severo quadro de degeneração da superfície articular. Além disso, a presença de células do sistema hematopoiéticos e presença de infiltrado vascular sugere um quadro inflamatório local. Enquanto os animais que foram tratados com o extrato vegetal e o meloxicam, em ambos protocolos experimentais, apresentaram uma menor degeneração articular e menor presença de infiltrado vascular. Assim sendo, a análise histológica corrobora com a análise radiográfica sugerindo que a utilização do extrato vegetal de *Persea americana* atue na diminuição do quadro inflamatório da osteoartrite de joelho, possuindo também ação antinociceptiva.

O presente estudo teve como limitação avaliar a dor do ponto de vista periférico. É necessário que haja mais avaliações que envolvam os componentes centrais relacionados a dor em osteoartrite. Também é importante destacar a dificuldade de reproduzir em animais um modelo experimental de osteoartrite que envolva todas as mudanças, evoluções e parâmetros subjetivos de humanos.

A evolução da indústria farmacêutica e o reconhecimento dos centros de pesquisas a respeito das plantas usadas na medicina popular auxiliam o desenvolvimento de novos fármacos. Destarte, após todos resultados expostos, *Persea americana* se mostra como uma possível alternativa para o tratamento da dor em OA, porém é preciso que haja maiores investigações farmacológicas envolvendo a utilização do seu extrato hidroetanólico.

7. CONCLUSÃO

O tratamento por via oral na dose de 500 mg/Kg de extrato hidroetanólico de *Persea americana* foi eficaz para reduzir a dor em osteoartrite através da avaliação dos parâmetros clínicos/comportamentais utilizados (deambulação forçada, sensibilidade tátil e hiperalgesia mecânica) em ambos protocolos de tratamento.

A utilização de *Persea americana* sugere uma melhora no comprometimento articular e cartilaginoso, mostrando resultados positivos nas radiografias e análise histopatológica.

O extrato vegetal não alterou as funções renais e hepáticas dos animais tratados, também não aumentou ou diminuiu o número de células sanguíneas nos animais, sugerindo que a utilização do extrato na dose de 500mg/kg não oferece toxicidade aguda ao sistema renal, hepático e hematopoiético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUBAKAR MG, ADAMU L. Antinociceptive effects of avocado leaf extracts (*Persea americana*) on rats. *Toxicology Letters*. 89: 11-21; 2013.
- ADEYEMI OO, OKPO SO, OGUNTI OO. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea Americana* Mill (Lauraceae). *Fitoterapia*. 1:375-380; 2002.
- AGRIANUAL. *Anuário da agricultura brasileira*. São Paulo: FNP Consultoria, 1:111-115; 2014.
- ALCARAZ ML, THORP TG, HORMAZA JI. Phenological growth stages of avocado (*Persea americana*) according to the BBCH scale. *Scientia Horticulturae*, 164: 434-439; 2013.
- ALMEIDA GVB. Mercado Atacadista de Abacate e Avocado. (CEAGESP) *III Simpósio Nacional de Abacate e Avocado*. Bauru; 2013.
- ALONSO J. *Tratado de fitofármacos y nutraceuticos*. Rosário, Argentina. Editora Corpus. 1: 69-72; 2004.
- ALVÁREZ JM, CUCA LE, CARRASCO-PANCORBO A, MUELLE ABR, FERNANDEZ I, FERNANDEZ-GUTIERRES, A. Phenolic constituents of leaves from *Persea caerulea* Ruiz & Pav; Mez (Lauraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 67:53-57; 2016.
- AN BC, FANG K, WANG Y, ZENG YM, DAI KR. New variables for measuring joint space width to evaluate knee osteoarthritis. *Chin Med J (Engl)*. 124(23):388-390, 2011.
- ANDRADE SF. Analgésicos. In:_____. *Manual de terapêutica veterinária*. 3. ed. São Paulo: Roca, Cap. 6: 77-78; 2008. (a).
- ANDRADE SF. Antiinflamatórios. In:_____. *Manual de terapêutica veterinária*. 3. ed. São Paulo: Roca, Cap. 7: 115-140; 2008. (b).
- ASAOLU MF, ASAOLU SS, FAKUNLE JB, EMMAN-OKON BO, TOGUN RA. *Pakistan journal of Nutrition*. 9 (11):1074-1077; 2010.
- BARROS SR. FERREIRA AF, LEÃO SS, ALMEIDA NETO A. A formação de acadêmicos de enfermagem quanto à percepção da dor em duas instituições de ensino superior. *Rev dor*. 12(2): 131-137; 2011.

BARROSO GM, GUIMARÃES EF, ICHASO CLF. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. 1(2) 309 p. Viçosa: UFV; 2002.

BENDELE AM. Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*: 1(4); 2001.

BIJLSMA JW, BERENBAUM F, LAFEBER FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet*. 37: 2115-2126; 2011.

BRASIL. *Farmacopeia Brasileira*. 5. ed. Brasília, DF: ANVISA, 2010.

BROWN L, FOREST L. Manejo da dor: Aspectos gerais da fisiologia, da avaliação e do tratamento. São Paulo: Associação Médica Americana. 1: 4-11; 2006.

CAMPOS JS. *Cultura racional do abacateiro*. SP, ICONE, (Coleção Brasil Agrícola).1: 11-136; 1985.

CAMPOS WNS, SOUZA MA, RUIZ T, PERES TP, NÉSPOLI PB, MARQUES ATC, COLODEL EM, SOUZA RL. Experimental osteoarthritis in rabbits: lesion progression. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(3): 279-285; 2013.

CAVALCANTE P.B. *Frutas comestíveis da Amazônia*, 5 ed. CEJUP, Belém. 279p; 1991.

CELICH KLS, GALON C. Dor crônica em idosos e sua influência nas atividades da vida diária e convivência social *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*. 12(3): 345-359; 2009.

CHAVERRI C, CICCIO JF, DÍAZ C. Chemical Composition of *Aiouea costaricensis* (Lauraceae) Essential Oils from Costa Rica and their Cytotoxic Activity on Cell Lines. *Journal of Essential Oil Research*. 22(6): 524-529, 2010.

CHRISTOFFEL MM, CUNHA JM, SANT ANNA ASF, GARCIA RR. Princípios éticos da equipe de enfermagem ao cuidar da dor do recém-nascido. *Revista Ministério Enfermagem*. 13(3): 321-326; 2009.

COHEN S.P, MAO J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ*.348:765-767; 2014.

CORREIA, R. C.; ARAUJO, J. L. P.; MOUCO, M. A. do C.; BRAGA, C. A.; MENDONÇA, R. F. *Abacate: Preferências e Mercado*. 2010. Disponível em:< <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/870018/1/Mouco.pdf>.> Acesso em 21/06/2019.

CUSTÓDIO G, ZAPPELINI CEM, TREVISOL DJ, TREVISOL FS. Uso de analgésicos no pós-operatório para tratamento da dor em hospital no sul do Brasil. *Arquivos Catarinense de Medicina*. 37(4): 75-79; 2008.

DE ALMEIDA AP, COSTA SS, MIRANDA MMFS, SIMON IC, WIGG MD, LAGROTA MHC. Flavonol monoglycosides from the antiviral fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion. *Phytoterapy Research*. 12: 562-567; 1998.

DELGADO, J.M.; FERRUS, A; MORA, F.; RUBIA, F.J. *Manual de Neurociências*. Espanha: Sínteses; 1998.

DESCOURTILZ, M. E. Flore médicale des Antilles. v. 8 ed.Paris: Pichard, 1829.

FALEIROS RR, ALVES GE, MARQUES AP. Dor aguda: vias anatômicas, bioquímica e fisiopatologia. *Caderno Técnico da Escola de Veterinária da UFMG*, 21: 5-14; 1997.

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*. 112: 83-93; 2004.

FERREIRA ICRF, MELGAR B, DIAS MI, CIRIC A, SOKOVIC M, GARCIA-CASTELLO EM. L. Bioactive characterization of *Persea americana* Mill. by-products: A rich source of inherent antioxidants *Industrial Crops & Products*. 11: 212-218; 2018.

FIGUEIREDO NETO E. M, QUELUZ TT, FREIRE BF. A. Atividade física e sua associação com qualidade de vida em pacientes com osteoartrite. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 51(6): 116-121; 2011.

FITZGERALD JB, JIN M, GRODZINSKY AJ. Shear and compression differentially regulate clusters of functionally related temporal transcription patterns in cartilage tissue. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(34): 95-103; 2006.

GARRIDO CA, SAMPAIO TCFVS, FERREIRA, FS. Estudo comparativo entre a classificação radiológica e análise macro e microscópica das lesões na osteoartrose do joelho. *Revista Brasileira de Ortopedia*, 46(2): 155–159; 2011.

GILRON I, JENSEN TS, DICKENSON A.H. Combination pharmacotherapy for management of chronic pain: from bench to bedside. *Lancet Neurol*, 12(11): 86-91; 2013.

GREGORY MH, CAPITO N, KUROIKI K, STOKER AM, COOK JL, SHERMAN SL. A review of translational animal models for knee osteoarthritis. *Arthritis*. 2012:1-14; 2012.

GRIFFIN RB, WOOLF CJ. Farmacologia da analgesia. In: GOLAN, D. E et al. Princípios de Farmacologia: *A base fisiopatológica da farmacoterapia*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 240-259; 2009.

HAKAN T, TOKLU HZ, BIBER N, OZEVREN H. Effect of COX-2 inhibitor meloxicam against traumatic brain injury-induced biochemical, histopathological changes and blood–brain barrier permeability. *Neurological Research*, 32(6):629- 635; 2010.

HERNANDEZ AIG, BARREIRO ML, RODRÍGUES ZM, RODRÍGUES EB, AMADOR MCV, HORMAZA IM, LUZ LLA, GONZALES AD, ALVAREZ GB, RODRIGUEZ FJM. Validación preclínica de actividad analgésica periférica y central de la decocción de hojas frescas de *Persea americana* Mill (aguacate) y *Musa x paradisiaca* L. (plátano). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 19(1): 225-234; 2014.

HERRERO-BEAUMONT G, ROMAN-BLAS JA, BRUYÈRE O, COOPER C, KANIS J, MAGGI S, RIZZOLI R, REGINSTER JY. Clinical settings in knee osteoarthritis: *Pathophysiology guides treatment*. *Maturitas*. 96: 54–57; 2017.

HUNTER D, BIERMA-ZEINSTRA, Osteoarthritis. *The Lancet*. 393(10182):1745-1759; 2019.

HUNTER DJ, FELSON DT. Osteoarthritis. *BJM*.18: 332(7542): 639-642; 2006.

HUSSAIN SA, MAROUF BH, ALI ZS, AHMMAD RS. Efficacy and safety of co-administration of resveratrol with meloxicam in patients with knee osteoarthritis: a pilot interventional study. *Clinical Interventions in Aging*. 13: 1621–1630; 2018.

IASP: *IASP TERMINOLOGY*. Disponível em <<https://www.iasppain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698&navItemNumber=576>> Acesso em: 13 julho de 2019.

INOUE A, IKOMA K, MORIOKA N, KUMAGAI K, HASHIMOTO T, HIDE I, NAKATA Y. Interleukin-1beta induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase-2 system. *Journal of Neurochemistry*. 73(5): 2206-2213; 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. *Produção Agrícola Municipal*. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2016_v43_br.pdf> Acesso em: 11 de março de 2019.

ISSA RI, GRIFFIN TM. Pathobiology of obesity and osteoarthritis: integrating biomechanics and inflammation. *Pathobiology of Aging & Age Related*. 9(2): 1-16; 2012.

KELLGREN JH, LAWRENCE JS. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis*. 16(4): 494–502; 1957.

KLAUMANN PR, WOUK AFPf, SILLAS T. Patofisiologia da dor. *Archives of Veterinary Science*. 13(1): 1-12; 2008.

KOLLER OC. Abacate: produção de mudas, instalação e manejo de pomares, colheita e pós-colheita. Porto Alegre: Cinco Continentes, 145 p. 2002.

KRELING MCGD, CRUZ DALM, PIMENTA CAM. Prevalência de dor crônica em adultos. *Revista Brasileira de Enfermagem*. 59(4): 509-13; 2006.

KUMAR A, KUMARCHANDRA R, RAI R, SANJEEV G. Anticlastogenic, radiation antagonistic, and anti-inflammatory activities of *Persea americana* in albino Wistar rat model. *Research in pharmaceutical sciences*. 12(6): 488-499; 2017.

LARSEN BL, JACOFISKY MC, BROWN JA, JACOFISKY DJ. Valgus bracing affords short-term treatment solution across walking and sit-to-stand activities. *Arthroplast* 28(5): 792-797; 2013.

LIMA CM, LIMA AK, MELO MGD, DORIA GAA, LEITE BLS, SERAFINI RLC, ALBUQUERQUE JUNIOR RLC, ARAÚJO AAS. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena*. 10(3): 34-41; 2014.

LIMA NFM. *Mecanismo de ação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da Persea americana*. 2018. 72f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, São Luis.

LITTLE C, SMITH M. Animal models of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rev*. 4(3): 175-185; 2008.

LOESER RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartilage*. 17(8): 971-979; 2009.

LOPES JUNIOR OV, INACIO AM. Uso de glucosamina e condroitina no tratamento da osteoartrose: uma revisao da literatura. *Revista Brasileira de Ortopedia*, São Paulo. 48(4):300-306; 2013.

LU QY, ARTEAGA JR, ZHANG Q, HUERTA S, GO VLW, HEBER D .Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: role of lipid-soluble bioactive substances. *J Nutr Biochem* 16: 23-30; 2005.

MADRINÃN-RESTREPO S. 1996. *Systematic studies in Lauraceae. Monograph of Rhodostemonodaphne*. Ph.D. dissertation, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, USA.

MARTEL-PELLETIER J, BARR AJ, CICUTTINI FM, CONAGHAN PG, COOPER C, GOLDRING MG, GOLDRING SR, JONES G, TEICHTAHL AJ, PELLETIER JP. Osteoarthritis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2(1) : 16072; 2016.

MATOS, F. J. A. *Introdução a fitoquímica experimental*. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141 p.

MEDINA JC, BLEINROTH EM, TANGO JS, CANTO WL. *Abacate: da cultura ao processamento e comercialização*. Campinas: ITAL. 212 p, 1978.

MELZACK, R.; WALL, P. *O desafio da dor*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982

MOHAGHEGHZADEH A, FARIDI P, SHAMS-ARDAKANI M. Medicinal smokes. *J Ethnopharmacol*. 108(2):161-184; 2006.

MOHAMMED S A D. Hypolipidemic and antioxidant activities of avocado fruit pulp on high cholesterol fed diet in rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 5(12):1475-1483; 2011.

MONIKA P, GEETHA A. Effect of *Persea americana* (avocado) fruit extract on the level of expression of adiponectin and PPAR- γ in rats subjected to experimental hyperlipidemia and obesity. *Journal of complementary & Integrative Medicine*. 11(2): 107–119; 2014.

MONVILLE C, TORRES E, DUNNETT S. Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. *Journal Neurosc Methods*. 158(2): 219–223; 2006.

MURPHY, L. Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 59(1):1207–1213; 2008.

NAGY E, VAJDA E, VARI C, SIPKA S, FARR AM, HORVATH E. Meloxicam ameliorates the cartilage and subchondral bone deterioration in monoiodoacetate-induced rat osteoarthritis. *Peer*; 5(1):1-19; 2017.

NASCIMENTO LA, KRELING MCGD. Avaliação da dor como quinto sinal vital: opinião de profissionais de enfermagem. *Acta. Paulista de Enfermagem*. 24(1): 50-54; 2011.

NEOGI T, ZHANG Y. Epidemiology of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 39(1): 1-19; 2013.

OLALEKAN AU, WINDT DAV, JORDAN JL, DZIEDZIC KS, HEALEY EL, PEAT GM. Exercise for lower limb osteoarthritis: systematic review incorporating trial sequential analysis and network meta-analysis. *British Medical Journal*. 20(1): 347-360; 2013.

PADMANABHAN M, ARUMUGAM G. The modulating effect of *Persea americana* fruit extract on the level of expression of fatty acid synthase complex, lipoprotein lipase, fibroblast growth factor-21 and leptin –A biochemical study in rats subjected to experimental hyperlipidemia and obesity. *Phytomedicine*. 22(1):939-945; 2015.

PAMPLORA GD, ROGER MD. Encyclopaedia of Medicinal Plants, pp. 719 -720. Pavela R 2008. Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*. 102: 555-559; 1999.

PEIXOTO RF, SANTOS DHF, MENEZES DPB, ARAÚJO DD, PEIXOTO DF, DA SILVA JSP. Controle da Dor Pós-Operatória em Cirurgia Oral: Revisão de Literatura. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*. 15(4):465-47; 2011.

POPENOE W. 1924. The Avocado. IN: *Manual of Tropical and Subtropical Fruits*. The MacMillan Company. New York, 9-78.

PORTNOI AG. *A psicologia da dor*. São Paulo: Ed. Guanabara Koogan, 2014. p. 272
PRITZKER K.P, GAY S, JIMENEZ SA, OSTERGAARD K, PELLETIER J.P, REVELL PA. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 14:13-29; 2019.

RANDALL, LO, SELLITO JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 111: 409-419; 1957.

REGINSTER JY. Cardiac concerns associated with strontium ranelate. *Expert Opinion On Drug Safety*. 13(9):1209-1213; 2014.

REZENDE UM, CAMPOS GC. A osteoartrite é uma doença mecânica ou inflamatória? *Revista Brasileira de Ortopedia*. 48(6):471–474; 2013.

ROCHA APC, KRAYCHETE DC, LEMONICA L, CARVALHO LR, BARROS GAM, GARCIA JBS, SAKATA RK. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. (2007). *Revista Brasileira Anestesiologia*. Artigo de revisão. 57(1): 94-105; 2007.

RODRIGUES AA, KARAM FC, SCORSATTO C, MARTINS C. Análise da reprodutibilidade da classificação de Kellgren e Lawrence para osteoartrose de joelho. *Revista da AMRIGS*, 56(2):107-110; 2012.

RODRIGUES, MS. *Análise da ação analgésica da Borreria verticillata (L.) g. mey. em modelo experimental de osteoartrite em rato*. 2019. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, São Luis.

RODRIGUES TA, SAMPAIO JUNIOR AJB, NUNES IDP, CARTÁGENES MSS, GARCIA JBS. Effect of strontium ranelate on pain behavior in na experimental model of osteoarthritis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 50(9):1-15; 2017.

SALLUM AM, GARCIA DM, SANCHES M. Dor aguda e crônica: revisão narrativa da literatura. *Acta Paulista de Enfermagem*; 25(1):150-154p; 2012.

SARVIMÄKI A, STENBOCK-HULT B. Quality of life in old age described as a sense of well-being, meaning and value. *Journal of Advanced Nurse*. 32(4):1025–33; 2000.

SANGHI D, SRIVASTAVA RN, SINGH A, KUMARI R, MISHRA R, MISHRA A. The association of anthropometric measures and osteoarthritis knee in non-obese subjects: a cross sectional study. *Clinics (Sao Paulo)*.66(2):275-9; 2011.

SANTOS-NOGUEIRA, REDONDO-CASTRO E, MANCUSO R, NAVARRO X. Randall-Selitto Test: A New Approach for the Detection of Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury. *Journal Of Neurotrauma*. 29(5): 898-904; 2012.

SCHIPHOF D, DE KLERK BM, KERKHOF HJ, HOFMAN A, KOES BW, BOERS M. Impact of different descriptions of the Kellgren and Lawrence classification criteria on the diagnosis of knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 70(8):1422–7; 2011.

SCHLEMPER SRDM, SCHLEMPER V, SILVA DD. Antibacterial activity of *Persea cordata* stem barks. *Fitoterapia*. 72: 73-75; 2001.

SCORA R W, BERGH B. The origins and taxonomy of avocado (*Persea americana*) mill. Lauraceae. *Acta Horticulturae, Leuven*. 275: 387–394; 1990.

SILVA A, ANDERSEI ML, TUFIK S. Sleep pattern in an experimental model of osteoarthritis. *Pain*. 140(3): 446-455; 2008.

SILVA MD. *Estudos comportamentais e farmacológicos com a diacereína no modelo de monoartrite induzida por adjuvante complete de Freund (efa) em roedores*. 2009. 79f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

SILVA RHM, LIMA NFM, LOPES AJO, VASCONCELOS CC, MESQUITA JWC, MESQUITA LSS, LIMA FCVM, RIBEIRO MN, RAMOS RM, CARTAGENES MSS, GARCIA, JBS. Antinociceptive Activity of *Borreria verticillata*: *In vivo* and *In silico* Studies. *Frontiers in Pharmacology*. 8(1) 283-291; 2017.

SNIDER RK. *Tratamento das doenças do sistema musculoesquelético*. São Paulo: Manole, seção 6, p.304-365, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. *Osteoartrite e artrose*. Disponível em: <www.reumatologia.org.br/doencas/principaisdoencas/osteoartrite-artrose> Acesso em 11 de fevereiro de 2019.

SPINOSA HS, GÓRNIAC SL, BERNARDI MM. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1999.

TAT SK, LAJEUNESSE D, PELLETIER JP, MARTEL PELLETIER J. Targeting subchondral bone for treating osteoarthritis: what is the evidence?. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 24(1): 51-70; 2010.

TEIXEIRA CG. CULTURA IN. *Abacate: Cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos*. 2. Ed Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, Cap. 1, p. 1-54. (Frutas Tropicais), 1995

TRANQUILLI, W.J.; GRIMM, K.A.; LAMONT, L.A. Terminologia, fisiologia, reconhecimento e estratégias clínicas para tratamento da dor. In:_____. *Tratamento da dor para o clínico de pequenos animais*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2005. Seção 1, p. 1-12.

TSAUO JY, CHENG PF, YANG RS. The effects of sensorimotor training on knee proprioception and function for patients with knee osteoarthritis: a preliminary report. *Clin Rehabil*. 22(5): 448-57; 2008.

VIDOTTO VT, DA ROCHA RT, DE PAIVA CL, NARDOTTO JR, FARIAS A, STEFANESF SA. Estudo comparativo do uso de meloxicam por via intra-articular e sistêmica no controle da osteoartrite experimentalmente induzida em joelho de coelhos. *Revista Brasileira de Ortopedia*. 48(6):524–53; 2013.

VIEIRA, MEB. Prevalence, characteristics, and factors associated with chronic pain with and without neuropathic characteristics in São Luís, Brazil. *J Pain Symptom Manage*. 44(2): 239-241; 2012.

YASUDA TH. Inhibits prostaglandin E2 production via CD44 in U937 human macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 220(3):229-35; 2010.

YU DG, DING H, MAO Y, LIU M, BO Y, ZHAO X, WANG XQ, LI Y, LIU GW, NIE SB, ZHU Z.. Strontium ranelate reduces cartilage degeneration and subchondral bone remodeling in rat osteoarthritis model. *Acta Pharmacologica Sinica*. 34(3): 393-402; 2013.

ANEXO 1 – Certificado de aprovação emitido pelo CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA
CIAEP: 01.0341.2014



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “ANÁLISE DA AÇÃO DA *PERSEA AMERICANA MILL*, EM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM ROEDORES” registrada com o nº 23115.012978/2017-89, sob a responsabilidade de **MARIA DO SOCORRO DE SOUSA CARTÁGENES**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.

FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA () EXTENSÃO
Vigência da autorização	09/05/2018 à 30/12/2019
Espécie/linhagem/raça	Ratos <i>novergicus</i> (Wistar)
Nº de animais	50
Peso/Idade	250-300g/45 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFMA

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho
 Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais – CEUA/UFMA

ANEXO 2 – Certificado de tombo de exsicata

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Fundação Instituída nos termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 – São Luís - Maranhão.



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA - CCBS
HERBÁRIO DO MARANHÃO - MAR

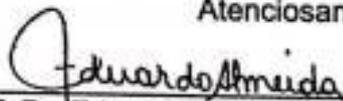
São Luís, 10 de Outubro de 2018

CONFIRMAÇÃO DE IDENTIFICAÇÃO

Segue abaixo a confirmação da identificação solicitada. Desde já agradecemos o envio do material e informamos que o mesmo estará devidamente catalogado no acervo do Herbário MAR.

Nº tombo MAR	Coletor (número)	Família	Espécie
10.960	B. F. Bonfim (01)	Lauraceae	<i>Persea americana</i> Mill.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Eduardo B. de Almeida Jr.
Curador do Herbário MAR

ANEXO 3 – Certidão de cadastro no SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº ADF3144

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **ADF3144**
 Usuário: **Casa**
 CPF/CNPJ: **052.806.353-75**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Persea americana

Título da Atividade: **Estudo da ação de Persea americana Mill. em modelo experimental de osteoartrite em ratos**

Equipe

Maria do Socorro de Sousa Cartagenes UFMA
Breno Facundes Bonfim UFMA

Parceiras Nacionais

06.279.103/0001-19 / FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Data do Cadastro: **08/11/2018 11:53:50**
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **15:06** de **07/05/2019**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**